

4

2013

MEDICINE
ISSN 2074-5982

2013

4

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

ОЧЕРКИ СПОРТИВНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

В НЦБМТ ФМБА России издается многотомный научный труд, в котором на большом объеме собственных результатов и данных литературы впервые проанализирован и обобщен опыт разработки, доклинического изучения, клинических и специальных испытаний и апробаций высококвалифицированными спортсменами различных фармакологических средств поддержки их здоровья и работоспособности.



В первом томе приведены оценки работоспособности спортсменов при фармакологической поддержке тренировочного и соревновательного процессов в спорте высших достижений. Впервые предложена система дифференцированной доклинической оценки фармакологических средств, повышающих работоспособность, выносливость, скоростные характеристики и ее экстраполяция на спортсменов. Даны принципы и методы доклинической оценки и фармакокинетики инновационных фармакологических средств коррекции механизмов утомления, спортивного стресса при предельных физических нагрузках, постнагрузочного восстановления, сенсорных и когнитивных функций, а также определены этапы и пути создания персонализированных средств спортивной фармакологии.

Во втором томе, на основе современных данных клинико-экспериментальных исследований волонтеров, спортсменов высшей квалификации, военнослужащих и космонавтов, сформулированы принципы и предложены новые методы фармакологической коррекции угнетения энергообмена, гипоксии, иммунитета при предельно переносимых нагрузках. Даны научно обоснованные схемы применения метаболитов, антигипоксантов, иммуностимуляторов, интермедиаторов и антистрессорных средств нового поколения, а также комплексы фармакологических средств, повышающих работоспособность, ускоряющих процессы восстановления и устраняющих риски стрессорных срывов при истощающих нагрузках спортсменов.



Третий том посвящен вопросам оптимизации регуляторных функций организма с помощью энергообеспечивающих органо-тропных пептидных нуклеопротеидных комплексов, при предельных физических нагрузках, утомлении, астенизации, хронических заболеваний у спортсменов. Даны рекомендации по усилению влияния адаптогенов на физическую работоспособность и функциональное состояние спортсменов при работе «до отказа» в условиях горной местности или жаркого климата. Сформулирована концепция применения фармнутриентов, как лекарственных компонентов спортивного питания, основанная на идеологии «метаболического конструктора» персонализированной нутри-

тивной поддержки спортсменов в зависимости от вида спорта, режима тренировок и особенностей организма спортсмена. Представлены результаты разработки и испытаний отечественных инновационных фармнутриентов МиоАктив-Спорт, МиоАктив-Старт и МиоАктив-Форсаж.

Предварительные заявки на книги принимаются по адресу:
scbmt@yandex.ru.

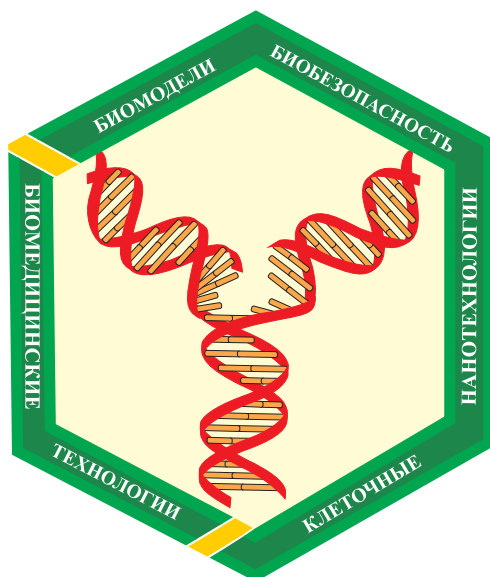
Научный журнал.

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), Ю. С. Макляков (д.м.н., проф.),
Е. Л. Матвеев (к.э.н., доц.), А. Н. Мурашев (д.б.н., проф.), Г. В. Раменская (д.ф.н., проф.),
А. О. Ревякин (к.б.н.), И. В. Сарвилина (д.м.н.), Х. Х. Семёнов (к.б.н.),
Н. В. Станкова (к.б.н., ответственный секретарь), Д. А. Сычев (д.м.н., проф.),
Д. Б. Чайванов (к.ф.-м.н.), Е. В. Ших (д.м.н., проф.),
Е. Б. Шустов (д.м.н., проф., зам. главного редактора)

Редакционный совет:

член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков,
акад. РАМН А. М. Дыгай, д.б.н. М. Ф. Киселёв, акад. РАМН А. А. Кубатиев,
акад. РАМН В. Г. Кукес, акад. РАН А. И. Мирошников, акад. РАН и РАМН М. А. Пальцев,
проф. А. С. Радиков, проф. В. Р. Рембовский, акад. РАМН К. В. Судаков,
акад. РАМН В. П. Фисенко, член-корр. РАМН Д. Ф. Хритинин, проф. Б. Д. Цыганков,
акад. РАМН В. Н. Ярыгин

Охраняется Законом Российской Федерации № 5351-1
«Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 года
и иными нормативно-правовыми актами. Воспроизведение
всего издания, а равно его части (частей) без письменного
разрешения издателя влечет ответственность в порядке,
предусмотренном действующим законодательством.

Адрес редакции:

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

Отпечатано в типографии «Айсинг»
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18
Подписано в печать 11.12.2013 г.
Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Н.М. Воробьева, Е.В. Федорова, А.В. Бурякина, Е.К. Вишневская, Т.В. Горбачева, А.Е. Аладышкина**
Сравнительное исследование токсических свойств комплекса оксованадия и его металлохелатного лиганда.....6
- А.О. Ревякин, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Д.А. Ксенофонтов**
Влияние колебаний содержания металлов в крови на их содержание в тканях лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении металлохелатов.....16
- Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, В.П. Ганапольский, М.К. Ржепецкая**
Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии.....29
- Е.Е. Ачкасов, Э.Н. Безуглов, А.А. Ульянов, В.В. Куршев, А.Д. Репетюк, О.Н. Егорова**
Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике.....46

РАБОТОСПОСОБНОСТЬ И ВЫНОСЛИВОСТЬ В СПОРТИВНОЙ БИОМЕДИЦИНЕ

- Г.Д. Капанадзе, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, И.А. Берзин, Н.В. Станкова, А.О. Ревякин, О.И. Степанова, Н.Я. Вихрова**
Экспериментальная оценка эффективности рецептуры «МиоАктив Форсаж» в условиях высоких физических нагрузок в тесте принудительного бега крупных лабораторных животных.....60
- В.Н. Каркищенко, И.А. Берзин, Н.В. Касинская, С.Е. Деньгина, О.И. Степанова, Ю.В. Фокин, А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, Е.Л. Матвеевко**
Оценка физической выносливости мелких лабораторных животных на фоне применения спортивного питания «МиоАктив Форсаж».....66
- В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Н.В. Касинская, О.И. Степанова, С.Е. Деньгина, Г.Д. Капанадзе, Ю.В. Фокин, И.А. Берзин, А.О. Ревякин, Е.Л. Матвеевко**
Экспериментальная оценка адаптогенной активности препарата «МиоАктив Форсаж» в тесте принудительного плавания70

СПОРТИВНОЕ ПИТАНИЕ

- Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, И.А. Берзин, О.И. Степанова, Е.Л. Матвеевко, Н.В. Касинская, С.Е. Деньгина**
Исследование влияния специализированного продукта спортивного питания «МиоАктив Форсаж» на устойчивость крыс линии WAG/GY, к острой гипобарической гипоксии.....77

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

В.Ю. Балабаньян, В. Боят, Г.Д. Капанадзе, Я.М. Хамди, В.И. Швец
Противоопухолевая активность наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот в отношении экспериментальной аденокарциномы молочной железы у мышей линии CBL84

Н.Е. Горбатова, С.А. Золотов, Я.О. Симаковский, С.М. Никифоров, С.В. Голубев, С.С. Алимпиев, А.В. Гейниц, В.И. Елисеенко, Н.В. Станкова
Экспериментальная сравнительная оценка эффективностирежимов абляции различной длительности импульсами CO₂ лазеров на кожных покровах мини-свиней для целей лазерной дермabrasии90

М.В. Ковина, Л. Зильберман, Ю.М. Ходарович
Изучение дифференцировки эмбриональных стволовых клеток при длительном кокультивировании с адипоцитами 107

А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина
Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза 114

А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Касинская, О.И. Степанова, О.В. Баранова, А.Г. Киселев
Моделирование лекарственного токсического гепатита на крысах..... 124

Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе, В.Н. Каркищенко, А.О. Ревякин, Н.В. Станкова, А.Е. Ким
Изменение параметров сердечной деятельности по данным ЭКГ у мини-свиней в условиях стресс-индуцированной тахикардии 126

МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

О.И. Степанова, Х.Х. Семенов, А.О. Ревякин, Н.В. Касинская, О.В. Баранова
Культивирование как способ выявления и реализации биологических и терапевтических эффектов стромальный фракции стволовых и прогениторных клеток костного мозга..... 134

М.И. Стригина, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина
Исследование погрешностей данных фотоплетизмограммы для анализа вариабельности сердечного ритма 139

Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов
Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств 149

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Л.А. Болотских, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов, Н.В. Касинская, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, Е.Л. Матвеевко
Создание лабораторных животных СПФ-статуса как основа экспериментальной медицины 158

Д.Б. Чайванов, Н.В. Станкова
Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели 164

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Е.В. Ших, А.А. Махова
Экспериментальное обоснование возможности регуляции активности P450 3A4 таурином с целью оптимизации фармакотерапии антибиотиками-макролидами 169

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.M. Vorobyeva, E.V. Fedorova, A.V. Buryakina, E.K. Vishnevskaya, T.V. Gorbacheva, A.E. Aladyshkina
A comparative study of toxicological properties of a oxovanadium complex and his ligand6

A.O. Revyakin, N.N. Karkishchenko, E.B. Shustov, V.N. Karkishchenko, D.A. Ksenofontov
Influence of fluctuations of the metals concentration in blood on their concentration in tissues of laboratory animals under normal and excess food consumption metallohelats.....16

E.B. Shustov, N.N. Karkishchenko, V.N. Karkishchenko, V.P. Ganapolskiy, M.K. Rzhpetskaya
Physiological justification of requirements to laboratory models for optimization of screening antihypoxic parameters activity by criteria of resistance to an extreme hypobaric hypoxia29

WORKING CAPACITY AND ENDURANCE IN SPORTS BIOMEDICINE

G.D. Kapanadze, V.N. Karkishchenko, E.B. Shustov, I.A. Berzin, N.V. Stankova, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova, N.Ya. Vikhrova
Experimental assessment of efficiency of a compounding of "MioActiv Forsage" in the conditions of high physical activities in the test of compulsory run of large laboratory animals60

V.N. Karkishchenko, I.A. Berzin, N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina, O.I. Stepanova, Yu.V. Fokin, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, E.L. Matveenko
Assessment of physical endurance of small laboratory animals against application of a sports nutrition of "MioActiv Forsage"66

V.N. Karkishchenko, N.N. Karkishchenko, N.V. Kasinskaya, O.I. Stepanova, S.E. Dengina, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, I.A. Berzin, A.O. Revyakin, E.L. Matveenko
Experimental assessment of adaptogenic activity of the preparation " MioActiv Forsage " in the test of compulsory swimming70

SPORTS NUTRITION

Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkishchenko, V.N. Karkishchenko, I.A. Berzin, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, E.L. Matveenko, N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina
Research of influence of a special product for sport nutrition "MioActiv Forsage" on WAG/GY-rats resistance to a sharp hypobaric hypoxia.....77

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

V.Yu. Balaban'yan, V. Boyat, G.D. Kapanadze, Ya.M. Hamdy, V.I. Shvets
Antitumor activity of nanoparticulate paclitaxel formulation based on lactic and glycolic acids copolymer in an experimental mammary adenocarcinoma in C57BL6 mice84

N.E.Gorbatova, S.A. Zolotov, Ya.O. Simanovsky, S.M. Nikiforov, S.V. Golubev, S.S. Alimpiyev, A.V. Geynits, V.I.Eliseenko, N.V. Stankova
Experimental assessment of efficiency of modes of an ablyation impulses of CO² lasers of various duration of integuments of mini-pigs for a laser dermabraziya90

M.V. Kovina, L. Zilberman, Yu.M. Hodarovich
Studying of a embryonic stem cells differentiation at a long cocultivation with adipocits 107

A.I. Lebedeva, S.A. Muslimov, L.A. Musina
Experimental modeling of the chronic inflammation process and fibrosis 114

A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, N.V. Kasinskaya, O.I. Stepanova, O.V. Baranova, A.G. Kiselyov
Modeling of medicinal toxic hepatitis on rats 124

E.B. Shustov, G.D. Kapanadze, V.N. Karkishchenko, A.O. Revyakin, N.V. Stankova, A.E. Kim
Parameters of cardio activity according to ECG mini-pigs in a stress-induced tachycardia conditions 126

BIOMEDICAL METHODS

O.I. Stepanova, Kh.Kh. Semenov, A.O. Revyakin, N.V. Kasinskaya, O.V. Baranova
Cultivation as way of identification and realization of biological and therapeutic effects stromal fractions of stem and progenitor cells of marrow 134

M.I. Strigina, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina
The study of errors photoplethysmogram data for the analysis of the heart rate variability by the R.M. Baevsky method 139

E.B. Shustov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov
Analysis of individual tolerance parameters of laboratory animals to hypoxia in biological modeling neuroprotective and antihypoxant action of medicines 149

LABORATORY ANIMALS

L.A. Bolotskikh, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, N.V. Kasinskaya, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, E.L. Matveenko
Breeding of SPF-status laboratory animals as basis of experimental medicine 158

D.B. Chayvanov, N.V. Stankova
The analysis of restrictions of modeling on animals of physical methods of modulation and diagnostics of a functional condition of nervous system of the person for the purpose of a choice of an animal model 164

CLINICAL RESEARCHES

E.V. Shikh, A.A. Makhova
Experimental justification of P450 3A4 activity regulation possibility by a taurine for the purpose of pharmacotherapy optimization by antibiotics macrolides 169



Сравнительное исследование токсических свойств комплекса оксованадия и его металлохелатного лиганда

Н.М. Воробьева¹, Е. В. Федорова¹, А.В. Бурякина¹, Е.К. Вишневская¹,
Т.В. Горбачева², А.Е. Аладышкина²

¹ – ГОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия,

² – Судебно-химическое отделение государственного учреждения здравоохранения
“Бюро судебно-медицинской экспертизы, Санкт-Петербург

Контактная информация: Федорова Елена Викторовна,
elena.fedorova@pharminnotech.com.

Ключевые слова: средняя полудетальная доза, коэффициент кумуляции, ванадил сульфат.

Цель работы состояла в сравнительном изучении острой токсичности, кумулятивной активности нового органического комплекса оксованадия бис{трет-бутил[амино(имино)метил]карбамато}оксидованадия (IV) (БАМК) и его лиганда трет-бутоксикарбонилгуанидином (БКГ) и оценке их влияния на морфологию внутренних органов по сравнению с ванадил сульфатом.

Величина ЛД₅₀ для БАМК составила 178 мг/кг, для БКГ – 1003 мг/кг и для ванадил сульфата – 407 мг/кг. Согласно градации Hodge и Sterner БАМК и

БКГ можно отнести к веществам с умеренной токсичностью, а БКГ – к малотоксичным соединениям.

В результате исследования кумуляции было показано, что БАМК и ванадил сульфат обладают высокой кумулятивной активностью, а БКГ не кумулирует в органах животных.

Введение

В настоящее время установлено, что ванадий и его органические комплексы обладают гипогликемической активностью [5, 13, 15]. Однако, несмотря на имеющиеся сведения о том, что приме-

нение биологически активных добавок к пище (Редуцил, Глюкобаланс, Витатрим Про, Глюкоз метаболизм саппорт и др.), содержащих ванадил сульфат, улучшает показатели углеводного и липидного обмена у больных сахарным диабетом [11], информация относительно его токсикологических свойств ограничена. В связи с этим изучение возможных повреждающих эффектов ванадия и его соединений как потенциальных лекарственных средств представляется актуальной задачей.

На кафедре неорганической химии СПХФА был получен новый ванадий-содержащий органический комплекс, бис {*трет*-бутил[амино(имино)метил]карбамато}оксидованадий (IV) (БАМК) с координационным окружением $VO(N_2O_2)$. Синтезированный комплекс оказался более эффективным гипогликемическим агентом как по сравнению с ванадил сульфатом, так и с комплексобразующим лигандом, *трет*-бутоксикарбонилгуанидином (БКГ) [2]. Выбор этого соединения в качестве лиганда был обусловлен тем, что оно относится к бигуанидинам, производные которых широко используются в качестве пероральных противодиабетических средств.

Цель

Изучить острую токсичность, кумулятивные свойства и оценить влияние на морфологию внутренних органов БАМК и БКГ по сравнению с ванадил сульфатом.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 75 беспородных белых половозрелых мышам-самцах массой тела 18-20 г, полученных

из питомника лабораторных животных РАМН “Рапполово” Ленинградской области. При проведении опытов животных содержали в стандартных условиях вивария.

Оксованадиевый комплекс бис {*трет*-бутил[амино(имино)метил]карбамато}оксидованадий (IV) с координационным окружением $VO(N_2O_2)$ (рис. 1, б) получали при взаимодействии ванадил сульфата с *трет*-бутоксикарбонилгуанидином (рис. 1, а) в молярном соотношении ванадил сульфат: лиганд, равном 1 : 2,2. Поставщик лиганда – ЗАО «Вектон» (Россия).

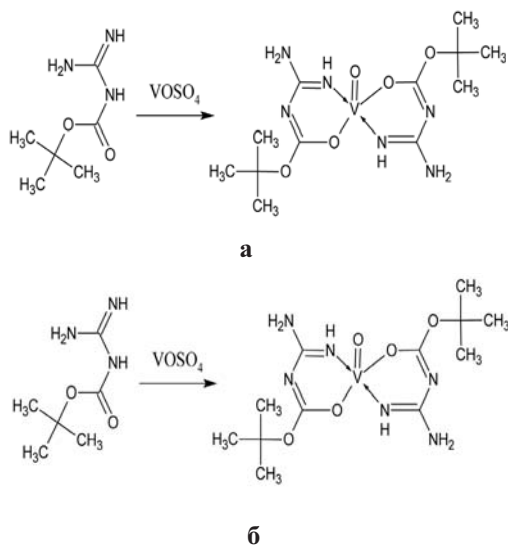


Рис. 1. Химическая структура лиганда (а) и оксованадиевого комплекса (б) с координационным окружением $VO(N_2O_2)$.

Исследование острой токсичности проводили экспресс-методом Прозоровского [4]. Соединения вводили однократно перорально в виде водного раствора металлическим зондом с оливой на конце. Для вычисления LD_{50} ис-

пользовали соотношение погибших и выживших особей в группах животных, получавших соединения в последовательных нарастающих с логарифмическим шагом дозах.

Для исследования кумуляции использовали метод Lim et al [12]. Соединения вводили перорально в виде водного раствора. В эксперименте для каждого из них были использованы группы по 10 животных. Мыши контрольной группы получали воду (ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82) в эквивалентных объемах. В каждом опыте учитывали гибель животных при ежедневном введении вещества в дозах, нарастающих каждые 4 дня. Начальная доза составляла 0,1 ЛД₅₀, каждая последующая превышала предыдущую в полтора раза. В соответствии с методикой рекомендованная максимальная продолжительность эксперимента составляет 28 дней, однако возможно его прекращение при достижении показателя гибели животных $\geq 50\%$. Расчет коэффициента кумуляции (K_k) проводили по следующей формуле:

$$K_k = \text{ЛД}_{50(n)} / \text{ЛД}_{50(1)},$$

где ЛД_{50(n)} – полулетальная доза при максимальной для данного вещества кратности введения; ЛД₅₀₍₁₎ – полулетальная доза данного вещества при однократном введении.

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента. Различия определяли при 0,05% уровне достоверности.

Оставшихся в живых животных умертвляли путем дислокации шейных позвонков. Внутренние органы подвергали визуальному осмотру, измеряли массовые коэффициенты (мг/100

г) и забирали образцы для патоморфологического и гистологического исследования, а также эмиссионного спектрального анализа. Материал для гистологических исследований готовили общепринятыми методами [1]. Морфологические изменения органов оценивали с помощью микроскопа «Биолам» (ЛОМО, Россия).

Для качественного определения ванадия в печени, почках и семенниках, их замораживали и использовали метод эмиссионного спектрального анализа. Пробоподготовку проводили согласно методологическим указаниям [3]. В эксперименте использовали следующие группы: группа 1 – интактные животные; группа 2 – животные, получавшие ванадил сульфат; группа 3 – животные, получавшие БАМК. В связи с малым количеством биологического материала для проведения этого анализа объединяли одноименные органы от мышей из группы 1, от мышей из группы 2 и от мышей из группы 3. Органы помещали в фарфоровые тигли, взвешивали на аналитических весах ВЛР-200 и высушивали до постоянной массы, после чего добавляли угольный порошок марки ОСЧ-7-4 пропорционально массе сухих остатков, дважды минерализовали в концентрированной азотной кислоте марки 18-4 ОСЧ с выпариванием до сухого остатка. Далее их озоляли в муфельной печи ПМ-8 и перетирали в тиглях до мелкодисперсного состояния. Спектры снимали в угольных электродах в дуге переменного тока (генератор ИВС Prima AADC) с использованием кварцевого спектрографа ИСП-30 с фотоэлектронной кассетой «Морс». Расшифровка спектрограмм проводилась с помощью программы «SR 303_USB».

Результаты и их обсуждение

Первым этапом эксперимента было определение острой токсичности исследуемых соединений. Было подсчитано, что величина ЛД₅₀ для БАМК составила 178 (160-200) мг/кг, что оказалось на порядок ниже аналогичной рассчитанной величины для БКГ, равной **1003 (910-1170) мг/кг**. Несмотря на то, что полученный комплекс оказался более токсичным по показателю ЛД₅₀, чем ванадил сульфат, для которого подсчитанная ранее величина ЛД₅₀ составила 407 (310-540) мг/кг, **в соответствии с градацией Hodge и Sterner [10]** оба соединения относятся к одному классу – к веществам с умеренной токсичностью. Согласно этой классификации БКГ представляет собой малотоксичное соединение.

При исследовании кумуляции гибель животных, которые получали БАМК, начиналась с третьих суток. У животных, получавших исследуемые соединения, наблюдались такие признаки интоксикации, как ограничение подвижности, тремор, судороги конечностей, выделения из носовых пазух. Следует отметить, что при введении БАМК эти признаки возникали в более ранние сроки от начала введения, чем у животных, которые получали БКГ. Это свидетельствует о том, что токсические эффекты БАМК проявляются при меньших дозах по сравнению с лигандом.

Больше 50% животных этой группы погибли на третьи-четвертые сутки: 10% – на третьи и 50 % – на четвертые. На основании этих данных коэффициент кумуляции для БАМК составил:

$$K_k = \text{ЛД}_{50(n)} / \text{ЛД}_{50(1)} = 17,8 \times 4 / 178 = 0,4.$$

Полученное значение оказалось < 1, что свидетельствует о наличии у него

высокой кумулятивной активности. Рассчитанный нами ранее K_k для ванадил сульфата составил 0,4, и, таким образом, по способности к кумуляции эти соединения не отличаются друг от друга.

При изучении кумуляции БКГ гибель мышей начиналась с четвертых суток, после чего больше половины животных умерло в течение 18 суток. Коэффициент кумуляции для этого соединения составил:

$$K_k = 100,3 \times 4 + 150,5 \times 4 + 220,7 \times 4 + 341,02 \times 4 + 501,5 \times 2 / 1003 = 4,24.$$

K_k для БКГ оказался > 1, таким образом, у него отсутствует кумулятивная активность.

При патоморфологическом исследовании изменений внешнего вида органов выживших животных не наблюдалось, однако массовые коэффициенты тимуса и селезенки мышей, получавших БАМК, были достоверно ниже соответствующих показателей животных контрольной группы, что косвенно свидетельствует о токсическом влиянии ванадийсодержащего комплекса на функции иммунной системы. При введении БКГ у животных наблюдали статистически значимое увеличение массовых коэффициентов почек по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы.

По результатам гистологических исследований тимуса, селезенки и почек мышей, получавших БАМК, и в соответствующих органах животных, которым вводили БКГ, морфологических изменений обнаружено не было. В печени животных обеих опытных групп выявлялись признаки диффузной дистрофии гепатоцитов, очаги лимфоцитарной инфильтрации и некрозы (рис. 2 в, г), однако они были незначительными.

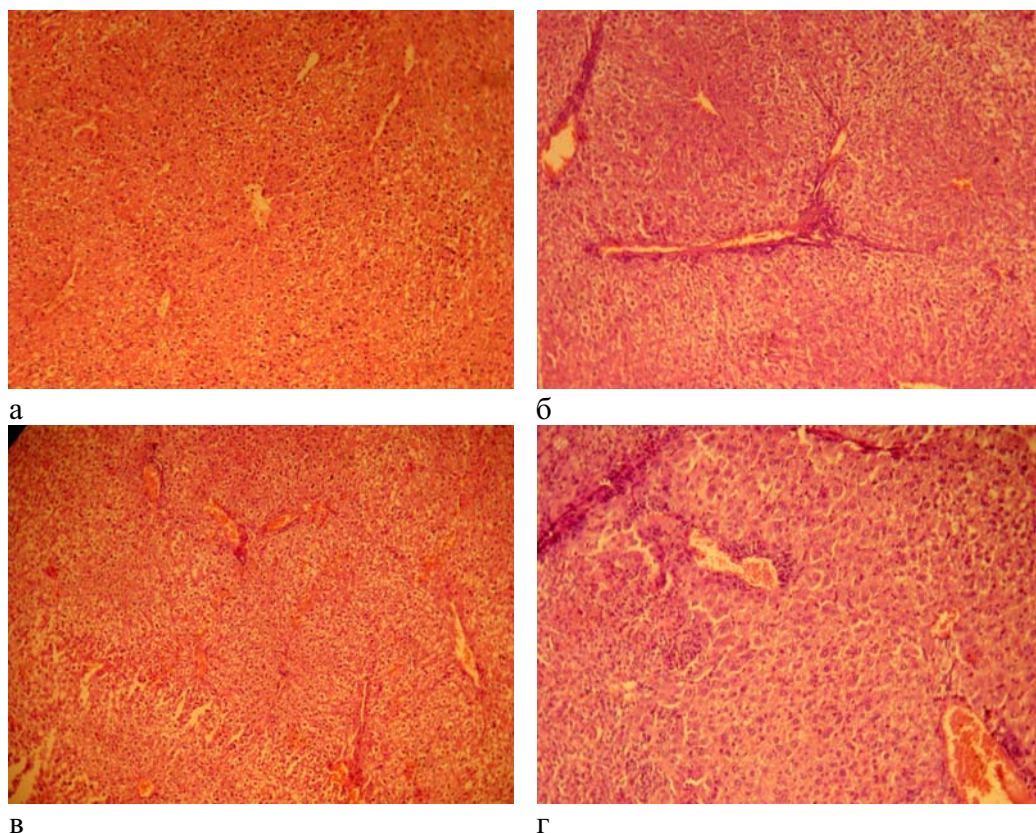


Рис. 2. Гистологическая картина печени животных: а – контроль; б – ванадила сульфат; в – БАМК; г – БКГ.

Наиболее выраженные изменения структуры тканей были обнаружены в семенниках – у мышей, которые получали эти соединения, наблюдали отек и расширение просвета семенных канальцев, а также наличие незрелых элементов сперматогенеза (рис. 3, в, г). Все морфологические изменения, которые отмечали в печени и семенниках у животных обеих опытных групп были выражены в равной степени.

Полученные нами данные свидетельствуют о ярко выраженной способности оксованадиевого комплекса и его лиганда, в отличие от ванадила сульфата, подавлять репродуктивную функцию у мышей при длительном введении в логариф-

мически нарастающих дозах. Влияние БАМК на процессы сперматогенеза, которое обнаружено в наших экспериментах, согласуется с литературными данными для других органических соединений ванадия. Показано, что бидентантные металлоорганические комплексы ванадия IV, содержащие в качестве лигандов 1, 10- фенантролин, 2,2'-бипиридил или 5'-бromo-2'-гидроксиацетофенон и их производные, в экспериментах *in vitro* в концентрациях от 5,5 до 118 мкмоль/л снижали подвижность сперматозоидов человека и проявляли спермицидную активность [16]. Работы, посвященные изучению спермицидной активности ор-

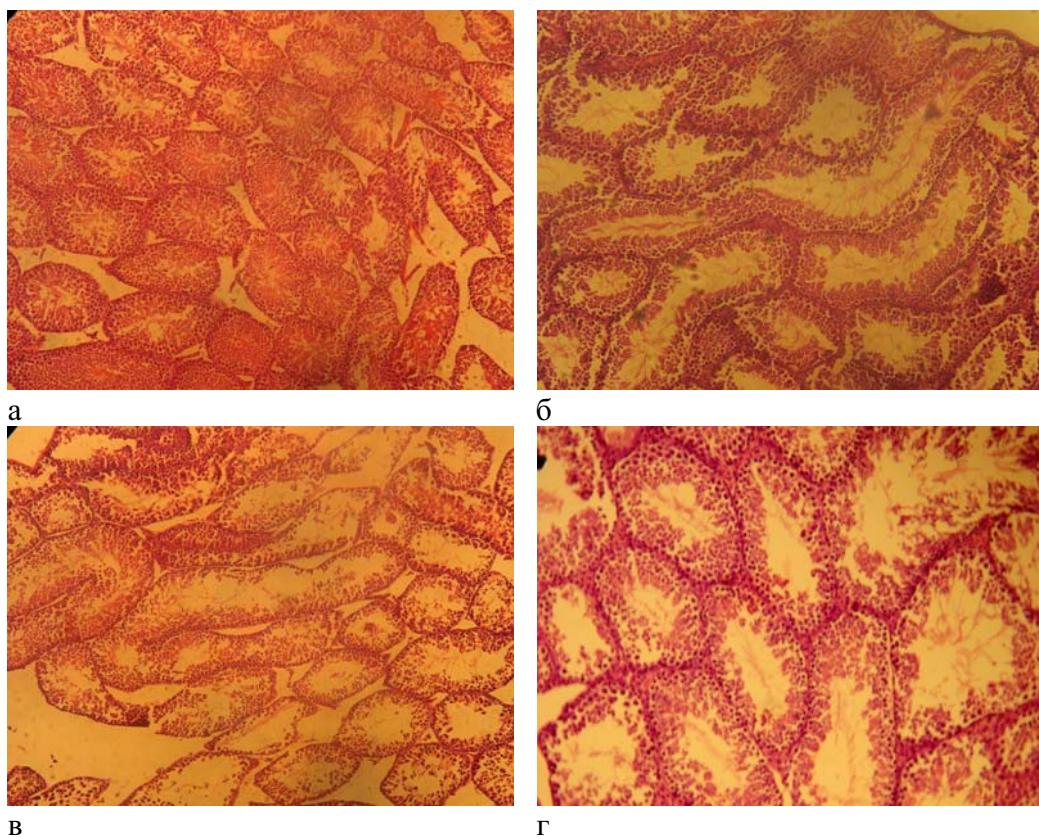


Рис. 3. Гистологическая картина семенников животных: а – контроль; б – ванадила сульфат; в – БАМК; г – БКГ.

ганических комплексов ванадия *in vivo*, в современной литературе отсутствуют. Патологические изменения, которые выявлялись на препаратах семенников мышей, получавших БКГ, но не были обнаружены на срезах соответствующих органов мышей, получавших ванадил сульфат, могут означать, что спермицидное действие БАМК обусловлено его лигандом, но не самим комплексом. Представленные выше данные относительно различного токсического действия комплекса оксованадия и ванадил сульфата требуют проведения дальнейших исследований.

При качественном определении присутствия ванадия во внутренних орга-

нах мышей методом эмиссионного спектрального анализа спектральные линии ванадия были идентифицированы только в зольных остатках печени животных, получавших ванадил сульфат и мышей, получавших БАМК (группы 2 и 3), в отличие от зольных остатков печени контрольных мышей (группа 1) рис. 4. Полученные результаты подтверждают наибольшую вероятность кумуляции и БАМК и ванадил сульфата в печени. В зольных остатках семенников и почек мышей всех используемых групп (как контрольной группы 1, так и опытных групп 2 и 3) спектральные линии этого элемента не были обнаружены.

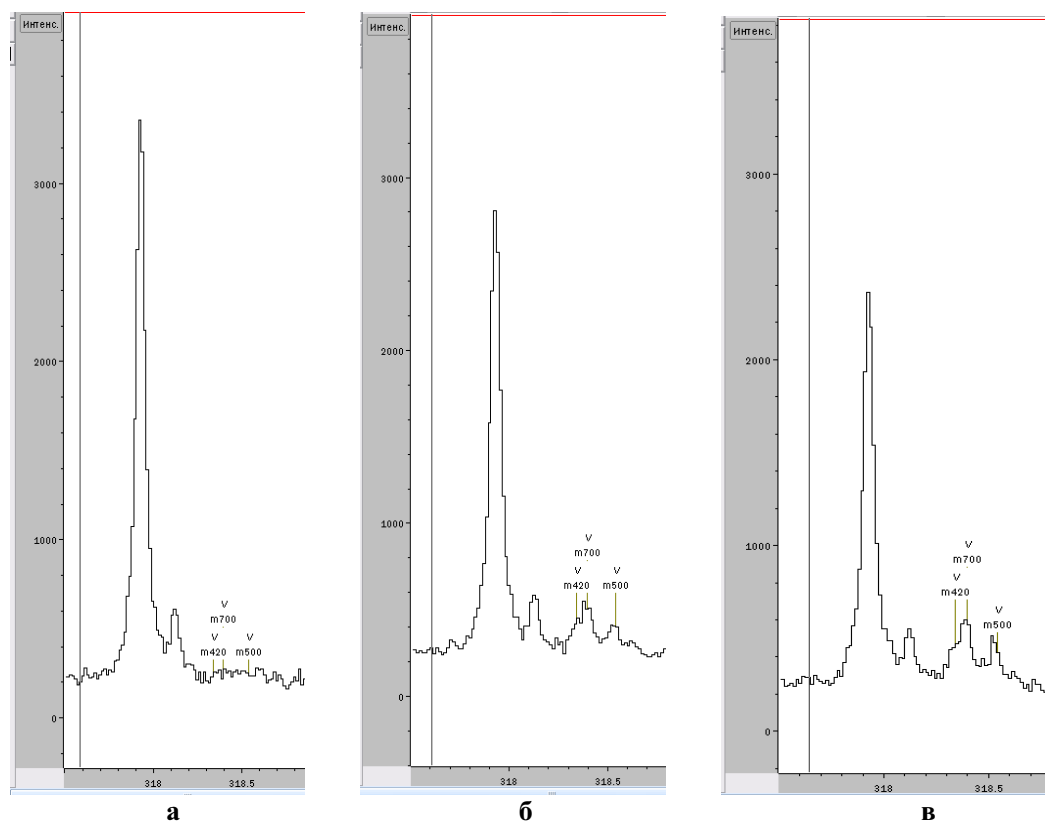


Рис. 4. Эмиссионные спектры зольных остатков печени животных: а – контроль; б – ванадила сульфат; в – БАМК.

По литературным данным [9], у крыс в норме самое большое количество ванадия находится в костях и зубах, которые являются метаболическими депо этого элемента, а меньшие концентрации – в семенниках, печени и почках. Согласно результатам атомной абсорбционной спектроскопии [7] при введении крысам ванадил сульфата в питьевой воде в концентрациях 0,5-1,5 мг/мл (100-300 мг/кг в день) в течение года содержание ванадия в органах убывало в следующем порядке: кости > почки > семенники > печень. Тем не менее, несмотря на кумуляцию, ванадил сульфат не оказывал существенного влияния на морфологию и массу внутренних органов этих животных.

По результатам атомной абсорбционной спектроскопии у человека в норме наибольшая концентрация ванадия, поступающего с пищей, содержится в печени, где она составляет 4,5-19 мкг/кг. Содержание ванадия в почках – 3-7 мкг/кг [6].

Полученные нами данные не противоречат литературным, приводимым выше, так как спектральные линии ванадия были установлены только в печени мышей, получавших ванадил сульфат и БАМК. В нашем эксперименте не удалось обнаружить ванадий в семенниках и почках, так как эти органы имеют значительно меньшую массу по сравнению с печенью и меньшую способность к накоплению ванадия, поэтому чувстви-

тельности используемого метода в данном случае, видимо, недостаточно для его обнаружения.

Результаты токсикологических исследований показали, что при пероральном приеме ванадий и его неорганические соли вызывают ряд сходных побочных эффектов у людей и животных. Так, у добровольцев, которые принимали ванадил тартрат в дозе 0,47–1,3 мг/кг в капсулах в течение 45–68 дней отмечали расстройство желудочно-кишечного тракта, но изменений лейкоцитарной формулы, липидного профиля, содержания гемоглобина, альбумина, остаточного азота и мочевины в крови на протяжении всего эксперимента отмечено не было [8]. В работе других авторов при введении крысам метаванадата натрия в питьевой воде в концентрациях 23–29 мг/кг в течение 2, 4 и 8 недель наблюдали сходные побочные эффекты: диарею, потерю массы тела, ограничение потребления воды и пищи. Однако, в отличие от людей, у животных выявляли изменения некоторых гематологических показателей – происходило снижение гематокрита и концентрации гемоглобина, увеличение количества ретикулоцитов и полихроматофильных эритроцитов периферической крови, что свидетельствует об общем угнетении эритропоэза [17].

Известно, что токсичность и эффективность соединений ванадия меняются в зависимости от степени его окисления и лиганда, с которым он связан в комплексе. Так, наиболее выраженным цитотоксическим действием в культуре фибробластов мыши линии SV 3T3 обладают соединения ванадия (IV) с координационным окружением $VO(S_4)$, $VO(S_2N_2)$, $VO(S_2O_2)$ [18]. Токсикологиче-

ские свойства комплексов ванадия с координационным окружением $VO(N_2O_2)$, к которым относится изучаемый нами комплекс, мало исследованы. В ряде экспериментов на клеточной линии Сасо-2 изучали цитотоксичность трех комплексов ванадия III, IV и V с дипиколинатами с таким же координационным окружением [14]. Результаты показали, что, несмотря на различную степень проникновения и кумуляции в клетках, все три комплекса имеют одинаковую цитотоксичность. В то же время работы, посвященные их токсическим эффектам *in vivo*, практически отсутствуют.

Результаты изучения острой токсичности, кумулятивной активности и влияния БАМК на морфологию внутренних органов свидетельствуют, что синтезированный нами органический комплекс БАМК и ванадил сульфат обладают сходными токсикологическими характеристиками.

Выводы

Ванадил сульфат и новый оксованадиевый комплекс имеют сходные токсические свойства: относятся к веществам с умеренной токсичностью и обладают высокой кумулятивной активностью;

Все исследуемые соединения оказывают выраженное влияние на морфологию семенников, однако БАМК и БКГ, в отличие от ванадила сульфата, вызывают патологические изменения в их ткани, о чем свидетельствует наличие незрелых элементов сперматогенеза.

На основании полученных данных можно предположить, что патологические изменения семенников, вызванные БАМК, обусловлены введением в комплекс лиганда, обладающего спермицидной активностью.

Список литературы

1. **Волкова О.В., Елецкий Ю.К.** Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. 1971. 271 с.
2. **Воробьева Н.М., Федорова Е.В., Шкляренко А.А.** Сравнительное исследование биологической активности комплекса оксованадия и его лиганда // В кн.: материалы 67-й открытой школы-конференции молодых ученых и студентов с международным участием "Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины". Волгоград. 2009. 202 с.
3. **Назаров Г.Н., Макаренко Т.Ф.** Методы спектрального анализа в судебной медицине. – М.: МНПП «ЭСИ». 1994. 360 с.
4. **Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М.** Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакол. и Токсикол. 1978. №4. С. 497-502.
5. **Badmaev V., Prakash S., Majeed M.A.** Vanadium. Review of its Potential Role in the Fight Against Diabetes // The Journal of Alternative and Complementary Medicine. 1999. Т. 5. С. 273-291.
6. **Barceloux D.G.** Vanadium. // Clinical Toxicology. 1999. Т.37. № 2. С. 265-278.
7. **Dai S., Thompson K.H., Vera E., McNeill J.H.** Toxicity studies on one-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with vanadyl sulphate // Pharmacol. and Toxicol. 1994. Т. 75. С. 265-273.
8. **Dimond et al.**, Vanadium. Excretion, toxicity, lipid effect in man // Am. J. Clin. Nutr. 1963. Т. 12. С. 49-53.
9. **Edel J., Sabbioni E.** Vanadium transport across placenta and milk of rats to the foetus and newborn // Biological Trace Element Research. 1989. Т. 22. С. 265-275.
10. **Hodge H. C., Sterner J. H.** Tabulation of toxicity classes // Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 1949. Т. 10. С. 93-96.
11. <http://shp.by.ru/health/bad/altera/products>.
12. **Lim R. K., Rink G., Glass H. G., Soaje-Echague E.** A method of the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and sub chronic median effective dose. // Arch. Int. Pharmacodyn. 1961. Т. CXXX. № 3-4. С. 336-353.
13. **Poucheret P., Verma S., Grynaps M.D., McNeill J.H.** Vanadium and diabetes // Molecular and Cellular Biochemistry. 1998. Т. 188. С. 73-80.
14. **Rehder D.** In vitro study of the insulin-mimetic behaviour of vanadium (IV, V) coordination compounds // J. Biol. Inorg. Chem. 2002. Т. 7. С. 384-96.
15. **Srivastava A.** Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds // Molecular and Cellular Biochemistry. 2000. Т. 206. С. 177-182.
16. <http://www.patents.com/us-6245808.html>.
17. **Zaporowska H., Wasilewski W.** Some selected peripheral blood and haemopoietic system indices in Wistar rats with chronic vanadium intoxication // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1989. Т. 75. № 2. С. 83-90.
18. **Zhang Y., et al.** The permeability and cytotoxicity of insulin-mimetic vanadium (III,IV,V)-dipicolinate complexes // J. Inorg. Biochem. 2006.Т. 100. с. 80.

A comparative study of toxicological properties of a oxovanadium (IV) complex and his metallohelat ligand

N.M. Vorobyeva, E.V. Fedorova, A.V. Buryakina, E.K. Vishnevskaya,
T.V. Gorbacheva, A.E. Aladyshkina

The purpose of the work has consisted in comparative studying acute toxicity, cumulative activity of a new organic oxovanadium (IV) complex *bis*{*tret*-butyl[amino(imino)methyl]carbamoto}oxydovanadium (IV) (BAMK) and his ligand *tret*-butoxycarbonylguanidine (BKG) and to the estimation of their influence on morphology of internals in comparison with vanadyl sulfate.

Values of LD₅₀ for the BAMK, BKG and vanadyl sulfate has averaged 178 mg / kg, 1003 mg / kg and 407 mg / kg correspondingly. According to the scale of Hodge and Sterner it is possible to attribute BAMK and BKG as the compounds with moderately toxic substances, and BKG – as compound with low toxicity. Because of research cumulation activity it has been shown, those BAMK and vanadyl sulfate have high cumulative activity, and BKG does not cumulate in internals of animals.

Key words: medium lethal dose, rate of cumulation, vanadyl sulfate.

Влияние колебаний содержания металлов в крови на их содержание в тканях лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении металлохелатов

А.О. Ревякин¹, Н.Н. Каркищенко¹, Е.Б. Шустов¹, В.Н. Каркищенко¹,
Д.А. Ксенофонов²

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

² – ФГБОУ ВПО РГАУ – МСХА имени К.А.Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, scbmt@yandex.ru

Методом атомно-абсорбционной спектрометрии изучено содержание кальция, магния, железа, меди, марганца и цинка в тканях лабораторных животных при уровнях пищевого потребления, составляющих 100, 120 и 140% от суточной потребности. Выявлены статистические закономерности их распределения в тканях в зависимости от уровня содержания металлов в крови.

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

Данная статья является продолжением анализа данных, полученных при исследовании особенностей распределения металлов в тканях лабораторных животных при их нормальном и избыточном пищевом потреблении, и опубликованных нами ранее [2].

Схема проведения экспериментальной работы

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, поступивших из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Карантин, содержание животных, осмотры и рандомизация, введение препаратов и эвтаназия осуществлялись в соответствии с утвержденными СОП (Стандартные операционные процедуры) организации. В качестве корма животным использовался стандартный экструдированный гранулированный полнорацционный комбикорм для лабораторных животных ПК-120, произведенный в соответствии с ГОСТ Р 51849-2001 Р.5.

Кормление животных осуществлялось в свободном режиме исходя из суточных нормативов. Водопроводная очищенная вода давалась всем животным *ad libitum* в стандартных поилках.

Полнорационный комбикорм в суточной дозе (из расчета на одну крысу массой 250 г) содержал 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, внутривентрикулярно в объеме 0,1 мл водного раствора, на протяжении 28 дней.

Животные выводились из эксперимента методом декапитации с отбором крови и тканей. Ткани высушивались в сушильном шкафу при температуре +105 °С до достижения постоянной сухой массы, затем озолялись в муфельной печи при температуре +850 °С. Навески золы растворяли в 30% химически чистой соляной кислоте и определяли содержание металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии (прибор «Спектр 5-4», производство ОАО «Союзцветметавтоматика», Россия, номер Государственного реестра средств измерений 13743-04). Полученные количественные результаты измерений из золевых навесок пересчитывались в содержание металлов в тканях (мг / 100 г ткани).

Исследуемые металлохелатные комплексы были получены путем совместной инкубации при комнатной темпера-

туре и pH=7,1 - 7,2 водных растворов солей металлов с низкомолекулярной фракцией (< 10 кДа) ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока [1]. Полученные 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 крови), печень, кости (включая костный мозг), волосы, мышцы, кишечник (включая кишечное содержимое).

Содержание металлов в крови (мг/100 г ткани) животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении имеет следующие статистические характеристики (табл.1).

При анализе таблицы обращает на себя внимание, что только распределение значений меди может быть охарактеризовано как соответствующее критериям нормального распределения (близкие значения моды, медианы и среднего по выборке, минимальные значения эксцесса и асимметричности). Следовательно, на концентрацию меди в крови животных не оказывал влияние никакой из внешних факторов. Статистические параметры значений содержания железа, марганца и магния в крови характеризуются асимметричностью с превалированием зоны высоких значений, что может отражать влияние на содержание этих ионов какого-либо одного внешнего фактора, например, избыточность их поступления в организм с пищей. Статистические параметры значений содержания кальция и цинка в крови не могут быть приведены к нормальному распределению, и, следовательно, находятся под сильным влиянием нескольких внешних факторов.

Таблица 1

Содержание металлов в крови (мг/100 г ткани) животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении

Статистический параметр	Ca	Cu	Mn	Fe	Mg	Zn
Среднее	3,6914	0,857963	0,093917	228,2269	1,819633	2,424767
Стандартная ошибка	0,135	0,045167	0,011326	17,06994	0,040148	0,101818
Медиана	3,8365	0,8428	0,069	207,4905	1,783	2,2385
Мода	4,1	0,83	0,04	160	1,594	2,161
Стандартное отклонение	0,739425	0,247391	0,062037	93,49589	0,2199	0,557679
Дисперсия выборки	0,54675	0,061202	0,003849	8741,481	0,048356	0,311006
Экссесс	-0,41035	0,259695	0,76253	1,228308	0,860984	5,283579
Асимметричность	-0,10138	0,26055	1,230637	0,984952	0,918417	2,288396
Интервал	3,035	1,029	0,2289	428,652	0,903	2,403
Минимум	2,369	0,36	0,0262	69,888	1,49	1,873
Максимум	5,404	1,389	0,2551	498,54	2,393	4,276
Коэффициент вариации.	0,148114	0,071335	0,040979	0,409662	0,120848	0,229993
Счет	30	30	30	30	30	30

По широте размаха колебаний и коэффициенту вариации анализируемые металлы могут быть разделены на три группы: с высокой вариативностью (железо), умеренной вариативностью (цинк, кальций, магний) и низкой вариативностью (медь, марганец) показателей содержания в крови. Следовательно, именно эти два металла (медь, марганец) должны иметь самые жесткие гомеостатические механизмы регулирования их содержания в крови. Высокая вариативность содержания железа в крови может быть связана с разной степенью насыщения металлом эритроцитарных и плазменных депо. Умеренная вариативность показателей содержания в крови цинка, кальция и магния, вероятно, связана с частичной разбалансированностью механизмов всасывания и выведения, распределения по тканям и тканевого депонирования, возникшего при избыточном пищевом потреблении этих металлов.

Кальций

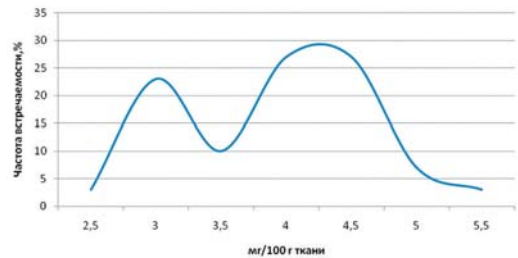


Рис. 1. Частотная кривая распределения значений уровня кальция в крови.

Кривая частотного распределения содержания кальция в крови животных представляет собой наложение двух кривых нормального распределения – одна из них находится в зоне низких значений (вершина – 3 мг/100 г тканей), вторая – в зоне средних значений (максимум в зоне 4,25 мг/100 г тканей). Наличие дополнительного пика в области низких значений может отражать относительную недостаточность у от-

дельных животных содержания этого металла в стандартном корме. Исходя из особенностей распределения частот встречаемости значений содержания кальция в крови животных, они могут быть распределены в три группы:

с низким значением кальция в крови (менее 3,5 мг/100 г ткани),

со средними значениями (от 3,5 до 4,5 мг/100 г ткани)

и с высокими значениями (более 4,5 мг/100 г ткани).

В соответствии с границами разделения по фактору «Уровень кальция в крови» выполнен дисперсионный анализ значений содержания кальция в тканях животных (табл. 2).

Анализ таблицы 2 позволяет сделать вывод, что содержание кальция в **печени** и **мышцах** не зависит от уровня кальция в крови, в **костях** и (в несколько меньшей степени) **волосах** – определяется уровнем кальция в крови. Динамика центроидов распределения значений кальция в **кишечнике** по подгруппам с низким, средним и высоким содержанием кальция в крови, позволяет предположить, что уровень кальция в крови во

многом определяется всасыванием его в кишечнике, так как максимальному уровню металла в крови соответствует минимальное его содержание в кишечнике, и наоборот, минимальному значению кальция в крови соответствует максимальное значение его содержания в кишечнике.

В связи с этим был выполнен дисперсионный анализ влияния фактора «Содержание кальция в кишечнике» на уровень кальция в крови животных.

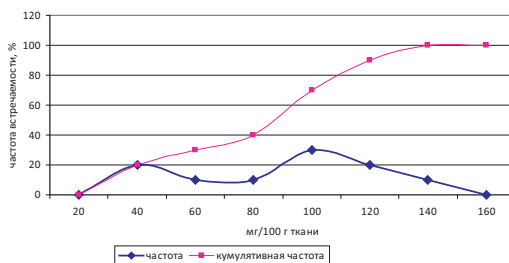


Рис. 2. Кривая распределения значений кальция в кишечнике.

На рис. 2 мы видим двухгорбую кривую, представляющую собой наложение двух кривых нормального распределения. Первый пик находится в зоне низкого содержания кальция в кишечнике

Таблица 2

Влияние уровня кальция в крови животных на его содержание в тканях

Металл	Ткань	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания кальция в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Кальций	Кровь	2,82	3,97	4,73	0,83	$4 \cdot 10^{-11}$
	Печень	2,51	2,53	2,41	0,005	0,93
	Кость	1449	1724	1805	0,59	$7 \cdot 10^{-6}$
	Волосы	3,58	5,16	6,10	0,41	0,0009
	Мышцы	17,13	14,52	15,38	0,07	0,38
	Кишечник	111,3	71,6	48,9	0,48	0,0002

(40 мг/100 г ткани), и вероятно, характеризует субгруппу животных с высокой скоростью всасывания кальция. Второй пик находится в области более высоких значений содержания кальция в кишечнике (100 мг/100 г ткани), и вероятно, характеризует животных с замедленным усвоением кальция, в том числе – за счет образования менее растворимых комплексов кальция с другими металлохелатами.

Исходя из особенностей кривых частотного распределения (в том числе – кумулятивной кривой), границами диапазонов низкого, среднего и высокого значений содержания кальция в кишечнике были определены 60 и 110 мг/100 г ткани.

Животные были перегруппированы в соответствии с уровнем содержания кальция в кишечнике на 3 подгруппы: с низким содержанием кальция (до 60 мг/100 г ткани, подгруппа Н), средним уровнем содержания кальция в кишечнике (от 61 до 110 мг/100 г ткани, подгруппа С) и высоким содержанием кальция в кишечнике (более

110 мг/100 г ткани, подгруппа В.). Дисперсионному анализу подвергались данные о содержании кальция в крови животного.

Анализ динамики центроидов распределения значений содержания кальция в крови показывает, что подгруппе с низким содержанием кальция в кишечнике на фоне его полноценного пищевого потребления (то есть при его максимальном всасывании) соответствует самое высокое значение содержания кальция в крови, и наоборот, подгруппе с высоким содержанием кальция в кишечнике (то есть при его минимальном всасывании) соответствует самое низкое содержание кальция в крови. Таким образом, наша гипотеза о влиянии всасывания кальция в кишечнике на его содержание в крови была подтверждена с высокой степенью статистической значимости ($p < 0.0003$, коэффициент детерминации модели 0,45 – то есть 45% всей вариации значений содержания кальция в крови животных может быть объяснено за счет разного уровня его всасывания в кишечнике).

Однофакторный дисперсионный анализ
ИТОГИ

Группы	Счет	Сумма	Центроиды	Дисперсия
Н	9	39,073	4,341444	0,219645
С	12	43,939	3,661583	0,401399
В	9	27,73	3,081111	0,314679

Дисперсионный анализ

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	7,165761	2	3,582881	11,13211	0,000298	3,354131
Внутри групп	8,689976	27	0,321851			
Итого	15,85574	29				

Медь

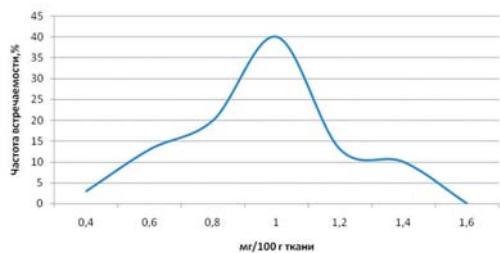


Рис. 3. Частотная кривая распределений значений уровня меди в крови.

Исходя из особенностей кривой частотного распределения значений содержания меди в крови, можно определить границы групп следующим образом: низкое содержание (до 0,6 мг/100 г ткани включительно), среднее содержание (от 0,61 до 1,10 мг/100 г ткани) и высокое содержание (более 1,10 мг/100 г ткани).

Анализ таблицы 3 показывает, содержание меди **в печени** определяется содержанием этого металла в крови. В то же время, закономерности, определяющие депонирование меди **в костях**

имеют более сложный характер. Так, низкому уровню меди в крови соответствует самое высокое значение центроида распределения этого металла в подгруппах, в то время как животным со средним уровнем содержания меди в крови соответствует самое низкое значение центроидов распределения этого микроэлемента в костях. То есть, можно предположить, что более низкий уровень меди в крови может быть связан с избыточностью его депонирования в костях и нарушением работы механизмов обмена металла между костной тканью и кровью. При повышении уровня меди в крови выше среднего диапазона значений, избыток металла начинает депонироваться в костной ткани (динамика центроидов при этом возрастает). Такая же реакция на превышение среднего диапазона содержания меди в крови характерна и для **мышечной ткани** — она начинает более интенсивно депонировать медь. Содержание меди в **волосах** животных при нормальном и избыточном его пищевом потреблении не зависит от содержания металла в крови.

Таблица 3
Влияние уровня меди в крови животных на его содержание в тканях

Металл	Ткань	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания меди в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Медь	Кровь	0,49	0,85	1,26	0,84	$2 \cdot 10^{-11}$
	Печень	1,09	1,48	1,98	0,27	0,015
	Кость	1,56	1,22	1,44	0,24	0,03
	Волосы	1,49	1,35	1,32	0,03	0,70
	Мышцы	0,39	0,37	0,45	0,17	0,08
	Кишечник	1,10	1,44	1,08	0,14	0,13

Марганец

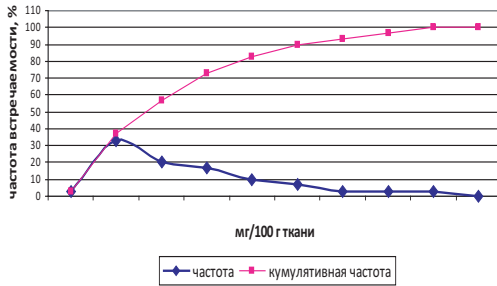


Рис. 4. Частотная кривая распределений значений содержания марганца в крови.

Частотная кривая распределения значений содержания марганца в крови имеет вид, далекий от нормального распределения (рис. 4). Во первых, частотный максимум смещен в области низких значений. Во вторых, нисходящая ветвь распределения существенно растянута в область более высоких значений при низкой частоте их встречаемости (3%). Возможно, такое растяжение частотной кривой распределения значений содержания марганца в области высоких значений отражает условия экспериментального исследования – его избыточное пищевое потребление. В связи с

этим, статистически корректно по точкам перегиба частотной кривой произвести разделение на группы по уровню содержания марганца в крови не получится. Для деления на группы придется воспользоваться правилами S-образного шкалирования кумулятивной частотной кривой, в соответствии с которыми границей области низких значений является 16% кумулятивной частоты (в нашем случае – это значение 0,04 мг/100 г ткани), а границей области высоких значений – 84% кумулятивной частоты (в нашем случае – более 0,16 мг/100 г ткани). Значения внутри этих границ (от 0,041 до 0,16 мг/100 г ткани включительно) относятся к среднему уровню.

Таким образом, содержание марганца в исследуемых тканях (табл. 4) при нормальном и повышенном пищевом потреблении этого металла не зависит от уровня его содержания в крови, и вероятно, депонирование его в тканях определяется иными, не связанными с уровнем содержания в крови, механизмами. Также, как и для содержания кальция в кишечнике, обращает на себя внимание обратное монотонное изменение центроидов распределения по

Таблица 4
Влияние уровня марганца в крови животных на его содержание в тканях

Металл	Ткань	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания марганца в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Марганец	Кровь	0,036	0,085	0,208	0,81	$2 \cdot 10^{-10}$
	Печень	0,556	0,546	0,489	0,07	0,35
	Кость	0,787	0,718	0,568	0,03	0,52
	Волосы	0,185	0,198	0,149	0,11	0,20
	Мышцы	0,065	0,083	0,082	0,03	0,64
	Кишечник	8,470	7,012	6,443	0,06	0,41

группам: группе с низким содержанием марганца в крови соответствует его более высокое содержание в кишечнике (задержка всасывания), и наоборот, группе с высоким уровнем марганца в крови соответствует его более низкое содержание в кишечнике (более полное всасывание).

В связи с возникновением такого предположения (зависимость уровня марганца в крови от полноты его всасывания в кишечнике), был проведен дисперсионный анализ влияния фактора «Уровень содержания марганца в кишечнике» на значения содержания марганца в крови.

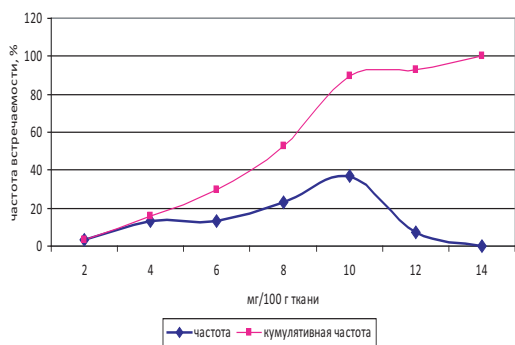


Рис. 5. Частотные кривые распределения значений содержания марганца в кишечнике животных при его полноценном и избыточном потреблении.

Частотная кривая распределения значений содержания марганца в кишечнике животных при полноценном и избыточном его потреблении частично напоминает кривую нормального распределения и смещена в область более высоких значений, что может отражать специфику избыточного пищевого потребления этого металла. В то же время, в области более низких значений также имеется превышение значений по

сравнению с стандартной кривой нормального распределения. Возможно, эта часть частотной кривой характеризует животных с более высокими показателями всасывания марганца в кишечнике. Исходя из особенностей кривых, граничными точками диапазонов низкого, среднего и высокого содержания марганца в кишечнике при его полноценном и избыточном потреблении могут быть 4 и 10 мг/100 г ткани.

Животные были перегруппированы в соответствии с уровнем содержания марганца в кишечнике на 3 подгруппы: с низким содержанием (до 4 мг/100 г ткани, подгруппа Н), средним уровнем (от 4,1 до 10 мг/100 г ткани, подгруппа С) и высоким содержанием марганца в кишечнике (более 10 мг/100 г ткани, подгруппа В.). Дисперсионному анализу подвергались данные о содержании марганца в крови животного.

Анализ динамики центроидов распределения значений содержания марганца в крови показывает, что подгруппам и с низким, и со средним содержанием марганца в кишечнике на фоне его полноценного пищевого или избыточного потребления соответствуют высокие значения содержания марганца в крови, и только подгруппе с высоким содержанием марганца в кишечнике (то есть при его минимальном всасывании) соответствует самое низкое содержание металла в крови. То есть проведенный дисперсионный анализ отверг гипотезу о влиянии уровня содержания марганца в кишечнике (полнота всасывания) на содержание этого металла в крови животных. Коэффициент детерминации анализируемой модели составил всего 0,023, то есть только 2% вариативности уровня марганца в крови

Однофакторный дисперсионный анализ
ИТОГИ

Группы	Счет	Сумма	Центроиды	Дисперсия
H	7	0,663	0,094714	0,002563
C	20	1,9551	0,097755	0,004928
B	3	0,1994	0,066467	1,93E-05

Дисперсионный анализ

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	0,00256	2	0,00128	0,316873	0,731095	3,354131
Внутри групп	0,109049	27	0,004039			
Итого	0,111609	29				

могут быть объяснены колебаниями его всасывания в кишечнике ($p=0,73$). Следовательно, на содержание марганца в крови животных влияют другие факторы, не связанные с его содержанием в кишечнике.

Железо

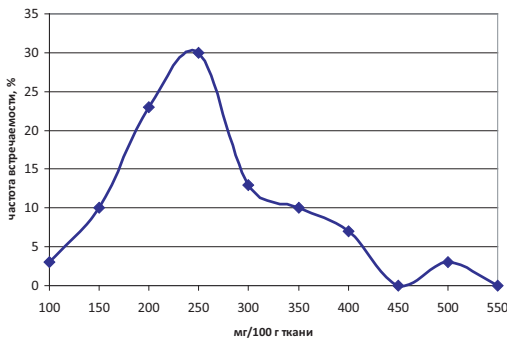


Рис. 6 Кривая частотного анализа встречаемости значений содержания железа в крови крыс.

Частотная кривая распределения значений содержания железа в крови крыс близка к кривой нормального распределения с максимумом около 250 мг/100 г ткани и несколько растянутым нисходя-

щим участком кривой (повышение доли значений в области высокого содержания железа, что может быть обусловлено экспериментальной ситуацией – превышением у ряда животных нормы его пищевого потребления). Анализ рис.6 позволяет определить следующие границы содержания железа в крови у крыс с нормальным и избыточным его потреблением:

Низкий уровень – до 150 мг/100 г тканей

Средний уровень – от 151 до 300 мг/100 г тканей

Высокий уровень – более 300 мг/100 г тканей.

Анализ таблицы 5 показывает, что содержание железа в тканях при его нормальном или избыточном пищевом потреблении не зависит от его уровня в крови. Обращает на себя внимание динамика центроидов содержания железа в кишечнике: низкому уровню содержания железа в крови соответствует и низкий уровень содержания железа в кишечнике, в то время как у животных с высоким уровнем содержания в крови

Влияние уровня железа в крови животных на его содержание в тканях

Металл	Ткань	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания железа в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Железо	Кровь	111	209	370	0,72	$3 \cdot 10^{-8}$
	Печень	121	100	108	0,13	0,15
	Кость	14	15	14	0,02	0,30
	Волосы	5,1	4,9	4,1	0,03	0,62
	Мышцы	8,9	8,2	7,0	0,15	0,11
	Кишечник	26	43	45	0,18	0,06

железа, уровень его содержания в кишечнике соответствует средним значениям. Такая динамика может отражать наличие механизма ускоренного всасывания железа в кишечнике при его низком содержании в крови, и торможение всасывания при достаточной степени насыщения железом крови. Выявленная статистическая закономерность соответствует хорошо известной модели работы ферритинового транспортного механизма и «ферритинового занавеса», защищающего организм от избыточного энтерального поступления железа.

его пищевом потреблении близка к кривой нормального распределения с небольшим дополнительным «хвостом» в области высоких значений, что может закономерно отражать вклад избыточного пищевого потребления этого минерала. Анализ рис. 7 позволяет определить следующие границы содержания магния в крови у крыс с нормальным и избыточным его потреблением:

Низкий уровень – до 1,60 мг/100 г тканей;

Средний уровень – от 1,61 до 2,0 мг/100 г тканей;

Высокий уровень – более 2,0 мг/100 г тканей.

Магний

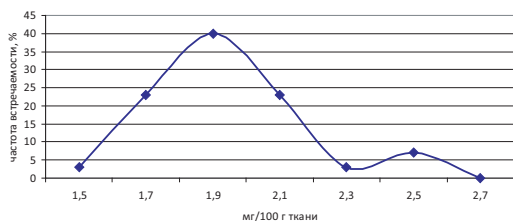


Рис. 7. Кривая частотного анализа распределения значений содержания магния в крови крыс.

Кривая частотного распределения значений содержания магния в крови крыс при полноценном и избыточном

Анализ таблицы 6 показывает, что между содержанием магния в крови и тканевыми депо существуют обратные механизмы: высокому уровню содержания магния в крови соответствуют самые низкие значения центроидов групп для **костной ткани, волос и мышц**. Можно предположить, что нарушение депонирования избыточного пищевого магния в этих тканях и определяет его более высокий уровень в крови. Такая модель является статистически значимой, и имеет приемлемый коэффициент детерминации (0,19 – 0,23). Возможно

Таблица 6

Влияние уровня магния в крови животных на его содержание в тканях

Металл	Ткань	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания магния в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Магний	Кровь	1,55	1,80	2,20	0,82	1*10 ⁻¹⁰
	Печень	6,52	6,57	6,18	0,03	0,67
	Кость	35,92	35,36	33,05	0,19	0,06
	Волосы	2,02	2,07	1,63	0,23	0,03
	Мышцы	8,89	8,34	7,79	0,20	0,046
	Кишечник	15,51	15,66	14,88	0,003	0,96

также, что более низкое содержание магния в крови у некоторых животных связано с избыточной работой депонирования металла в мышечной ткани, так как низкому уровню магния в крови соответствуют более высокие значения его содержания в мышечной ткани (вариативность содержания магния в мышцах на 20% объясняется влиянием уровня его содержания в крови). Содержание магния в печени и кишечнике не зависят от его уровня в крови.

при нормальном и избыточном пищевом потреблении (рис. 8) далека от кривой нормального распределения, имеет двугорбую вершину в области низких значений и длинный «хвост» в области высоких значений при низкой частоте встречаемости. Поэтому распределение животных на подгруппы с низкими, средними и высокими значениями содержания цинка в крови произведено по точкам перегиба кумулятивной частотной кривой. Точке, соответствующей 16% накопленных частот и являющейся границей низкого диапазона значений, соответствует 2,1 мг цинка /100 г ткани. Точке на кумулятивной кривой, соответствующей 84% накопленных частот и являющейся границей высокого диапазона значений содержания цинка в крови животных, соответствует 2,6 мг /100 г ткани. Значения, лежащие между этими точками, будут относиться к области средних значений содержания цинка в крови крыс.

Цинк

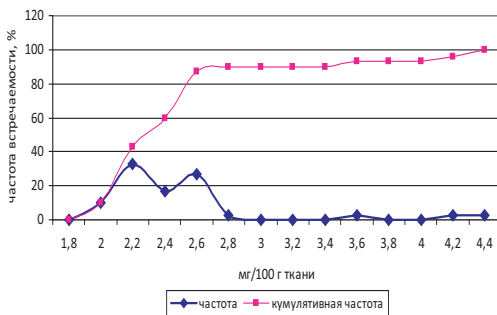


Рис. 8. Кривая частотного анализа распределения значений содержания цинка в крови крыс.

Частотная кривая распределения значений содержания цинка в крови крыс

При анализе таблицы 7 обращает на себя внимание, что только в отношении костной ткани выявлено определенное влияние фактора уровня содержания цинка в крови. С учетом отрицательной монотонной динамики значений цент-

Таблица 7

Влияние уровня цинка в крови животных на его содержание в тканях

Металл	Ткань	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания цинка в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Цинк	Кровь	1,95	2,31	3,63	0,80	$3 \cdot 10^{-10}$
	Печень	3,74	3,91	4,02	0,008	0,90
	Кость	21,57	20,87	17,64	0,23	0,03
	Волосы	3,28	3,45	3,27	0,005	0,94
	Мышцы	3,21	3,21	3,28	0,007	0,91
	Кишечник	6,22	6,44	6,67	0,007	0,91

роидов (группе с низкими значениями цинка в крови соответствует более высокое значение содержания цинка в кости, а группе с высокими значениями цинка в крови – более низкое значение содержания цинка в кости), можно сделать предположение, что с нарушениями депонирования избыточного пищевого цинка в костной ткани может быть связано колебание уровня его содержания в крови. Содержание цинка в остальных органах (печень, мышцы, волосы, кишечник) не зависело от содержания цинка в крови, и следовательно, определяется другими механизмами, не связанными с обменом кровь-ткань.

Выводы:

Статистический анализ характеристик значений содержания металлов в крови животных при нормальном или избыточном их пищевом потреблении показал, что только для меди распределение значений соответствует распределению случайной величины (не испытывает дополнительного влияния внешних факторов). Наибольшее влия-

ние внешних факторов характерно для содержания кальция и цинка в крови.

Низкая вариативность показателей содержания в крови меди и марганца отражает существование жестких механизмов их гомеостатического регулирования.

Содержание кальция в костях и волосах, меди в печени определяется уровнем соответствующего металла в крови.

Содержание кальция в печени и мышцах, меди в волосах, марганца и железа во всех исследуемых тканях, магния в печени, цинка в печени, волосах и мышцах не зависит от уровня соответствующего металла в крови при нормальном и избыточном их пищевом потреблении.

Между содержанием меди в костях и мышцах, магния в костях, мышцах и волосах, цинка в костях и содержанием этих металлов в крови существуют обратные зависимости – то есть повышению их содержания в крови соответствует нарушение депонирования в указанных тканях и наоборот – активное депонирование в тканях сопровождается более низкими значениями металлов в крови.

Список литературы

1. 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. - № 3. – С. 12 – 41.
2. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонтов Д.А., Касинская Н.В. Особенности распределения металлов в организме лабораторных животных при разных уровнях их пищевого потребления // Биомедицина, 2013. - №3. – С. 82-90.

Influence of fluctuations of the metals concentration in blood on their concentration in tissues of laboratory animals under normal and excess food consumption metallohelats

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

The method of a nuclear and absorbing spectrometry studied the content of calcium, magnesium, iron, copper, manganese and zinc in fabrics of laboratory animals at levels of food consumption, equals to 100, 120 and 140% from daily requirement. Statistical regularities of their distribution in tissues depending on level of the concentration of metals in blood are revealed.

Key words: metal-chelates, microelements, concentration in tissues, nuclear and absorbing spectrometry.

Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии

Е.Б. Шустов¹, Н.Н. Каркищенко¹, В.Н. Каркищенко¹,
В.П. Ганапольский², М.К. Ржепецкая²

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

² – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» Министерства Обороны РФ

Контактная информация: Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Представлены результаты исследования показателей функционального состояния и метаболизма здоровых добровольцев в условиях барокамерного подъема на высоты 3500, 4500, 5000 и 6000 м. Показано, что пребывание на высоте 6000 сопровождается развитием экстремального гипоксического состояния, в формировании которого, кроме специфических симптомов нарушений со стороны ЦНС и избыточной реактивности кислородтранспортных механизмов, играют важную роль неспецифические симптомокомплексы дефицита функционального потенциала нейроэндокринной системы, эндогенной интоксикации, истощения функциональных резервов антиоксидантной системы, нарушений антигенно-структурного гомеостаза, энергетического дисбаланса. Для формирования адекватной биологической модели патологических процессов необходимо выделять 2 типа нарушений резистентности к гипоксии: специфических нарушений метаболизма в нервной ткани, и неспецифических, связанных с процессами в иных органах и тканях.

Ключевые слова: гипоксия, экстремальные состояния, неспецифические механизмы резистентности, биологическое моделирование.

Под термином «гипоксия» (hypoхiа – от греч. hypo – ниже и лат. oxy [genium] кислород) понимают недостаточное снабжение тканей организма кислородом или нарушение его утилизации в процессе биологического окисления. Детальное этиопатогенетическое разделение многочисленных вариантов физиологической и патологической гипоксии

предложено А.З. Колчинской [3], которая на основании анализа изменений процесса массопереноса и утилизации кислорода в различных звеньях системы дыхания выделила такие основные типы гипоксических состояний, как: 1) гипоксическая гипоксия, вызванная снижением pO_2 во вдыхаемом воздухе (pIO_2); 2) респираторная гипоксия, сопровождаю-

щаяся снижением pO_2 в альвеолярном воздухе (pAO_2) и артериальной крови (pAO_2) вследствие поражения дыхательных путей и легких при нормальном pIO_2 ; 3) анемическая (гемическая) гипоксия - снижение содержания O_2 в артериальной крови либо из-за уменьшения ее кислородной емкости, либо из-за снижения кислородсвязывающих свойств гемоглобина при нормоксическом pAO_2 ; 4) циркуляторная гипоксия – снижение скорости доставки O_2 кровью к тканям из-за нарушения циркуляции крови; 5) гипоксия нагрузки – снижение pO_2 в тканях и в венозной крови, возникающее в результате повышения нагрузки на систему дыхания вследствие увеличения потребления O_2 усиленно функционирующими клетками; 6) первичная тканевая гипоксия – кислородное голодание, обусловленное повреждением механизмов утилизации кислорода в клетках при нормальном содержании и напряжении O_2 в цитоплазме.

Снижение парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе приводит к развитию артериальной гипоксемии, которая является пусковым механизмом развития гипоксического состояния, вызывая, по меньшей мере, три связанных между собой комплекса явлений. Во-первых, под влиянием гипоксемии возникает рефлекторное увеличение напряжения функции систем, специфически ответственных за транспорт кислорода из окружающей среды и его распределение внутри организма, т.е. гипервентиляция легких, увеличение минутного объема кровообращения, расширение сосудов мозга и сердца, сужения сосудов брюшной полости и мышц. Во-вторых, развивается активация симпатoadrenalовой и

гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем, т.е. стресс-реакция. При незначительном снижении парциального давления кислорода в альвеолярном воздухе мобилизация аппарата внешнего дыхания и кровообращения способна обеспечить адекватную физиологическим запросам доставку кислорода тканям. Однако в случае более интенсивного снижения парциального давления кислорода в альвеолярном воздухе, недостаточной активации механизмов транспорта кислорода или повышении кислородного запроса тканей, возникает третий комплекс явлений – тканевая гипоксия. Ведущим звеном патогенеза гипоксического состояния становится дефицит энергии, связанный с переходом обмена на менее энергетически выгодный анаэробный путь и нарушение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования. Нарушается процесс взаимного окисления – фосфорилирования переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий. Вслед за нарушением окислительно-восстановительного потенциала переносчиков электронов снижается окислительное фосфорилирование, энергообразование и процесс аккумуляции энергии в макроэргических связях АТФ и креатинфосфата [8]. Ограничивая ресинтез АТФ в митохондриях, острая гипоксия вызывает прямую депрессию функций ряда систем организма, и, прежде всего, ЦНС, миокарда и печени. В интенсивно работающих органах идет усиленный распад гликогена, возникают дистрофические явления, нарастает “кислородный долг” организма. Возникающие изменения еще более усиливаются под влиянием недоокисленных продуктов метаболизма [1].

Несмотря на большой объем выполненных в разные годы исследований [5], механизмы формирования экстремальных состояний при гипоксии в аспекте биомоделирования не изучались. Именно это и послужило **целью** нашей работы – обосновать подходы к биомоделированию экстремальных гипоксических состояний.

Материалы и методы

В проведенных нами 4 сериях исследований была изучена динамика показателей функционального состояния молодых здоровых мужчин в возрасте 20-25 лет при различной выраженности гипоксической гипоксии. Гипоксическую гипоксию моделировали в стационарной барокамере, в которой создавали разрежение, соответствующее высотам 3500, 4500, 5000 и 6000 м. Скорость «подъема» и «спуска» составляла 5-10 м/с, длительность высотной экспозиции – 60-80 мин.

Испытатели после 15 минут пребывания на высоте выполняли клино- и ортостатическую пробу, трехминутную дозированную динамическую физическую нагрузку на велоэргометре мощностью 100 Вт с темпом 60 об/мин, пробу Штанге. Исследовалась сила и статическая выносливость мышц кисти с расчетом коэффициента мышечной выносливости, скорость и вариабельность ПЗМР и СЗМР (по результатам 50 реакций), проводились тесты АСС и Спилберге-ра-Ханина. Рассчитывались вторичные психофизиологические показатели – функциональный уровень ЦНС (ФУС), уровень реакции (УР) и уровень функциональных возможностей (УФВ) [2]. В состоянии относительного покоя и при велоэргометрической нагрузке опреде-

ляли ЧСС, АД, с помощью кислородного газоанализатора – потребление кислорода с расчетом величины энерготрат. Рассчитывали ударный и минутный объем кровообращения, вторичные физиологические индексы Кердо, Квааса, Робинсона, кислородный пульс и кислородный эффект дыхательного цикла. За 10-15 мин до и непосредственно после высотного исследования осуществляли отбор венозной крови, в которой определяли содержание кортизола, продукты углеводного, белкового и липидного обмена, ПОЛ, показатели АОС, иммунного статуса, гемограммы, интенсивности процессов апоптоза.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что, начиная с высоты 3500 м, возникает прогрессирующее ухудшение функционального состояния ЦНС, активация функций сердечно-сосудистой системы и внешнего дыхания, усиление катаболических процессов с мобилизацией энергетических ресурсов организма. Уже при умеренной степени гипоксической гипоксии (3500 м) у испытуемых выявляются уменьшение скорости и увеличение лабильности простых зрительно-моторных реакций (ПЗМР), ухудшаются самочувствие, внимание, настроение, возрастает уровень реактивной тревожности (табл.1). Выраженность этих неблагоприятных симптомов прогрессивно нарастает и на высоте 5000 м отмечается увеличение латентного периода сложных зрительно-моторных реакций (СЗМР). Наиболее неблагоприятные сдвиги функционального состояния ЦНС выявляются на высоте 6000 м. Так, латентный период ПЗМР и СЗМР увеличивается по сравнению с исходным состоянием на 45-50

Таблица 1

Динамика показателей функционального состояния ЦНС здорового человека при гипоксической гипоксии

Показатель	Ед. измерения	Нормоксия (n=87)	Гипоксия			
			3500 м (n=35)	4500 м (n=68)	5000 м (n=21)	6000 м (n=21)
ЛП ПСМР	мс	198±2	230±4***	224±4***	245±3***	295±22***
ФУС	у.е.	4,7±0,1	4,5±0,1*	4,6±0,1*	4,2±0,1***	4,2±0,2*
УР	у.е.	2,1±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1*	1,6±0,1***	1,5±0,2*
УФВ	у.е.	3,7±0,1	3,4±0,1*	3,5±0,1*	3,0±0,1***	2,8±0,3**
ЛП СЗМР	мс	376±4	387±6	382±9	410±5***	449±20***
ППК	баллы	40±1	38±1	35±1***	33±1***	27±2***
РТ	баллы	34±1	35±1	38±1***	38±2***	46±2***
ММУ	кг	71±3	68±3	67±3	65±4	65±3
КМВ	у.е.	34±3	35±2	35±3	35±3	21±4***

Примечания: 1) ЛП – латентный период; ППК - показатель психологического комфорта; РТ – реактивная тревожность; ММУ – максимальное мышечное усилие; КМВ – коэффициент мышечной выносливости; 2) Отличия от значений в условиях нормоксии достоверны, * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

и 10-12%, показатель психологического комфорта уменьшается на 30-34%, коэффициент мышечной выносливости – на 36-40%. У 25% испытуемых при проведении клино- и ортостатической проб развиваются признаки преколлаптоидного состояния.

Интегральная оценка функционального состояния ЦНС осуществлялась с использованием показателя, названного нами фактором операторской работоспособности (ФОР), поскольку он был рассчитан по результатам факторного анализа по формуле: $Y = -0,73X_1 + 0,77X_2 - 0,44X_3 - 0,54X_4$, где Y – ФОР, X_1 и X_3 – латентные периоды ПЗМР и СЗМР, X_2 – ФУС, X_4 – точность СЗМР. Для удобства интерпретации этот и последующие факторы были нормированы с помощью стандартной процедуры перевода в Т-балльную оценку в соответствии со следующим уравнением: $F(T) = 50 \pm 10 * (F_i - F_m) / S_f$, где F(T) – значение фактора в

Т-баллах, F_i – индивидуальные первичные значения фактора, полученные в z-оценках по уравнению факторного анализа, F_m – среднегрупповое значение (математическое ожидание) фактора для условий нормоксии, S_f – стандартное отклонение индивидуальных значений фактора в условиях нормоксии. В соответствии со свойствами Т-балльных оценок, их величина показывает место данного наблюдения в картине распределения вероятностей таким образом, что их среднему значению соответствует 50 Т-баллов, а отклонению на величину одного стандартного отклонения соответствует 10 Т-баллов. Высокие значения ФОР отражают оптимальный уровень сенсомоторной активности, а низкие - снижение скорости и увеличение лабильности зрительно-моторных реакций. Динамика ФОР по высотам показывает, что эффективность операторской работоспособности на высоте 5000

м снижается на 43-48% по сравнению с ее уровнем в условиях нормоксии, а на высоте 6000 м – на 80-86%.

Компенсаторная активация функций сердечно-сосудистой системы и внешнего дыхания (табл.2) с увеличением выраженности гипоксической гипоксии характеризуется возрастанием ЧСС, ударного и минутного объемов кровообращения, пульсового АД, VO_2 . Усиливается активирующее влияние симпатического звена вегетативной нервной системы, увеличиваются потребность миокарда в кислороде и показатель детренированности сердца, уменьшаются диастолическое АД и периферическое сопротивление сосудов.

Максимальные значения VO_{2n} , $VO_2/ЧСС$ и $VO_2/ЧД$ зарегистрированы на высоте 4500 м. Первые признаки истощения компенсаторных резервов кислород-транспортной системы организма отмечаются на высоте 5000 м. В частности, при выполнении физической нагрузки

значительно уменьшается кислородный эффект сердечного и дыхательного циклов. На высоте 6000 м, наряду с перечисленными признаками декомпенсации, выявляется достоверное уменьшение систолического АД, что свидетельствует об избыточной дилатации артериальных сосудов и ослаблении инотропной функции миокарда.

Комплексная оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы осуществлялась с применением интегральных факторов, полученных после проведения мультифакторного анализа, описывающих гемодинамику здорового человека в условиях гипоксии. По результатам факторного анализа были получены 5 факторов, объясняющих 99% дисперсии всех используемых показателей гемодинамики при гипоксической гипоксии:

Фактор напряжения сердечной деятельности в состоянии покоя. Объединяет высокие показатели ударного (УО)

Таблица 2

Динамика показателей сердечно-сосудистой системы и внешнего дыхания здорового человека при гипоксической гипоксии

Показатель	Ед. измерения	Нормоксия (n=87)	Гипоксия			
			3500 м (n=35)	4500 м (n=68)	5000 м (n=21)	6000 м (n=21)
VO_{2n}	мл/мин	153±8	194±7***	254±11**	250±14***	296±21***
$VO_{2н}$	мл/мин	462±23	683±33***	764±38***	736±46***	723±42***
$VO_2/ЧСС_n$	мл	2,11±0,11	2,36±0,10*	2,98±0,13***	2,66±0,15*	2,84±0,21
$VO_2/ЧСС_н$	мл	4,82±0,26	7,37±0,26***	7,74±0,30***	6,00±0,71	5,35±0,36
$VO_2/ЧД_n$	мл	8,02±0,37	12,19±0,54***	14,82±0,73***	14,97±0,30***	15,63±1,48**
$VO_2/ЧД_н$	мл	20,65±1,62	40,7±2,1***	40,8±1,6***	18,76±1,49	18,82±1,02
ВЗДвд	с	85±4	63±5**	59±4***	52±3***	41±3***

Примечания: 1) подстрочные индексы «п» и «н» обозначают условия регистрации показателя – в состоянии относительного покоя и при физической нагрузке; 2) VO_2 – потребление кислорода, ЧД – частота дыхания, ВЗДвд – время задержки дыхания на вдохе; 3) Отличия от значений в условиях нормоксии достоверны, * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

и минутного объемов кровообращения (МОК), систолического (АДС) и пульсового (АДП) артериального давления, частоту сердечных сокращений (ЧСС), потребности миокарда в кислороде (Индекс Робинсона, ИР) с низкими значениями общего периферического сопротивления сосудов (ОПСС) и степени детренированности миокарда (Индекс Квааса, ИК), определяемыми в состоянии относительного покоя в орто- (подстрочный индекс «с») и клиностагическом (подстрочный индекс «л») положениях. Данный фактор (в z-оценках) может быть описан следующим уравнением:

$$F=0,86\text{МОК}_{\text{л}}+0,85\text{МОК}_{\text{с}}+0,79\text{УО}_{\text{л}}+0,70\text{УО}_{\text{с}}+0,86\text{АДП}_{\text{л}}+0,75\text{АДП}_{\text{с}}+0,61\text{АДС}_{\text{л}}+0,49\text{АДС}_{\text{с}}+0,51\text{ЧСС}_{\text{л}}+0,46\text{ЧСС}_{\text{с}}+0,65\text{ИР}_{\text{л}}+0,63\text{ИР}_{\text{с}}-0,77\text{ОПСС}_{\text{л}}-0,78\text{ОПСС}_{\text{с}}-0,63\text{ИК}_{\text{л}}-0,57\text{ИК}_{\text{с}}$$

2. Фактор сосудистого сопротивление в состоянии покоя. Включает высокие значения общего периферического сопротивления сосудов (ОПСС), диастолического давления (АДД) и индекса детренированности миокарда (Индекс Квааса, ИК) с низкими значениями ударного (УО) и минутного (МОК) объема кровообращения, пульсового давления (АДП) и индекса симпатикотонии (Вегетативный индекс Кердо, ВИК). В z-оценках данный фактор может быть описан следующим уравнением:

$$F=0,84\text{ОПСС}_{\text{с}}+0,79\text{ОПСС}_{\text{л}}+0,78\text{АДД}_{\text{с}}+0,81\text{АДД}_{\text{л}}+0,57\text{ИК}_{\text{с}}+0,75\text{ИК}_{\text{л}}-0,78\text{АДП}_{\text{с}}-0,85\text{АДП}_{\text{л}}-0,83\text{УО}_{\text{с}}-0,88\text{УО}_{\text{л}}-0,86\text{МОК}_{\text{с}}-0,79\text{МОК}_{\text{л}}-0,77\text{ВИК}_{\text{с}}-0,77\text{ВИК}_{\text{л}}$$

Фактор сосудистого сопротивления при динамической физической нагрузке.

Данный фактор объединил с положительным весом значения общего периферического сопротивления сосудов (ОПСС) и диастолического давления (АДД) и с отрицательным весом – значениями ударного (УО), минутного (МОК) объема кровообращения и индекса симпатикотонии (ВИК). В z-оценках данный фактор может быть описан следующим уравнением:

$$F=0,92\text{ОПСС}_{\text{л}}+0,90\text{АДД}_{\text{л}}-0,94\text{МОК}_{\text{л}}-0,90\text{ВИК}_{\text{л}}-0,85\text{УО}_{\text{л}}$$

Фактор сердечной деятельности при динамической физической нагрузке. В него вошли положительные значения систолического (АДС) и пульсового (АДП) артериального давления, минутного объема кровообращения (МОК) и индекса Робинсона (ИР) и отрицательные веса индекса детренированности миокарда (Индекс Квааса, ИК). Фактор в z-оценках может быть описан следующим уравнением:

$$F=0,97\text{АДП}_{\text{л}}+0,86\text{АДС}_{\text{л}}+0,66\text{МОК}_{\text{л}}+0,66\text{ИР}_{\text{л}}-0,85\text{ИК}_{\text{л}}$$

Фактор симпатической активации при динамической физической нагрузке. Объединил высокие значения частоты сердечных сокращений (ЧСС), минутного объема кровообращения (МОК), индексов Кердо (ВИК) и Робинсона (ИР) с низкими значениями периферического сопротивления (ОПСС) и показателя PWC_{170} . Данный фактор в z-оценках может быть описан следующим уравнением:

$$F=0,88\text{МОК}_{\text{л}}+0,89\text{ВИК}_{\text{л}}+0,80\text{ЧСС}_{\text{л}}+0,64\text{ИР}_{\text{л}}-0,88\text{ОПСС}_{\text{л}}-0,66\text{PWC}_{170}$$

Таблица 3

Изменения значений интегральных гемодинамических факторов при гипоксической гипоксии

Фактор	Нормоксия	Высота			
		3500 м	4500 м	5000 м	6000 м
Сердечная деятельность в покое	50±1	59±2***	59±2***	69±4***	70±4***
Сосудистое сопротивление в покое	50±1	42±1***	41±2**	36±3***	31±5***
Сосудистое сопротивление при нагрузке	50±1	49±2	32±2***	36±2***	33±3**
Сердечная деятельность при нагрузке	50±1	42±2***	61±2**	54±4	54±3
Симпатическая активность при нагрузке	50±1	55±9	70±1***	67±3***	70±2***

В таблице 3 представлена динамика гемодинамических факторов при различных степенях гипоксической гипоксии. Обращает внимание то, что отклонения от исходного уровня значений факторов, рассчитываемых с использованием показателей состояния относительного покоя, увеличиваются (уменьшаются) в соответствии с выраженностью гипоксической гипоксии и их величина достигает максимальных (минимальных) величин на высоте 6000 м. Иная динамика свойственна факторам, определяемым при дозированной физической нагрузке. Наиболее выраженные их отклонения от «нормоксических» значений выявляются уже на высоте 4500 м и в последующем уровень функционирования системы либо не изменяется, либо даже уменьшается.

Интегральная оценка реакции сердечно-сосудистой системы на гипоксическое воздействие была осуществлена после расчета среднего суммы среднеквадратических отклонений значений пяти вышеуказанных гемодинамических факторов в условиях гипоксии от их значений в условиях нормоксии.

Этот интегральный показатель был назван фактором гипоксической реактивности сердечно-сосудистой системы (ФРССС).

Динамика ФРССС отражает возрастание реактивности системы кровообращения по мере увеличения степени гипоксической гипоксии.

На рис. 1 представлена динамика значений факторов операторской работоспособности и реактивности сердечно-сосудистой системы по высотам.

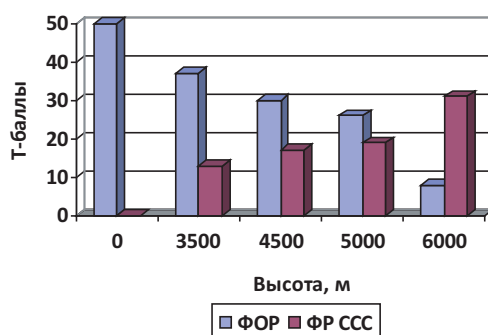


Рис. 1. Динамика по высотам интегральных физиологических факторов.

Анализ рисунка 1 позволяет считать, что высота 6000 м может рассматриваться как экстремальная для организма.

Резервное время сохранения ясного сознания на этой высоте, согласно данным литературы [5] составляет 30-60 минут.

Динамика метаболических показателей оценивалась по изменениям ведущих биохимических и иммунологических факторов (табл.4). Установлено, что на высотах 3500 и 4500 м усиливаются катаболические процессы и анаэробный гликолиз, активизируется миграция циркулирующих лимфоцитов и нейтрофилов. Напряжение механизмов анаэробного гликолиза свидетельствует о развитии начальных признаков тканевой гипоксии. Обращает внимание

увеличение в крови количества лимфоцитов и лимфоцитарно-нейтрофильного коэффициента. Подобная реакция системы крови возникает при быстром повышении активности защитных сил организма в ответ на действие раздражителя средней интенсивности.

Факторная структура метаболического статуса испытуемых существенно изменяется на высоте 6000 м. Наряду с активацией катаболизма, интенсифицируются функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, возникают неблагоприятные признаки измененного антигенно-структурного

Таблица 4

Факторная структура и динамика метаболических факторов при гипоксической гипоксии

Название	Факторная структура	Нормоксия	3500 м	4500 м	6000 м
Фактор напряжения ГГНС	кортизол	50±1	39±1	47±1	80±4***
Фактор метаболического напряжения	$Y=0,80X_1+0,62X_2+0,87X_3+0,83X_4$ где: X_1 – общий белок; X_2 – глюкоза; X_3 – общий билирубин; X_4 – щелочная фосфатаза	50±1	58±2***	54±1**	64±5***
Фактор реактивности клеток крови	лимфоцитарно-нейтрофильный коэффициент	50±1	58±1***	56±1***	40±2***
Фактор анаэробного гликолиза	$Y=0,94X_1+0,94X_2$ где: X_1 – лактат; X_2 – лактат-пируватный коэффициент	50±1	65±2***	63±2***	48±1
Фактор фагоцитоза	$Y=0,58X_1+0,87X_2+0,90X_3$ где: X_1 – ЛКТ; X_2 – НСТ; X_3 – СДГ _л	50±1	50±2	50±1	42±5***
Фактор пируватный	пируват	50±1	50±2	52±1	65±2***
Фактор активности ПОЛ	$Y=0,49X_1+0,73X_2+0,80X_3$ где: X_1 – СОД; X_2 – МДА _с ; X_3 – МДА _и	50±1	47±2	51±1	52±4
Фактор эритроцитарный	эритроциты	50±1	49±2	47±2	52±2

Примечание: Отличия от значений в условиях нормоксии достоверны, * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

гомеостаза и дисбаланса энергопродуцирующих систем клетки. В частности, характерные для максимального напряжения защитных систем организма нейтрофильный лейкоцитоз и лимфопения сопровождаются ингибированием функций фагоцитирующих клеток и сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов, критическим угнетением аэробного и уменьшением скорости анаэробного катаболизма углеводов с накоплением во внутренней среде пирувата. Подобная динамика биохимических и иммунологических показателей свидетельствует о выраженном снижении резистентности организма и возникновении признаков декомпенсации.

Первые признаки декомпенсации возникают на высоте 5000 м, когда при физической нагрузке выявляется снижение кислородного эффекта дыхательного и сердечного циклов. Качественно новое функциональное состояние возникает на высоте 6000 м. Критическое ухудшение умственной и физической работоспособности, выраженная активация эндокринной системы, вовлечение в системную реакцию механизмов сохранения антигенно-структурного гомеостаза с возникновением признаков ингибирования функций иммунокомпетентных клеток, энергетический дисбаланс свидетельствуют о том, что наряду с типичной стресс-реакцией развиваются неблагоприятные синдромы истощения функциональных резервов гомеостатических систем организма.

Исключительно важное значение для исследования механизмов экстремальной гипоксической гипоксии имеет факт существенного возрастания интенсивности процессов программированной клеточной гибели. По нашим данным,

после гипоксической гипоксии на высоте 6000 м на 44-47% увеличивалось содержание лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза. Биохимическую картину развития апоптоза можно гипотетически разделить на несколько этапов, включающих действие фактора, вызывающего апоптоз, передачу сигнала с рецептора в клеточное ядро, активацию летальных генов, синтез апоптоз-специфических белков и заключительную, и вместе с тем определяющую стадию – регулирующую активацию эндонуклеаз и фрагментацию ДНК. В качестве индукторов апоптоза могут выступать глюкокортикоиды, интерлейкины, ФНО, нейротрансмиттеры (глутамин, дофамин и др.), кальций.

Анализ корреляционных связей ФРССС показал, что у обследованных со сниженной гипоксической резистентностью исходное функциональное состояние характеризовалось напряжением механизмов АОС и снижением функционального потенциала эритроцитов (рис. 2).

Ключевая роль в механизмах устойчивости к гипоксии принадлежит фактору функционального потенциала эритроцитов. В структуру этого фактора входят количество эритроцитов, содержание гемоглобина, гематокрит, и активность эритроцитарной Na^+, K^+ -АТФазы. Транспортные АТФазы обеспечивают активный транспорт ионов между цитоплазмой и внеклеточной жидкостью. Клетки всех тканей характеризуются электрохимическим градиентом ионов натрия, калия и кальция. Эти градиенты вовлечены в регуляцию объема клетки и поддержания соответствующей среды для синтеза белков, контроль за дыханием и гликолизом, внутриклеточным

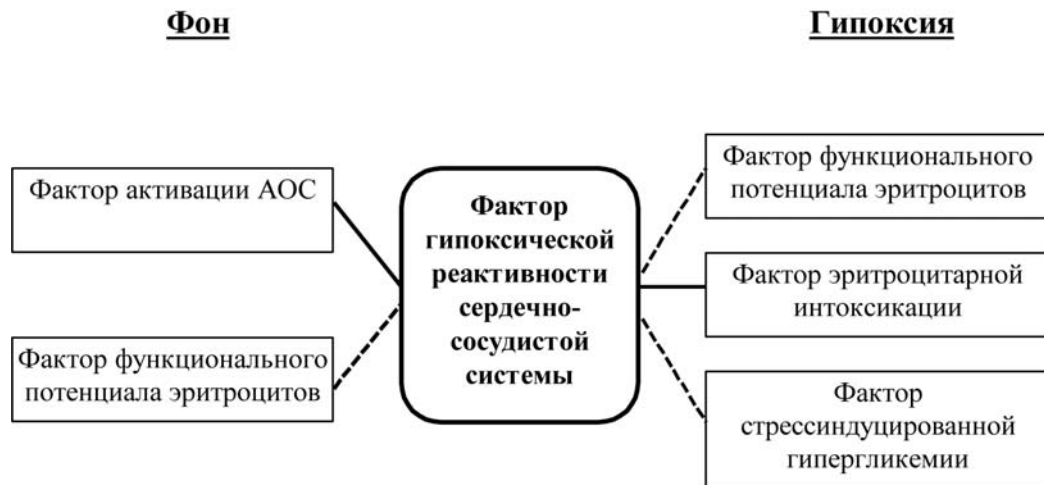


Рис. 2. Граф корреляционных связей фактора реактивности сердечно-сосудистой системы при экстремальной гипоксической гипоксии с гомеостатическими факторами (непрерывная линия – положительные корреляционные связи, пунктирная линия – отрицательные корреляционные связи).

значением рН, трансмембранным переносом сахаров и аминокислот. Na^+, K^+ -АТФазный насос потребляет около 30-40% энергии, утилизируемой клеткой. Таким образом, снижение активности транспортных АТФаз отражает уменьшение энергетического потенциала клетки и, в целом, устойчивости к деэнергизирующим воздействиям, к которым относится гипоксическая гипоксия.

Активация антиоксидантной системы (АОС) возникает при увеличении продукции активных форм кислорода и интенсивности ПОЛ. Этот компенсаторный механизм обеспечивает связывание и выведение из организма свободных радикалов, предохраняя многие компартменты клетки от разрушения окислителями. По нашим данным, у испытуемых с высоким уровнем ФРССС исходное функциональное состояние характеризовалось активированностью глутатионпероксидазы, высокими концентрациями спонтанного и индуци-

рованного МДА, низким содержанием восстановленного глутатиона. Поддержание высокого уровня восстановленного глутатиона осуществляется либо посредством синтеза, либо в результате его десорбции из связи с белками, или же путем восстановления окисленного глутатиона с участием фермента глутатионредуктазы и НАДФ×Н. Отмеченное уменьшение исходного содержания восстановленного глутатиона у испытуемых с низкой гипоксической резистентностью отражает тенденцию к истощению функционального потенциала АОС.

Анализ механизмов резистентности при экстремальной гипоксической гипоксии показал, что увеличение параметров ФРССС было сопряжено с прогрессирующим уменьшением значений факторов функционального потенциала эритроцитов и стрессиндуцированной гипергликемии, а также ростом показателей фактора эритроцитарной

интоксикации (см. рис 2). Уменьшение фактора функционального потенциала эритроцитов сопровождалось угнетением каталитической активности Na^+, K^+ -АТФазы эритроцитов. Уменьшение выраженности фактора стрессиндуцированной гипергликемии по мере снижения гипоксической резистентности было связано с уменьшением в крови концентрации кортизола и глюкозы, увеличением содержания молочной кислоты и лактатпируватного коэффициента. Гипергликемия является одним из механизмов экстренной адаптивной реакции организма и обеспечивает доступность легко усваиваемых энергетических ресурсов для органов и систем, функция которых активирована. Отрицательная взаимосвязь гипоксической резистентности с выраженностью стрессреализующих и стрессформирующих проявлений экстремальной реакции организма, на наш взгляд, отражает истощение функционального потенциала нейроэндокринной системы.

Неблагоприятным в оценке развития экстремальной гипоксической гипоксии следует считать прогрессирующее накопление в клетке недоокисленных продуктов катаболизма. К ним, в частности, относятся метаболиты низкой и средней молекулярной массы (МНСММ) и олигопептиды (ОП), определяемые нами в плазме крови и эритроцитах. В последнее время многочисленные экспериментальные и клинические данные позволили установить непосредственную зависимость и тесные взаимоотношения между содержанием МНСММ и степенью тяжести больного [4]. За этими метаболитами укрепилось название маркеров эндогенной интоксикации.

Активация катаболизма белка, ведущая к повышению содержания МНСММ и ОП, инициируется катехоламинами, глюкагоном, глюкокортикоидами, недостатком аминокислот. Непосредственными индукторами протеолиза являются лизосомальные и нелизосомальные протеазы.

В нашем исследовании ухудшение гипоксической резистентности было связано с накоплением в эритроцитах МНСММ ($r=0,52$, $p<0,05$), ОП в плазме ($r=0,43$, $p<0,05$). Интересно, что исходная интенсивность процессов протеолиза и, соответственно, фоновый уровень МНСММ у неустойчивых к гипоксии испытуемых был несколько ниже. Поскольку исходный энергетический потенциал клетки, определяемый по активности энергозависимого фермента Na^+, K^+ -АТФазы, у этих лиц был также снижен, можно полагать, что в основе ограниченной активности протеолитических процессов лежит низкая активность метаболизма. Действие пониженного парциального давления кислорода инициировало у этих испытуемых усиление протеолиза.

Таким образом, развитие экстремальной гипоксической гипоксии и уменьшение устойчивости к ней сопряжено с формированием нескольких сопряженных синдромокомплексов:

- дефицита функционального потенциала нейроэндокринной системы;
- эндогенной интоксикации;
- истощения функциональных ресурсов антиоксидантной системы;
- нарушений антигенно-структурного гомеостаза;
- энергетического дисбаланса.

Синдром дефицита функционального потенциала нейро-эндокринной системы характеризуется уменьшением активации ведущих систем срочной адаптации организма – симпатoadrenalовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем. Относительно низкая активированность эндокринных систем сопровождается ослаблением выраженности стрессреализующих реакций организма на чрезвычайный раздражитель. Прежде всего, это относится к гипергликемии, выраженность которой по мере снижения устойчивости к гипоксии уменьшается. Вероятно, к проявлениям этого синдрома следует отнести также уменьшение реактивности системы крови, что проявляется в снижении выраженности лимфопении и нейтрофилеза. Важным показателем, связанным с ограниченной устойчивостью к экстремальной гипоксической гипоксии, является увеличение выведения с мочой продуктов катаболизма глюкокортикоидов. Можно полагать, что ведущими механизмами синдрома дефицита нейроэндокринной системы являются ослабление энергопродуцирующих процессов в нейронах и интенсификация катаболизма секретируемых гормонов.

Синдром эндогенной интоксикации проявляется накоплением во внутренней среде организма и клетке недоокисленных продуктов катаболизма. Вероятно, системная одновременная инициация процессов протеолиза, ПОЛ и сохранения антигенно-структурного гомеостаза, возникающая при действии чрезвычайного раздражителя, приводит к потенцированию синдрома эндогенной интоксикации.

Синдром истощения функциональных ресурсов антиоксидантной системы возникает как следствие истощения субстратов АОС, обеспечивающих связывание и выведение из организма продуктов перекисного и свободно-радикального окисления. В нашем исследовании ослабление гипоксической резистентности было сопряжено с уменьшением концентраций восстановленного глутатиона и сульфгидрильных радикалов. Такое смещение равновесного состояния АОС в сторону окисленных форм обуславливается либо избыточной инициацией процессов ПОЛ, либо ингибированием механизмов восстановления глутатиона. При экстремальной гипоксической гипоксии, очевидно, имеют место оба названных процесса. Если учесть, что в глутатионредуктазной реакции, обеспечивающей восстановление глутатиондисульфида, используется НАДФН, нарабатываемый в пентозофосфатном шунте, а активность ключевого фермента последнего – Г-6-ФДГ, ингибируется, становится ясен один из механизмов угнетения восстановления глутатиона. В нашем исследовании выявлена исходно высокая прооксидантная готовность тканей у испытуемых с ослабленной гипоксической резистентностью.

Изменения антигенно-структурного гомеостаза, выявленные нами при экстремальной гипоксии, характеризовались вовлечением в системную реакцию организма всех звеньев неспецифической и специфической иммунной защиты. Одним из проявлений этой реакции являлось уменьшение реактивности системы крови, проявлявшееся в ослаблении стрессиндуцированных лимфопении и нейтрофилеза. Сопостав-

ление показателей фагоцитоза у лиц с высокой и низкой гипоксической резистентностью, выявило у последних относительное повышение активности фагоцитирующих клеток. Если соотнести эти данные с выявленными повышением концентрации сывороточных иммуноглобулинов, прогрессирующим накоплением во внутренней среде организма МНСММ и ОП, а также интенсификацией процессов апоптоза, то формируется представление о развитии аутоиммунной реакции. При этом, в качестве аутоантигенов могут выступать фрагменты деградирующих клеток, разрушающихся под действием продуктов ПОЛ.

Синдром энергетического дисбаланса развивается как следствие нарушения базальных окислительно-восстановительных процессов на уровне клетки и проявляется при экстремальной гипоксической гипоксии в системном угнетении активности ключевых ферментов гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного шунта и трансмембранного переноса электролитов. По мере ослабления гипоксической резистентности уменьшение эффективности энергопродуцирующих процессов сопряжено с накоплением во внутренней среде и клетке молочной и пировиноградной кислот, МНСММ и ОП, продуктов ПОЛ и окисленных субстратов АОС, инициацией процессов программированной клеточной гибели, аутофагоцитоза и угнетением функциональной активности Т-лимфоцитов. Такая динамика биохимических и иммунологических показателей при продолжающемся чрезвычайном гипоксическом воздействии может реализоваться в повреждении биологических мембран с измене-

нием в них трансмембранного заряда, коллоидного состояния белков, нарушением функции Na^+/K^+ - и Ca^{++} насосов, проницаемости и структуры мембран. При гипоксической гипоксии, в первую очередь, такие повреждения будут развиваться в клетках ЦНС как наиболее чувствительной к дефициту кислорода.

Роль ЦНС исключительно важна в своевременном и последовательном включении реакций, тонком балансировании сложных взаимоотношений между адаптивными изменениями деятельности отдельных систем организма к создавшимся условиям кислородного дефицита. Наиболее уязвимыми при дефиците кислородного обеспечения являются нейроны больших полушарий. При действии пониженного парциального давления кислорода в начале нарушается способность воспринимать индифферентные раздражители и сигналы, которые не имеют большого биологического и социального значения. Высоко информативными при экспресс-диагностике функционального состояния ЦНС являются методики исследования времени и варибельности ПЗМР и СЗМР. Анализ взаимосвязей ФОР с показателями сердечно-сосудистой и респираторной систем при экстремальной гипоксической гипоксии показал, что у испытуемых с неудовлетворительным функциональным состоянием ЦНС энерготраты, потребление кислорода, кислородный эффект дыхательного и сердечного циклов, ЧСС, частота и минутный объем дыхания были существенно ниже соответствующих показателей группы сравнения (рис. 3).

Особенно отчетливо эта ограниченность функциональных резервов кислородтранспортной системы проявлялась

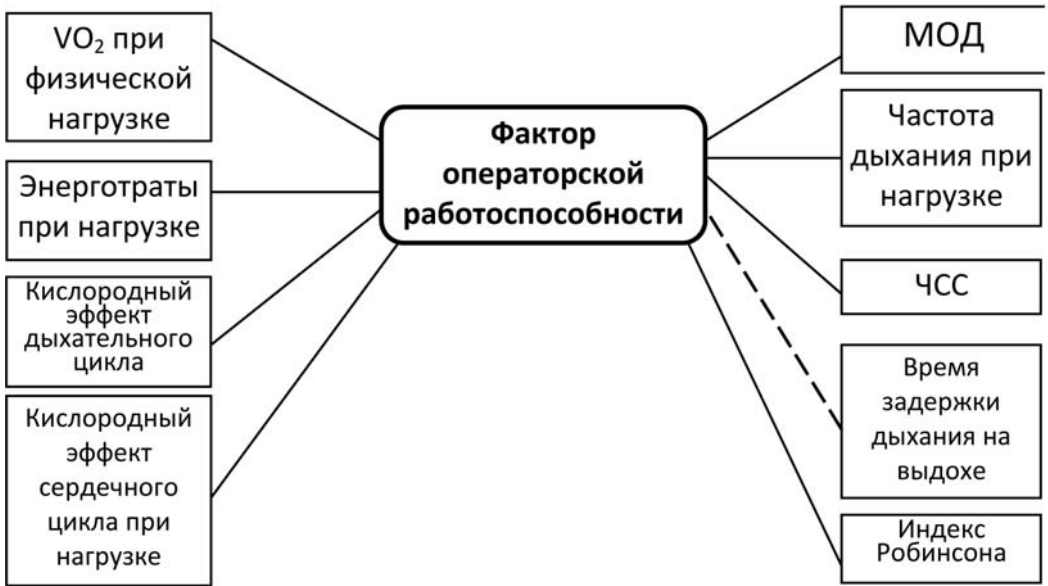


Рис. 3. Граф корреляционных связей фактора операторской работоспособности при экстремальной гипоксической гипоксии с показателями сердечно-сосудистой и респираторной систем (непрерывная линия – положительные корреляционные связи, пунктирная линия – отрицательные корреляционные связи).

при выполнении дозированной физической нагрузки, когда происходит потенцирование эффектов гипоксической гипоксии и гипоксии нагрузки. Поскольку показатели исходного функционального состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем у испытуемых с различными параметрами ФОР не различались, можно полагать, что сниженный уровень функционирования кислород-транспортных и кислородпотребляющих систем организма обусловлен ограниченностью механизмов вегетативной регуляции и тканевого дыхания.

Еще одним аспектом проблемы устойчивости к гипоксической гипоксии является индивидуальная особенность реакции организма на воздействие. Имеются данные о том, что у животных, реагирующих на острую гипоксию увеличением симпатoadреналовых вли-

ятий и гиперфункции кровообращения, в процессе дальнейшей гипоксической тренировки развивается повышенная гипоксическая устойчивость. Напротив, у животных, реагирующих на острую гипоксическую гипоксию увеличением парасимпатических влияний и гипофункцией кровообращения, при том же режиме тренировки адаптация не развивается. Было установлено, что индивидуальные особенности реактивности системы кровообращения в первую очередь связаны с функциональными свойствами кардиовазомоторного центра [6]. Различия механизмов нейроэндокринной регуляции энергетического метаболизма выявлено также у людей с гипо- и гиперкинетическими типами кровообращения [7]. Эта специфика регуляции сохраняется в условиях действия гипоксического стимула и определяет характер

нарушений и особенности адаптации к действию экстремальных раздражителей.

Применительно к нашему исследованию, можно предполагать, что обусловленное гипоксией ухудшение функционального состояния ЦНС связано с ранним развитием энергетического дисбаланса в нейронах и ослаблением функций кислородтранспортных систем организма.

Фактор метаболического напряжения отражает интенсификацию катаболизма углеводов, процессов глюконеогенеза с угнетением образования конечного продукта белкового обмена – мочевины, гормонозависимое повышение концентрации сывороточного кальция и уменьшение активности щелочной фосфотазы. Последнее, вероятно, обусловлено закислением внутренней среды организма за счет накопления недоокисленных катаболитов и протонов. Сопряженность прогрессирующего ухудшения операторской работоспособности со спецификой метаболизма углеводов и белков проявлялась в достоверных связях ФОР с концентрациями в крови лактата ($r=-0,54$, $p<0,05$), пирувата ($r=-0,59$, $p<0,01$), мочевины ($r=0,61$, $p<0,01$) и активностью АСТ ($r=-0,53$, $p<0,05$), а также с содержанием продуктов протеолиза – олигопептидов плазмы ($r=-0,47$, $p<0,05$) и эритроцитов ($r=-0,44$, $p<0,05$). Нарастание лактацидемии и увеличение содержания креатинина ($r=-0,75$, $p<0,001$) свидетельствует об интенсивном распаде макроэргов и развитии вторичной тканевой гипоксии.

Таким образом, критическое ухудшение функционального состояния ЦНС при гипоксической гипоксии сопряжено с активацией эндокринной регуляции,

интенсификацией катаболизма белков, жиров и углеводов, развитием начальных признаков вторичной тканевой гипоксии. Раннее развитие нарушений функций ЦНС определяется сниженными функциональными резервами кислородтранспортных систем организма и неадекватной потребностям нейронов доставкой кислорода, что обуславливает прогрессирующее развитие энергетического дисбаланса.

Заключение

Полученные данные позволяют утверждать, что существует, как минимум, два механизма развития экстремальных состояний при гипоксической гипоксии. Для одного варианта острой гипоксии *locus minoris resistentia* является ЦНС. Выраженное напряжение стрессиницирующих и стрессреализующих проявлений не компенсирует развитие энергетического дисбаланса нейронов. Угнетение функций нейронов и уменьшение стимулирующих влияний на сердечно-сосудистую систему приводит к ухудшению функционирования кислородотранспортных систем организма. Для этого варианта острой гипоксической гипоксии основными неблагоприятными проявлениями нарушений гомеостаза являются прогрессирующее ухудшение функционального состояния ЦНС и развитие вторичной тканевой гипоксии. Второй вариант развития острой гипоксической гипоксии реализуется у лиц с удовлетворительным функциональным состоянием ЦНС и повышенной реактивностью сердечно-сосудистой системы. Ведущими признаками экстремальности у этих испытуемых является системное вовлечение в реакцию всей иерархии механизмов сохранения

гомеостаза с развитием сопряженных синдромокомплексов дефицита функционального потенциала эндокринной системы, эндогенной интоксикации, истощения функциональных ресурсов антиоксидантной системы, нарушений антигенно-структурного гомеостаза и энергетического дисбаланса.

Таким образом, при создании биологических моделей экстремальной гипоксии у лабораторных животных необходимо формирование как минимум моделей двух типов:

- биологической модели с пониженной резистентностью нервной ткани к энергодефициту, не компенсируемому напряжением кислородтранспортной системы организма.
- биологической модели с проявлениями исходного напряжения и истощения регуляторных и энергопродуцирующих механизмов внецентральной локализации (нарушения функции печени, легких, сердца, кроветворных тканей, иммунитета).

Создание биологических моделей первого типа возможно путем направленной селекции низко устойчивой к гипоксии части популяции мелких лабораторных животных (выведение и поддержание специальных линий). Исходно сниженная резистентность нервной ткани к энергодефициту у животных специальных линий делает их интересными моделями не только для испытания классических антигипоксантов, но и фармакомоделирования процессов восстановления после черепно-мозговых травм, острых или хронических нарушений мозгового кровообращения, нейроинфекций и нейроинтоксикаций,

оперативных вмешательств на ЦНС, критической гипертермии (тепловые и солнечные удары).

В фармакологических исследованиях на низко устойчивых к гипоксии линиях животных должны изучаться препараты с антигипоксическим, антиоксидантным, ноотропным, противоастеническим, нейропротекторным действием, а также средства повышения физической работоспособности.

Второй подход, связанный со снижением резистентности к гипоксии при избыточном напряжении и истощении регуляторных и энергопродуцирующих механизмов, может быть использован для подтверждения адекватности биологического моделирования патологических процессов (например, бронхообструктивных заболеваний, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, гепатитов, аутоиммунных поражений, радиационных поражений, поражений экотоксикантами). Проведение тестирования биологических моделей на индивидуальную устойчивость к гипоксическому воздействию до и после применения средств лечебно-профилактического или реабилитационного действия позволит объективизировать динамику патогенеза (или саногенеза) и более качественно оценить эффективность новых лекарственных средств или новых медицинских технологий (включая клеточные технологии). В исследованиях, проводимых в рамках этого направления, целесообразно использовать линии лабораторных животных с высокой резистентностью к гипоксии, чтобы исключить влияние фактора низкой индивидуальной гипоксической устойчивости на результат последующего тестирования.

Список литературы

1. Беркович Е.М. Энергетический обмен в норме и патологии. М.: Медицина. 1964. 334 с.
2. Захаров А.В., Мороз М.П., Перельгин В.В. Оценка работоспособности операторов с помощью статистических характеристик простой зрительно-моторной реакции // Воен.-мед.журн. 1988. № 1. С. 53-56.
3. Колчинская А.З.О классификации гипоксических состояний // Специальная и клиническая физиология гипоксических состояний. Киев: Наук. думка. 1979. Ч. 1. С. 9-16.
4. Малахова М.Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации. Пособие для врачей. СПб.: Изд-во С.Петербур. мед. акад. последиплом. образования. 1995. 35 с.
5. Новиков В.С, Горанчук В.В., Шустов Е.Б. Физиология экстремальных состояний. СПб. 1998. 247 с.
6. Хитров Н.К., Пауков В.С. Адаптация сердца к гипоксии. М.: Медицина. 1991. 237 с.
7. Яковлев Г.М., Карлов В.А., Дьяконов И.И., Дикань В.Е. Типы кровообращения здорового человека: нейрогуморальная регуляция энергетического метаболизма в условиях основного обмена // Ч. 1. Физиология человека. 1991. Т. 17. № 4. С. 88-104., Ч.2. Физиология человека. 1992. Т. 18. № 6. С. 86-108.
8. Gollnick D.P., Hermansen L. Biochemical adaptation to exercise: anaerobic metabolism // Exercise and sport sciences. NY. 1973. Vol.1. 143 P.

Physiological justification of requirements to laboratory models for optimization of screening antihypoxic parameters activity by criteria of resistance to an extreme hypobaric hypoxia

Е.В. Shustov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, V.P. Ganapolskiy,
M.K. Rzhpetskaya

Results of research of indicators of a functional condition and metabolism of healthy volunteers in the conditions of altitude chamber lifting on heights of 3500, 4500, 5000 and 6000 m are presented. It is shown that stay at the height of 6000 is accompanied by development of an extreme hypoxemic condition in which formation, except specific symptoms of violations from CNS and excess reactivity of oxygen transport mechanisms, nonspecific complex of deficiency of functional capacity symptoms of neuron- and endocrine systems, endogenous intoxication, exhaustion of functional reserves of antioxidant system, violations of an antigen-structural homeostasis, a power imbalance play an important role. For formation of adequate biological model of pathological processes it is necessary to allocate 2 types of violations of resistance to a hypoxia: specific violations of a metabolism in nervous tissues, and nonspecific, connected with processes in other bodies and tissues.

Key words: hypoxia, extreme conditions, nonspecific mechanisms of resistance, biological modeling.

Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике

Е.Е. Ачкасов^{1,2}, Э.Н. Безуглов¹, А.А. Ульянов¹, В.В. Куршев¹,
А.Д. Репетюк¹, О.Н. Егорова¹

¹ – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

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

Контактное лицо: Ульянов Александр Анатольевич alexu@inbox.ru; тел: 8-926-171-91-13

В статье отражены наиболее актуальные аспекты применения в различных областях медицины современной биомедицинской технологии – аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами. В последнее десятилетие отмечается значительный рост интереса к данной биотехнологии, что обусловлено ее высокой эффективностью при высоком уровне безопасности и низкой себестоимости. В настоящее время аутоплазма, обогащенная тромбоцитами активно применяется в хирургии, стоматологии, травматологии и ортопедии, спортивной медицине, косметологии и дерматологии, комбустиологии. В то же время до сих пор отмечен явный недостаток оценки эффективности применения и отдаленных результатов аутоплазмы с точки зрения доказательной медицины. Аутоплазма, обогащенная тромбоцитами обладает рядом полезных свойств: ускоряет процессы регенерации тканей, противовоспалительный эффект, снижение болевого синдрома, что открывает еще большие перспективы для применения в хирургии, травматологии.

Ключевые слова: обогащенная тромбоцитами аутоплазма, регенерация, травматология, хирургия, дерматология, стоматология, комбустиология, спортивная медицина.

Введение

Положительный эффект от аутогемотерапии известен врачам с начала XX века. В 1905 году хирург Август Бир провел первый эксперимент по использованию аутогемотерапии для лечения переломов, создавая искусственные гематомы. В дальнейшем неоднократно врачи использовали аутогемотерапию, что бы стимулировать защитные реакции больных инфекционными заболеваниями, фурункулезом, хроническими воспалительными заболеваниями [1].

Специалисты, применявшие аутогемотерапию, отмечали выраженную активизацию репаративных процессов:

ускоренное заживление ран при восстановлении после травм и оперативных пособий, положительную динамику при гнойных процессах кожи и мягких тканей, ускоренное выздоровление при хронических воспалительных заболеваниях [4].

В известной работе выдающегося хирурга В.Ф. Войно-Ясенецкого «Очерки гнойной хирургии», подробно описано применение аутогемотерапии во время его работы в военном госпитале в 1904-1905 годах [7]. *Хорошие результаты и минимальная частота побочных эффектов на многие годы сделали аутогемотерапию и аутосеротерапию часто*

используемыми вспомогательными методами лечения рецидивирующих или вяло текущих гнойных процессов и длительно незаживающих ран вплоть до начала эры антибиотиков с широким антимикробным спектром [1]. Однако после смерти профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого данные методы лечения стали применяться гораздо реже.

В 1965 г. исследователь из Калифорнийского университета применял для стимуляции остеогенеза дефектов костей лицевого скелета обогащенную тромбоцитами плазму, как фактор, способствующий увеличению количества остеоиндуктивного морфогенетического белка («BMP — bones morphogenetic protein»). Он руководствовался работами коллег, где присутствовали данные о сильно выраженной остеогенной и хондрогенной активности субстанции, содержащихся в альфа-гранулах тромбоцитов [6, 53]. В дальнейшем данная методика нашла достаточно широкое применение в различных областях медицины: кардиологии под названием «тромбоцитарный концентрат» или «тромбоцитарный гель», в челюстно-лицевой хирургии, где данная методика применялась для улучшения качества регенерата и ускорения имплантирования «анкеров» [52].

В последние годы показана способность комплексной регуляции со стороны факторов роста нормализации структуры ткани и реакции на её повреждение, отмечена важная роль и эффективность использования факторов роста для восстановления поврежденных тканей [28, 40, 42, 45]. Поэтому, использование факторов роста представляется полезным в клинической практике, поскольку это способствует

быстрому излечиванию с восстановлением полноценной ткани и обеспечивает быстрое и безопасное возвращение к неограниченной деятельности. Богатая тромбоцитами плазма (PRP) – простой, дешевый и минимально инвазивный способ получить естественную концентрацию аутологических факторов роста, поэтому в настоящее время широко проводятся эксперименты в различных областях медицины для выявления ее способности способствовать регенерации ткани с низким заживляющим потенциалом. Области применения: спортивная медицина, ортопедия, стоматология, дерматология, офтальмология, пластическая и челюстно-лицевая хирургия и т.д. [22, 50].

Наконец, было замечено, что хотя секреция фактора роста происходит, главным образом, в течение первого часа, тромбоциты остаются жизнеспособными в течение 7 дней и продолжают генерировать факторы роста, соответственно было сделано предположение, что одна единственная инъекция в поврежденную ткань могла бы быть достаточным лечением в большинстве клинических наблюдений [37]. Исходя из этого, казалось бы, ясно, что данный перспективный инновационный подход следует применять как можно шире в клинической практике. Однако, существующие данные по использованию PRP в доклинических и клинических исследованиях спорны [18, 49]. Если литература о роли изолированных факторов роста при регенерации ткани широко представлена, то исследований на животных и клинических исследований, продемонстрирующих реальный потенциал PRP, способствующий восстановлению различных тканей, недостаточно.

Механизм действия обогащённой тромбоцитами аутоплазмы (ОТА)

Тромбоциты обычно известны своей ролью в гемостазе, но они также играют ключевую роль как промежуточное звено в процессе заживления поврежденной ткани за счёт способности выделять из своих α -гранул факторы роста [34, 51]. Тромбоциты содержат пулы хранения факторов роста включая полученный из тромбоцитов фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), тромбоцитный эпидермальный фактор роста (PDEGF), сосудистый фактор эндотелиального роста (VEGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), фибробластический фактор роста (FGF) и эпидермальный фактор роста (EGF) [22, 50, 21] (табл.1).

Альфа-гранулы являются также источником цитокинов, хемокинов и многих других белков [12], по-разному вовлеченных в стимулирование хемотаксиса, пролиферацию клеток и созревание, модуляцию подстрекательских молекул и привлечение лейкоцитов. Кроме того, тромбоциты хранят антибактериальные и фунгицидные белки, способные предотвращать инфекции, протеазы, такие как металлопротеаза-4 и факторы коагуляции [12]. Помимо альфа-гранул, тромбоциты содержат плотные гранулы, которые хранят и выделяют после активации АДФ, АТФ, ионы кальция, гистамина, серотонина и допамина [38]. Наконец, тромбоциты содержат лизосомные гранулы, которые могут секретировать кислотные гидролазы, ка-

Таблица 1

Факторы роста α -гранул тромбоцитов

Фактор	Функции
Эпидермальный фактор роста (PD-EGF)	Активация пролиферации эпидермальных и эпителиальных клеток, закрытие кожной раны, стимулирование ангиогенеза.
Трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β 1 и β 2)	Регуляция метаболизма костной ткани, апоптоз, усиление синтеза белков межклеточного матрикса
Тромбоцитарный фактор роста (PDGF A+B)	Активация фибробластов и миоцитов гладкомышечной ткани, клеточного роста, стимуляция синтеза коллагена и гликозаминогликанов, усиление образования грануляционной ткани, формирование матрикса коллагена и кости с участием костных морфогенетических белков, стимулирование ангиогенеза
Инсулиноподобные факторы роста (IGF-I,II)	Стимуляция пролиферации клеток костной и хрящевой тканей, активация ангиогенеза, стимуляция заживления мышечной ткани
Васкулоэндотелиальные факторы роста (VEGF, ECGF)	Стимуляция роста новых кровеносных сосудов, антиапоптоз
Основной фактор роста фибробластов (bFGF)	Стимуляция ангиогенеза и пролиферации фибробластов, экспрессия в костной ткани, улучшение заживления мышечной ткани

тепсин D и E, эластазы и лизозим [13], и наиболее вероятно другие, пока еще недостаточно хорошо изученные молекулы, роль которых в процессе восстановления ткани нельзя недооценивать. Тот факт, что тромбоциты секретируют факторы роста и активные метаболиты, означает, что их прикладное использование может иметь положительное влияние в клинических ситуациях, требующих быстрого эффекта и регенерации ткани. ОТА является минимально инвазивным методом получения концентрата

тромбоцитов и, соответственно, аутологических факторов роста и многих других биологически активных молекул, а их применение в форме тромбоцитного геля могло бы в дальнейшем стать преимуществом, которое в виде клейкой плёнки обеспечивало бы дальнейшую их секрецию в нужном месте [13].

ОТА определяется как производное крови с более высокой концентрацией тромбоцитов по сравнению с исходной кровью, полученное дифференциальным центрифугированием аутологиче-

Таблица 2

Биологически активные молекулы альфа-гранул тромбоцитов

Название	Функции
Фибриноген	Каскад свертывания крови (образование фибринового сгустка)
Адгезивные белки	Фибронектин: связывание с интегринами на поверхности клеток, влияние на клеточную адгезию, клеточный рост, миграция и дифференциация Витронектин: клеточная адгезия, хемотаксис Тромбоспондин-1: ингибирование ангиогенеза
Факторы свертывания	Фактор V, фактор XI, белок S, антитромбин. Принимают участие в активации тромбина и в формировании фибринового сгустка
Фибринолитические факторы	Плазминоген: предшественник плазмина, расщепляющий фибрин Ингибитор урокиназа: регуляция образования плазмина α -2 антиплазмин: инактивация плазмина
Протеазы и антипротеазы	TIMP-4: регуляция расщепления матрикса Металлопротеиназа-4: расщепление матрикса α -1 антитрипсин: ингибирование широкого спектра ферментов и протеиназ
Основные белки	Тромбоцитарный фактор 4: ингибирование ангиогенеза β -тромбоглобулин: активация тромбоцитов, ингибирование ангиогенеза Эндостатины: ингибиторы миграции эндотелиальных клеток и ангиогенеза
Мембранные гликопротеины	CD40-лиганд: воспаление, синтез интерлейкинов и интегринов, адгезия тромбоцитов к эндотелию, клеточная передача сигналов, модуляция интерлейкин-активируемой молекулы-1 (PECAM-1) на лейкоцитах P-селектин: молекула адгезии сосудистого эндотелия, помогает связыванию и миграции лейкоцитов в область воспаления

ской цельной крови [6]. Более детально элементы ОТА единообразно описаны в литературе не были. ОТА – это плазма, концентрация тромбоцитов в которой превышает нормальную в 3-3,5 раза. В норме концентрация тромбоцитов в среднем 220 000 клеток на мкл. Клинически эффективной считают концентрацию ОТА имеющей приблизительно 400% тромбоцитов от их уровня в периферической крови, т.е. она должна содержать ≥ 1 миллион тромбоцитов на микролитр [37]. Однако, в литературе сообщается о большей вариабельности концентрации PRP [17], что клиническая эффективность PRP была продемонстрирована [17, 50] даже при меньших концентрациях.

Различные способы получения обогащенной плазмы, различные концентрации тромбоцитов, возможность присутствия лейкоцитов в тромбоцитарном концентрате и многие другие факторы, искажая результаты исследований, усложняют как доклинические исследования в этой области, так и клиническую оценку эффективности этого подхода для ускорения процессов репарации тканей.

Лизированная ОТА α -гранул тромбоцитов так же содержит семь основных факторов роста: PDGF — тромбоцитарный фактор роста, TGF – трансформирующий фактор роста (α и β), VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, EGF – фактор роста эпителия и т.д. [21, 50].

Данные эндогенные факторы роста находятся в определенном соотношении. Эндоцеллюлярное количество детерминировано на генетическом уровне, сфера их воздействия рецепторы клеточных мембран стволовых клеток, где они проявляют высокую степень аф-

финности, вызывая их пролиферацию. Данные субстанции (PDGF – platelet derivate growth factor, VEGF – vessels endothelium growth factor, TGF – tissue growth factor) и др.) обладают олигопептидной структурой и принадлежат к группе «факторов роста», к которым также относятся эпидермальный фактор роста, инсулин и некоторые другие, отличительной чертой которых является повышенная степень аффинности и продолжительное время начального воздействия на рецепторы [37].

Сфера воздействия факторов роста в отличие от истинных мутагенов (ионизирующее излучение, канцерогены, недоокисленные радикальные группы и прочие), «факторы роста» не воздействуют на наследственный хромосомный аппарат клетки, а влияют на мембранные клеточные рецепторы I и II типа, что способствует ускорению роста и дифференцировки здоровых клеток-предшественников. Основным результатом исследований в этом разделе остеологии является обширное применение богатой тромбоцитами плазмой в лечении дефектов кости челюстно-лицевой области – «вживление имплантатов» [52].

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) является основным фактором (митогеном) для определенных групп клеток: фибробластов, клеток гладкой мускулатуры и других типов клеток. PDGF занимает основную из ведущих ролей в эмбриогенезе и регенерации поврежденных тканей. Выявлено и доказано его хемоаттрактантное и пролиферативное влияние на все клетки, принимающие участие в раневом процессе, отмечено выраженное влияние на клетки мезенхимального происхожде-

ния. Активированные тромбоциты являются главным источником PDGF-BB. Изначально PDGF обнаружили в сыворотке крови, но он отсутствует в свободной от клеток плазме крови [10, 25]. Синтез PDGF происходит не в тромбоцитах, его синтез осуществляется в мегакариоцитах и запасается в α -гранулах. При разрушении одного тромбоцита высвобождается примерно 1200 молекул PDGF [4]. Общая концентрация всех изоформ PDGF в сыворотке крови поддерживается на постоянном уровне и составляет 50-60 нг/мл. Известно, что межклеточный коллагеновый матрикс связывает PDGF [41, 19].

В организме клетки контактируют с плазмой и тканевой жидкостью, поэтому местная секреция PDGF играет значимую роль в регуляции их пролиферации [55]. В процесс заживления раны вовлекаются клетки, находящиеся непосредственно в зоне повреждения. Активация и распад тромбоцитов являются стартом для процесса заживления ран. PDGF-BB индуцирует направленное перемещение (хемотаксис) основных клеточных ти-

пов, принимающих участие в процессе репарации: лейкоциты, макрофаги, фибробласты [11, 55]. В различных типах клеток при стимуляции PDGF повышается уровень экспрессии генов PDGF, а также происходит секреция PDGF-подобных медиаторов [27].

Тромбоциты содержат плотные гранулы с биологически активными молекулами, они не являются ростовыми факторами, но принимают участие в биохимических и обменных процессах организма, в том числе в воспалительных и регенеративных реакциях [1].

Использование ОТА в различных областях медицины.

Обогащенную тромбоцитами аутоплазму получают путем центрифугирования цельной крови [1, 37]. Большинство специалистов использует инъекционный способ введения [1, 20, 36]. Описаны случаи применения в виде аппликаций на раневую поверхность [9, 23].

Травматология. Применения обогащенной тромбоцитами аутоплазмы, с целью оптимизации процессов репара-

Таблица 3

Биологически активные молекулы, содержащиеся в плотных гранулах тромбоцитов

Название	Биологическое действие
Серотонин	вазоконстриктор, увеличивает проницаемость капилляров, привлечение макрофагов
Гистамин	повышает проницаемость капилляров, привлечение и активация макрофагов
Допамин	нейромедиатор, регулирующий частоту сердечных сокращений и артериальное давление
АДФ	индуцирует агрегацию тромбоцитов
АТФ	принимает участие в реакции тромбоцитов при взаимодействии их с коллагеном
Ca ²⁺	кофактор, принимает участие в агрегации тромбоцитов и образовании фибрина
Катехоламины	биогенные амины, участвующие в обменных процессах и поддержании внутренней среды и устойчивости

тивного остео- и хондрогенеза помогло улучшить результаты хирургического лечения больных с дефектами костной и хрящевой тканей [6]. Авторы применили обогащенную аутоплазму при оскольчатых внутрисуставных переломах для адгезии свободно лежащих фрагментов хряща с субхондральной костью, что позволило избежать их удаления или фиксации имплантатами. Другие авторы использовали факторы роста у пациентов, подвергшихся артроскопическому вмешательству на плечевом суставе в связи с повреждением его вращательной манжеты, а также при замещении дефекта манжеты мембраной из аутологичного насыщенного факторами роста фибрина. В этих исследованиях получены положительные результаты, заключающиеся в уменьшении интенсивности болевого синдрома и заживлении дефекта манжеты плеча через 6 месяцев [36]. Опубликована работа в которой произведена оценка безопасности и результатов восстановления вращателя плеча с использованием факторов роста в рамках пилотного исследования на 14 пациентах и получил многообещающие устойчивые результаты по итогам 24-месячного наблюдения [46]. Некоторые исследования посвящены изучению эффективности применения факторов роста при хронических повреждениях капсульно-связочного аппарата. Сообщено о хороших результатах, которые были достигнуты при лечении хронического тендинита локтевого сустава с выраженным болевым синдромом [38]. Полученные данные об эффективности факторов роста были подтверждены и в другой работе, где обнаружен, более значимый эффект от их применения по сравнению с инъекциями кортикостеро-

идов при однолетнем наблюдении [44]. В другом исследовании описаны предварительные результаты многократных инъекций факторов роста при лечении тендинопатии собственной связки надколенника и сделано заключение о безопасности и перспективности данной методики [20, 30, 54]. В исследовании с участием 15 пациентов, страдающих от хронического синдрома «колена прыгуна», сообщено, что после того, как предыдущее консервативное или хирургическое лечение этой патологии не дало желательного результата, были применены многократные инъекции тромбоцитарных факторов роста (ТФР), в результате чего у большинства пациентов наступило заметное улучшение и они смогли восстановить свою прежнюю повседневную активность [20]. Применение ТФР имеет большой потенциал при лечении повреждений боковых и крестообразных связок коленных суставов [31, 56]. Повреждения медиальной коллатеральной связки (МКС) являются одними из наиболее распространенных среди активного населения и неадекватное лечение их повреждений может приводить к раннему развитию остеоартроза у 13% пациентов [33, 34]. Поэтому в настоящее время существует потребность в методе, способным ускорить и сделать более качественным заживление этой связки. Опубликованы данные об улучшении показателей максимальной нагрузки на разрыв и окончательных показателей на растяжение после использования ТФР при повреждении МКС у кроликов [26]. В другом исследовании показано увеличение прочности связки на 73% в течение 12 дней после начала их использования [32]. Есть статьи в которых сообщают о многообеща-

ющих результатах использования ТФР для лечения связки, если оно применялось в соответствующих дозах вскоре после травмы [14].

Имеются работы, описывающие положительный эффект внутрисуставных инъекций аутоплазмы при сравнении с традиционными методами лечения остеоартрозов крупных суставов. Наиболее значимый эффект получен при лечении гонартроза по сравнению с другими локализациями остеоартрозов. Проведенное лечение позволило в короткие сроки ликвидировать болевой синдром, улучшить функцию суставов, значимо сократить длительность болевого синдрома и увеличить длительность ремиссии [20, 30, 50].

Применены инъекции тромбоцитарного концентрата при лечении остеоартрита коленного сустава, с использованием в качестве контроля инъекций гиалуроновой кислоты, и показал лучшее обезболивание и физическое улучшение функции при использовании ТФР [50].

На основании результатов лечения с помощью внутрисуставных инъекций ТФР у 100 пациентов с гонартрозом, сделаны выводы о безопасности метода, уменьшении болевых ощущений и улучшении функциональности коленного сустава в течении как минимум 9 месяцев. В качестве побочных эффектов он указал на минимальное количество умеренно выраженных болевых реакций и местный тканевой отек, которые сохранялись не более 2 дней [30]. Среди этих пациентов при наблюдении через 2, 6 и 12 месяцев, отмечалось статистически достоверное улучшение по всем оцениваемым параметрам. Тенденция к ухудшению наблюдалась при однолетнем и двухлетнем наблюдениях.

Более длительный эффект наблюдался у молодых людей с низким индексом массы тела и незначительной степенью повреждения хряща, тогда как в других группах пациентов наблюдались менее устойчивые результаты [20].

Комбустиология. Отдельного внимания заслуживает работа по использованию раневой повязки, состоящей из тонкой коллагеновой губки в сочетании с фактором PDGF-BB на процесс заживления ожоговых ран IIIA степени [7]. Местное лечение ожоговых ран с применением биологической повязки на основе коллагена типа I с PDGF-BB приводит к сокращению сроков эпителизации до 5-7 суток и предупреждает развитие местных гнойно-некротических осложнений, что в 2-3 раза ускоряет процесс регенерации эпителия ожоговых ран IIIA степени и позволяет сократить время пребывания пациентов на стационарном лечении.

Спортивная медицина. Восстановление ткани при скелетно-мышечных травмах – часто является медленным, а в некоторых случаях и незавершенным процессом [15, 43]. Для спортсменов или профессиональных атлетов влияние скелетно-мышечных повреждений на качество жизни и работоспособность значительно больше, чем для обычных людей, поэтому быстрое восстановление полной работоспособности и возвращение к соревнованиям имеют главенствующее значение [49]. Многочисленные исследования показали хорошие результаты лечения сухожилий различной локализации с использованием ТФР [16, 29]. Основным сдерживающим фактором использования ТФР у спортсменов до недавнего времени являлся недоста-

точный объем проведенных клинических исследований в этой группе пациентов [37].

В то же время, ТФР уже достаточно активно применяются для улучшения и ускорения восстановления капсульно-связочного аппарата, а большинство исследований в этой области уже охватывает и доклиническую и клиническую стадию их применения при лечении этого вида тканей [5, 37]. ТФР в настоящее время используются при лечении наиболее частых повреждений различных структур опорно-двигательного аппарата, а применение этого метода приобретает все больше сторонников [38, 46].

Использованы ТФР при лечении повреждений суставного хряща у футболистов и при этом получены ускоренное и полное восстановление суставного хряща с быстрым возобновлением спортивной деятельности без признаков перенесённой травмы [50]. В ряде других исследований при лечении хронических повреждений ахиллового сухожилия у спортсменов обнаружено более быстрое восстановление функций при минимальном количестве осложнений у спортсменов, при лечении которых применяли ТФР, что обуславливало сокращение общих сроков лечения [48, 50]. Многократные инъекции ТФР использовались при лечении острого частичного разрыва ахиллова сухожилия у спортсменов. При этом отмечено более быстрое восстановление ткани, зафиксированное с помощью МРТ и УЗИ, что позволило в кратчайшие сроки восстановить полную функциональность и обеспечить возвращение к полноценной спортивной деятельности [20]. Показана эффективность ТФР при лечении повреждений

мышц бедра у футболистов, причем эффективность оставалась одинаково высокой при повреждениях любой тяжести [24, 47].

Стоматология. Гелевая форма аутоплазмы применялась в области лунок удаленных зубов. Обнаружено, что в тех лунках, которые заполнялись плазмой в виде геля, отмечался больший объем лучше организованной кости, причем в более короткие сроки и эпителизация раны также протекала гораздо быстрее [23].

Хирургия. Применение обогащенной аутоплазмы в лечении трофических язв голени венозной этиологии гарантирует широкий спектр местных и системных лечебных воздействий, позволяет улучшить результаты последующей аутодермопластики и в короткие сроки выполнить хирургическое лечение по ликвидации вено-венозных рефлюксов, это способствует сокращению сроков лечения, улучшению качества жизни и снижению стоимости лечения. Использование и применение обогащенной аутоплазмы технически не сложно, это позволяет применять данный метод для повсеместного использования [8].

Дерматология. Встречаются работы по использованию обогащенной аутоплазмы в дерматологии. Проведено исследование в котором участвовали 7 женщин, с диагнозом фотодерматоз в области латеральных углов глаз, после интенсивного облучения в солярии. Отмечен стойкий положительный клинический эффект в течение 9 месяцев. Считают, что интрадермальное введение аутогенной плазмы, богатой тромбоцитарными факторами роста является методом выбора при лечении фотодерматоза [4].

Заключение

Использование ТФР в виде различных форм в настоящее время прочно заняло свое место в клинической практике. Учитывая универсальный механизм их действия, они применяются в различных отраслях медицины и потенциал их использования еще далеко не исчерпан. К преимуществам методики можно отнести ее безопасность и низкую себестоимость. В то же время ее применение требует строгого соответствия протоколу использования, который при заболеваниях разных органов и систем может отличаться.

Наиболее значимым сдерживающим фактором для более широкого внедрения методики в повседневную работу врачей является недостаточное количество контролируемых рандомизированных исследований, посвященных оценке эффективности ТФР. Доступность метода и его эффективность открывают перспективы его более широкого использования в хирургии, в т.ч. гнойной, травматологии, комбустиологии, спортивной медицине, дерматокосметологии, при эндоскопических методах лечения.

Список литературы

1. Аминова З.М., Емелин А.Л., Овечкина М.В., Калянова Е.В. Применение богатой тромбоцитами плазмы в ортопедии Технология Plasmolifting™ Процедура Orthoplasma Методическое пособие для врачей, Москва 2012г.
2. Ахмеров Р.Р., Зарудий Р.Ф. Применение обогащенной аутоплазмы для лечения фотодерматоза. г. Уфа ФГУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии. Реферат. 2003 г.
3. Башкина А.С., Широкова Л.Ю., Абросимова Е.Б., Бахтиярова Т.И., Носков С.М. Обогащённая тромбоцитами плазма в лечении болевого синдрома большого вертела. – Спортивная медицина: наука и практика. – №1, 2012 – с.7-10.
4. Безуглов Э.Н., Ачкасов Е.Е., Усманова Э.М., Куршев В.В., Султанова О.А., Заборова В.А., Суворов В.Г., Сёдерхольм Л.А. Применение тромбоцитарных факторов роста при лечении повреждений латеральных связок голеностопного сустава у футболистов. – Спортивная медицина: наука и практика. - №1, 2013 – с.31-35
5. Безуглов Э.Н., Глущенко А.Л., Ачкасов Е.Е., Ядрошвили А.Э., Каркищенко Н.Н. Первый опыт применения тромбоцитарных факторов роста при лечении повреждений опорно-двигательного аппарата спортсменов высокой квалификации. – Материалы V Международной конференции по вопросам состояния и перспективам развития медицины в спорте высших достижений «СпортМед-2010». Москва, 9-10 декабря 2010 г. – с.53-55.
6. Брехов В.Л. Хирургическое лечение больных с дефектами костной и хрящевой тканей с применением богатой тромбоцитами аутоплазмы. дис. канд. мед. наук. Курск. - 2007г
7. Войно-Ясенецкий В.Ф. Очерки гнойной хирургии. - Бином, 2006. - С. 720.
8. Зинин В.Ю., Кожевников А.М., Зотов В.А. Использование богатой тромбоцитами плазмы в лечении больных с венозными трофическими язвами. ГОУ ВПО Новосибир-

- ский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия - 2007 г.
9. Сычевский М. В. Эффективность модифицированной повязки на основе коллагена типа I при лечении обширных ожоговых ран III А степени. Дис. канд. мед. наук. Москва - 2010.
 10. Хубутя М.Ш., Смирнов С.В., Сычевский М.В., Бочарова В.С. /Значение тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB) в сочетании с губчатым коллагеновым матриксом в лечении ожогов II-III степени./ Клеточные технологии и регенеративная медицина в хирургии и трансплантологии: материалы гор. науч.-практ. конф.- М.: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2009.- (Труды ин-та, Т.207).-С.7-10.
 11. Чекмарева, И.А. Процессы репаративной регенерации в ранах при лечении биологически активными перевязочными средствами (экспериментально - морфологическое исследование): автореф. дисс. д-ра. биол. наук.- М., 2002.-41с.
 12. Anand SX, Viles-Gonzales JF, Badimon JJ, et al. (2003) Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Throm Haemost* 90:377–384
 13. Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Tromb Haemost* 91:4–15
 14. Batten ML, Hansen JC, Dahners LE (1996) Influence of dosage and timing of application of platelet-derived growth factor on early healing of the rat medial collateral ligament. *J Orthop Res* 14:736–741
 15. Buckwalter JA, Mankin HJ (1997) Articular cartilage. Part II: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg* 79A:612–632
 16. Chen CH, Cao Y, Wu YF, et al. (2008) Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *J Hand Surg Am* 33:1834–1842
 17. Creaney L, Hamilton B (2008) Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med* 42:314–320
 18. De Vos RJ, Weir A, van Schie HT, et al. (2010) Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA* 303(3):144–149
 19. Eming S.A., Yarmush M.L., Krueger G.G. et al / Regulation of the spatial organization of mesenchymal connective tissue: effects of cell-associated versus released isoforms of platelet-derived growth factor // *Am. J. Pathol.*-1999.-Vol. 154.-P.281 -289.
 20. Filardo G, Kon E, Della Villa S, et al. (2010) Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee. *Int Orthop* 34:909–915
 21. Floryan K, Berghoff WJ (2004) Intraoperative use of autologous platelet rich and platelet poor plasma for orthopaedic surgery patients. *AORN J* 80:668–674
 22. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, et al. (2009) Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med* 37:2259–2272
 23. Froum S.J., Wallace S.S., Tarnow D.P., et al. Effects of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: Three

- bilateral case reports // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 2002. - №22. – P. 45-53
24. Gugat R.(2013) PRP experiences in muscle end tendon injuries: clinical experience with footballers. *Football Medicine Strategies for Muscle end Tendon Injuries*-113
25. Harrison, P. Platelet alpha-granules / P. Harrison, E.M. Cramer // *Blood. Rev.*-1993.-№7.-P.52-62.
26. Hildebrand K, Woo S, Smith D, et al. (1998) The effect of platelet-derived growth factor- BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study. *Am J Sports Med* 26:549–554
27. Kaetzel, D.M. Transcriptional control of the platelet-derived growth factor subunit genes / D.M. Kaetzel, D.W. Coyne, R.A. Fenstermaker // *Biofac.*-1993.-Vol.4.-№2.-P.71-81
28. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, et al. (2000) Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res* 370:272–285
29. Kobayashi M, Itoi E, Minagawa H, et al. (2006) Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits. *J Shoulder Elbow Surg* 15:371–377
30. Kon E, Buda R, Filardo G, et al. (2010) Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:472–479
31. Lee J, Harwood FL, Akeson WH, et al. (1998) Growth factor expression in healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Iowa Orthop J*18:19–25
32. Letson AK, Dahners L (1994) The effects of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orthop Relat Res* 308:207–212
33. Lind M, Jakobsen BW, Lund B, et al. (2009) Anatomical reconstruction of the medial collateral ligament and posteromedial corner of the knee in patients with chronic medial collateral ligament instability. *Am J Sports Med* 37:1116–1122
34. Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, et al. (2010) The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy* 26:269–278
35. Lundberg M, Messner K (1996) Long-term prognosis of isolated partial medial collateral ligament ruptures. A ten-year clinical and radiographic evaluation of a prospectively observed group of patients. *Am J Sports Med* 24:160–163
36. Maniscalco P, Gambera D, Lunati A, et al. (2008) The “Cascade” membrane: a new PRP device for tendon ruptures. Description and case report on rotator cuff tendon. *Acta Biomed* 79:223–226
37. Marx RE (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surgery* 62:489–496
38. Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A (2009) Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med* 28:113–125
39. Miyazno K. et al Receptors for transforming grow factor – beta, *Adv. Immunology.* – 1994 – Vol. 55. – P. 181-220
40. Molloy T, Wang Y, Murrell G (2003) The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 33:381–394

41. Mustoe T.A., Pierce G.F., Thomason A. et al. // Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta / Science.-1987.-Vol.237.-P. 1333-1336.
42. Nagumo A, Yasuda K, Numazaki H, et al. (2005) Effects of separate application of three growth factors (TGF-beta1, EGF, and PDGF-BB) on mechanical properties of the in situ frozenthawed anterior cruciate ligament. Clin Biomech 20:283–290
43. Parkkari J, Pasanen K, Mattila VM, et al. (2008) The risk for a cruciate ligament injury of the knee in adolescents and young adults: a population-based cohort study of 46 500 people with a 9 year follow-up. Br J Sports Med 42:422–426
44. Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn DJ, et al. (2010) Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year followup. Am J Sports Med 38:255–262
45. Pujol JP, Chadjichristos C, Legendre F, et al. (2008) Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. Connect Tissue Res 49:293–297
46. Randelli P, Arrigoni P, Cabitza P, et al. (2008) Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. Disabil Rehabil 30:1584–1589
47. Rubio-Zaragoza M, Damia E, Ceron R, et al. Experimental study on the influence of Intramuscular injection of Plasma Rich Growth Factors in serum Insuline like Growth Factors-I and C-Reactive Protein in the DOG. 15th ESSKA Congress, Geneva, May 2-5, 2012(P-35-1192)
48. Sammut L.(2013) Achilles tendinopathy in football players: is there a role for platelet rich plasma injection. Football Medicine Strategies for Muscle and Tendon Injuries-234
49. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B (2008) Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. Curr Rev Musculoskelet Med 1:165–174
50. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, et al. (2008) Intraarticular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. Clin Exp Rheumatol 26:910–913
51. Stellos K, Kopf S, Paul A, et al. (2010) Platelets in regeneration. Semin Thromb Hemost 36:175–184
52. Tyapongsak P., et al., Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate canceller bone and marrow // J. Oral Maxillofacial. Surg.-1994.-Vol. 52. - P. 161-166.
53. Urist M.R. Bone morphogenetic protein / M.R.Urist, B.S.Strates // J. Dent. Res. - 1972. - Vol. 50. - P. 1392.
54. Virchenko O, Aspenberg P (2006) How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. Acta Orthop Scand 77:806–812
55. Westermarck B., Siegbahn A. , Heldin C., et al. B-type receptor for platelet-derived growth factor mediates a chemotactic response by means of ligand-induced activation of the receptor protein- tyrosine kinase / // PNAS.-1990.-Vol.87.-P. 128-132.
56. Woo SL, Smith DW, Hildebrand KA, et al. (1998) Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament. Med Biol Eng Comput 36:359–364.

Application platelet-rich plasma in clinical practice

**E.E.Achkasov, E.N.Bezuglov, E.N.Ul'yanov, A.A.Ul'yanov, V.V.Kurshev,
A.D.Repetyuk, O.N.Egorova**

The most actual aspects of application in various areas of medicine of modern biomedical technology – platelet-rich plasma are reflected in article. In the last decade is celebrated significant increase in interest to this biotechnology that is caused by its high efficiency at high level of safety and low prime cost. Now platelet-rich plasma actively it is applied in surgery, stomatology, traumatology and orthopedics, sports medicine, cosmetology and dermatology, a combustiology. At the same time apparent defect of an assessment of application efficiency and the remote results autoplasm from the point of view of evidential medicine is still noted. Platelet-rich plasma possesses a number of useful properties: accelerates processes of regeneration of fabrics, anti-inflammatory effect, decrease in a pain syndrome that opens still big prospects for application in surgery, traumatology.

Key words: Autoplasm enriched by thrombocyte, regeneration, traumatology, surgery, dermatology, stomatology, combustiology, sports medicine.



Экспериментальная оценка эффективности рецептуры «МиоАктив Форсаж» в условиях высоких физических нагрузок в тесте принудительного бега крупных лабораторных животных

**Г.Д. Капанадзе, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, И.А. Берзин,
Н.В. Станкова, А.О. Ревякин, О.И. Степанова, Н.Я. Вихрова**

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

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

В работе показано, что длительное (21 день) применение рецептуры «МиоАктив Форсаж» в условиях высоких физических нагрузок в тесте принудительного бега крупных лабораторных животных повышает выносливость организма. Рецептура не влияет отрицательно на физиологические показатели животных.

Ключевые слова: рецептура «МиоАктив Форсаж», выносливость, мини-свиньи, эксперимент.

Под влиянием интенсивных физических и психоэмоциональных нагрузок у спортсменов происходит повышенное расходование энергетических ресурсов, минералов, витаминов и других жизненно важных веществ. По этой причине в организме замедляются восстановительные и адаптационные реакции, что может привести к снижению работоспособности, ускоренному износу всех систем организма, а в итоге – к понижению спортивных результатов и серьезным нарушениям здоровья. Полноценное сбалансированное питание является одним из важнейших компонентов медико-биологического обеспечения тренировочно-

го процесса и соревновательной деятельности. В настоящее время специальное и спортивное питание является базовой основой и первой фазой фармакологического обеспечения спортсмена [5].

«МиоАктив Форсаж» специально разработанный комплексный высокобелковый продукт, предназначенный для профессиональных спортсменов. Он представляет собой концентрированный комплекс основных, жизненно необходимых пищевых и биологически активных веществ, улучшающих способность человека переносить физические и психоэмоциональные нагрузки. Белковые, полипептидные и аминокислотные ком-

поненты имеют животное происхождение и получают путем ферментации и гидролиза белков сыворотки молока, мяса крупного рогатого скота и птицы. За счет современных технологий производства аминокислотный, витаминный, макро- и микроэлементный состав «МиоАктив Форсаж» оптимизирован с учетом метаболизма человека подверженно-го высоким физическим нагрузкам.

Компоненты продукта подобраны таким образом, что при его употреблении в организме человека, подверженного повышенным нагрузкам, проявляются как быстрые, так и пролонгированные положительные физиологические и биохимические эффекты, что сказывается не только на повышении выносливости и работоспособности, но и на скорости восстановления после перенесенных нагрузок.

В составе «МиоАктив Форсаж» входят и хелатные соединения. Большинство неорганических соединений микроэлементов нестабильны [7, 8]. Хелатные соединения легко усваиваются, и организм при необходимости может без вреда для себя переносить большие дозы микроэлементов, которые при потреблении в виде неорганических солей являются токсичными [8]. Механизм положительного влияния микроэлементов в хелатной форме связан с тем, что они имеют меньшую реакционную способность по сравнению с ионами металлов, что исключает образование не усваиваемых или мало усваиваемых соединений и обеспечивает более активное включение в соответствующие биологические циклы и значительно большие сроки сохранности обогащенных ими продуктов. Хелатные комплексы способны активизировать в организме важнейшие ферментные системы, но и оказывают

стимулирующее действие на синтез белка, обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами, способствуют уменьшению интоксикации организма тяжелыми металлами [4].

Для оценки эффективности рецептуры «МиоАктив Форсаж» в ФГБУН «научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» в 2013 году был проведен эксперимент на специально отобранных крупных лабораторных животных (мини-свиньи светлогорской популяции) в условиях, моделирующих высокую физическую нагрузку. Выбор мини-свиней для эксперимента был обусловлен сходством этих животных по множеству анатомическим, физиологическим показателям к человеку [1, 2].

Регулирующие стандарты

Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»

ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)»

Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией Центра.

Материалы и методы исследования

Исследуемое вещество, дозировка, путь введения

Рецептуру «МиоАктив Форсаж» в виде порошка животным давали ежедневно, 1 раз в день, в утренние часы вместе с кормом, в течение 21-го дня.

Каждому животному давали рецептуру в дозе 9 г/кг., что с учетом коэффициента дозопереноса для животных соответствует суточной норме человека массой 70 кг.

Животные и их содержание

Эксперименты выполнялись на лабораторных светлогорских мини-свиньях, самцах, в количестве 12-х голов, масса одного животного перед началом исследования $15 \pm 1,6$ кг. Были сформированы 2 экспериментальные группы – контрольная (животные получали обычный корм) и опытная (животные вместе с кормом получали «МиоАктив Форсаж»).

Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках. Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». Животные содержались в стационарных клетках, индивидуально. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для свиней ПК 58. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная

вода всем животным давалась *ad libitum* в поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12 часовой цикл освещения.

В течение исследования каждое животное осматривалось ежедневно. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных.

Тест принудительного бега мини-свиней по тренажеру

Предварительно животных в течение 15 дней до начала эксперимента обучали к бегу на беговой дорожке. Скорость движения беговой дорожки во время эксперимента – 7 км/час. Длительность обучения – 30 минут ежедневно.

До начала ввода препаратов (фоновые значения), а далее на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день измеряли показатели артериального давления, содержания кислорода в крови, температуру тела ректально. Далее животных принудительно заставляли бегать по беговой дорожке (Торнео Т-203). Измеряли время бега, дистанцию. После остановки беговой дорожки опять измеряли показатели артериального давления, содержания кислорода в крови, температуру тела ректально, количество дыхательных движений в 1 минуту, брали пробу крови из хвостовой вены для биохимического и гематологического анализа.

Выбранная нами методика (принудительный бег мини-свиней на тредбане) использована для проведения исследований действия препаратов на предельных, максимально переносимых физических нагрузок [3, 6].

Результаты и их обсуждение

В тесте принудительного бега животные контрольной группы постепенно увеличивали время бега на тредбане на протяжении всего эксперимента. Время увеличивалось линейно и максимальному показателю достигло на последний, 28-й день исследования. По отношению к фоновому показателю время бега увеличилось на 12,3% (табл. 1).

В опытной группе на фоне приема рецептуры «МиоАктив Форсаж» время бега свиней значительно увеличилось уже с 7-го дня эксперимента, достигло своего пика на 21-й день и к 28-му дню, через неделю после отмены приема рецептуры, снизилось (рис. 1).

На 7-й день в опытной группе увеличение по сравнению с фоном составило 14,6%. Аналогичный показатель в опытной группе - 1,7%. К 14-му дню эксперимента время бега увеличилось на 23,1% по отношению к фону и на 7,4% по отношению к 7-му дню исследования (для контрольной группы 8,1% и 6,2% соответственно). Максимальные показатели были достигнуты на 21-й день эксперимента – в последний день приема рецептуры. Время бега мини-свиней на тредбане увеличилось по сравнению с фоном на 49,1%, а по сравнению с по-

казателями 14-го дня – на 21,1%. Эти показатели значительно превосходят данных контрольной группы (табл. 1).

Соответственно, можно заключить, что длительный (21 день) прием рецептуры «МиоАктив Форсаж» способствует значительному увеличению выносливости организма при предельных физических нагрузках. Через 7 дней после отмены приема рецептуры эффект частично сохраняется.

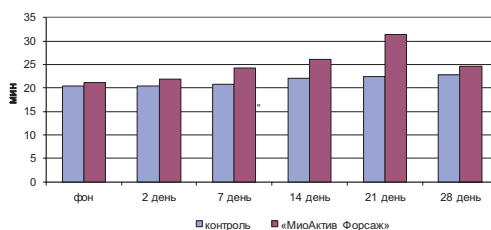


Рис. 1. Время бега мини-свиней на фоне приема рецептуры «МиоАктив Форсаж».

Запись электрокардиограммы проводилась после прикрепление электродов к отведениям с конечностей, так как с грудных отведений у мини-свиней практически невозможно.

При сравнении ЭКГ контрольных животных и ЭКГ животных на фоне вводимой рецептуры при запредельных нагрузках особых отличий в симптоматике в виде определенной динамики продол-

Таблица 1
Сравнительные показатели в тесте принудительного бега мини-свиней на фоне приема рецептуры «МиоАктив Форсаж»

Показатель / Препарат	Контроль	МиоАктив-Спорт
Время бега, мин		
фон	20,35±2,2	21,10±1,8
2-й день	20,37±2,6	21,8±1,5
7-й день	20,70±1,6	24,20±1,8
14-й день	22,0±1,3	25,98±2,0
21-й день	22,43±1,9	31,46±2,2
28-й день	22,85±3,0	24,61±1,7

жительности и полярности основных электрокардиологических параметров не выявлено.

До и после нагрузочных проб у крупных лабораторных животных измеряли температуру тела, ЧСС, ЧДД и содержание кислорода в крови. Все изменения изучаемых параметров, в исследуемых группах находились в физиологической норме и были обусловлены стрессом и высокими физическими нагрузками.

Применение рецептуры в течение 21-го дня практически не изменяют биохимические и гематологические показатели крови.

Выводы

1. Применение «МиоАктив Форсаж» в течение 21-го дня в дозе 9 г/кг способствует значительному росту (49,1%) выносливости организма, что было доказано в тесте принудительного бега мини-свиней на тредбане. Через 7 дней после отмены ввода рецептуры эффект частично сохраняется.

2. После применения рецептуры «МиоАктив Форсаж» ЭКГ опытных животных не отличалось от ЭКГ животных контрольной группы. Температура тела, ЧСС, ЧДД и содержание кислорода в крови в исследуемых группах находились в физиологической норме. Применение рецептуры не изменяют биохимические и гематологические показатели крови.

Список литературы

1. *Капанадзе Г.Д.* Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // Биомедицина. 2006. № 2. С. 40-52.
2. *Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.* Характеристика светлогорских мини-сви-

ней, используемых в медико-биологических исследованиях // В сб. Междунар. конф «Современные достижения науки и практики». Краснодар. 2007. Том 1. С. 44-46.

3. *Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В.* Разработка методики оценки физической выносливости лабораторных животных для изучения адаптационной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. № 1. С. 72-74.
4. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Люблинский С.Л., Капанадзе Г.Д., Шустов Е.Б., Ревакин А.О., Болотских Л.А., Касинская Н.В., Станкова Н.В.* Роль микроэлементов в спортивном питании и безопасность металлохелатов // Биомедицина. 2013. № 3. С. 12-41.
5. *Полиевский С.А.* Основы индивидуального и коллективного питания спортсменов. М.: ФиС. 2005. 384 с.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко. С.В.Грачева – М.: Профиль–2С. 2010. 358 с.
7. *Скальный А.В.* Физиологические аспекты применения макро- и микроэлементов в спорте. Оренбург: РИК ОГУ. 2005. 206 с.
8. Элементный статус населения России. Ч. 1. Общие вопросы и современные методические подходы к оценке элементного статуса индивидуума и популяции / под ред. А.В.Скального, М.Ф.Киселева. СПб.: Медкнига «Элби-СПб». 2010. 416 с.

Experimental assessment of efficiency of a compounding of “MioActiv Forsage” in the conditions of high physical activities in the test of compulsory run of large laboratory animals

G.D. Kapanadze, V.N. Karkishchenko, E.B. Shustov, I.A. Berzin, N.V. Stankova,
A.O. Revyakin, O.I. Stepanova, N.Ya. Vikhrova

Shown that long-term (21 day) use recipes «MioActiv Forsage» in the face of high physical activity in a test run of forced large laboratory animals increases endurance. The formulation does not adversely affect the physiological parameters of animals.

Keywords: recipe «MioActiv Forsage», stamina, mini-pig, experiment.

Оценка физической выносливости мелких лабораторных животных на фоне применения спортивного питания «МиоАктив Форсаж»

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

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

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, scbmt@yandex.ru

Использование рецептуры «МиоАктив Форсаж» увеличивает выносливость и работоспособность лабораторных крыс на 21-е сутки исследования в тесте вынужденного плавания в 5 раз. Применение рецептуры «МиоАктив Форсаж» позволяет достигать более высоких результатов в тесте Порсолта у экспериментальных животных.

Ключевые слова: рецептура «МиоАктив Форсаж», крысы, тест вынужденного плавания, тест Порсолта, выносливость.

В настоящее время специальное и спортивное питание является базовой основой и первой фазой фармакологического обеспечения спортсменов [1]. Рациональное применение различных рецептур при экстремальных тренировочных и соревновательных нагрузках способствует достижению собственного рекордного результата, поэтому фармакология спорта изучает влияние препаратов, которые повышают физическую работоспособность психическую устойчивость и способность организма к быстрому восстановлению ресурсов [5].

Целью настоящей работы явилось исследование эффекта рецептуры «МиоАктив Форсаж», оказывающего влияние на способность организма выдерживать предельные физические нагрузки, и, следовательно, повышать выносливость и работоспособность.

Материалы и методы

Выносливость – это способность совершать работу заданного характера в течение возможно более длительного времени, а работоспособность это свойство организма в течение заданного времени и с определенной эффективностью выполнять максимально возможное количество работы [6].

Для оценки выносливости и работоспособности рецептуры использовали белых нелинейных крыс в возрасте 3-х мес., самок, массой 200±20 г. В эксперименте были использованы 2 группы животных. Первая группа – опытные (n=10) и вторая группа – контроль (n=10).

Для оценки адаптогенной активности препаратов использовали широко известный тест Порсолта (Porsolt) [4]. Данная методика позволяет оценить физическую выносливость крыс в условиях стресса

и запредельных нагрузок. Метод удобен, прост в исполнении. Метод был модифицирован в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [2, 3]. В нашей модификации плавание проводили в аквариуме высота воды 0,8-0,9 м, температура +24°C При вынужденном плавании использовали груз (из расчета 20 г груза на 1 крысу).

Рецептуру «МиоАктив Форсаж» животным давали ежедневно (из расчета 5 г на 1 крысу в сутки) в течение 21 дня. Данные исследования проводили в динамике: первым был снят фоновые показатели животных контрольной и опытной групп, далее на 2-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки и 28-е сутки эксперимента. Препарат прекращали давать на 21-е сутки эксперимента.

Результаты и их обсуждение

Результаты длительности плавания после введения препарата «МиоАктив Форсаж» представлены ниже (табл. 1).

Таблица 1
Сравнительные показатели в тесте принудительного плавания крыс, контрольная группа

Показатель	Контроль
Время плавания, сек	
фон	91,6±12,1
2 день	89,8±13,0
7 день	100,3±11,1
14 день	124,5±17,1
21 день	95,2±18,04
28 день	112,2±18,8
Отношение времени плавания, %	
2 день/фон	98,0
7 день/фон	109,5
14 день/фон	135,9
21 день/фон	103,9
28 день/фон	122,5
14 день/7 день	124,1
21 день/7 день	94,9
21 день/14 день	76,5
28 день/7 день	111,9
28 день/14 день	90,1
28 день/21 день	117,9

В тесте принудительного плавания животные контрольной группы незначительно в целом повышали время плавания на поверхности воды. Максимальное значение – 124,5 сек, была достигнута на 14-й день, затем наблюдался спад на 21-й день, когда время плавания составило – 95,2 сек (76,4% от максимального), на 28-й день эксперимента время плавания несколько возросло и составило – 112,2 сек, рост времени плавания к 21-му дню составил 17,9%, хотя оно и не достигло своего максимального значения.

Таблица 2

Сравнительные показатели в тесте принудительного плавания крыс на фоне приема препарата «МиоАктив Форсаж»

Показатель	«МиоАктив Форсаж»
Время плавания, сек	
фон	82,8±11,6
2 день	160,1±25,7
7 день	202,0±31,6
14 день	284,3±35,2
21 день	464,6±61,5
28 день (без введения)	308,1±27,9
Отношение времени плавания, %	
2 день/фон	193,4
7 день/фон	244,0
14 день/фон	343,4
21 день/фон	561,1
28 день/фон	372,1
14 день/7 день	140,7
21 день/7 день	230,0
21 день/14 день	163,4
28 день/7 день	152,5
28 день/14 день	108,4
28 день/21 день	66,3

После введения препарата «МиоАктив Форсаж» наблюдали, повышение времени плавания у подопытных животных на протяжении всего времени ввода (21 день), как при сравнении с собст-

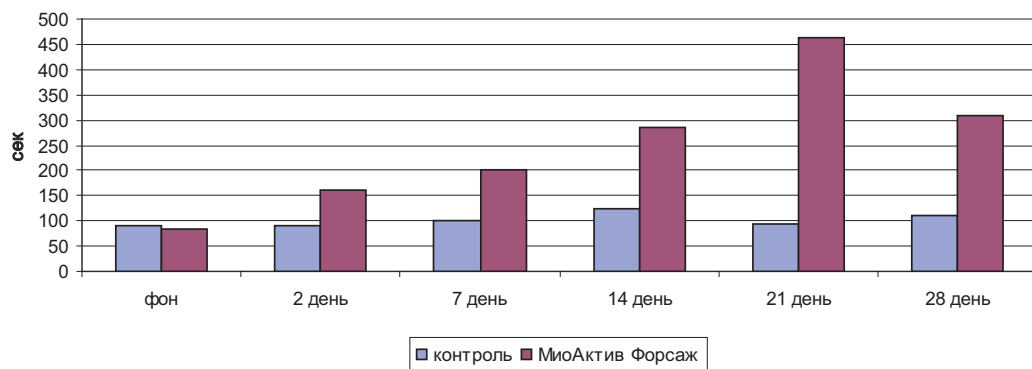


Рис. 1. Среднее время плавания крыс при вынужденном плавании с грузом на фоне приема рецептуры «МيوАктив Форсаж».

венными фоновыми показателями, так и с показателями контрольной группы в аналогичные периоды сравнения.

Необходимо отметить, что эффект воздействия рецептуры наблюдался как при их введении (21 день), так и после их отмены в течение 7-дневного наблюдения (28-й день).

Сравнивая данные опытной группы животных с контролем уже со 2-го дня после применения рецептуры, можно отметить, что выносливость возрастает в 1,8 раза; на 7-й день – в 2 раза; на 14-й день – в 2,3 раза. Выносливость на 21-й день опыта увеличивается в 5 раз, а на 28-й день выносливость выше в 2,8 раза, чем у контрольной группы.

Повышение выносливости у животных в опытной группе растет по отношению к фону: на 2-й день – 93,4%, 7-й день – 144%, 14-день – 243,4% и на 21-день – максимальное увеличение на 461,1%, на 28-й день исследования (через 7 дней после отмены ввода рецептуры) выносливость была выше на 272,1% в сравнении с фоновым показателем (табл. 2).

На 21-й день эксперимента животные опытной группы достигали максимальных показателей. Данные на 21-й день были выше по отношению 2-му дню на 190,2%, к 7-му дню – на 130%, к 14-му дню – на 63,4 %.

На 28-ый день исследования эффект воздействия препарата сохранялся (табл. 2), что косвенно может свидетельствовать о кумулятивном свойстве препарата.

В целом, ввод рецептуры «МيوАктив Форсаж» в течение 21-го дня позитивно сказывается на повышении работоспособности и выносливости крыс в тесте вынужденного плавания с грузом, показатели выносливости вырастают в 5 раз по сравнению к фоновым данным на к 21-му дню ввода.

Выводы

1. Ввод рецептуры «МيوАктив Форсаж» мелким лабораторным животным (крысы), ежедневно в течение 21-го дня увеличивал их работоспособность и выносливость в тесте вынужденного плавания с грузом. Время нахождения животных на поверхности воды росло

непрерывно на протяжении всего эксперимента и максимального показателя достигло на 21-й день эксперимента. Максимальное время плавания составило 464,6 сек, что на 372,1% превысило собственные фоновые данные и было в 5 раз выше показателей контрольной группы за аналогичный период.

2. На 28-й день (7-й день после отмены ввода рецептуры) показатели несколько снизились по отношению к показателям 21-го дня (на 66,3%), но при этом превосходство к собственному фону составило 372,1%.

Список литературы

1. *Каркищенко Н.Н.* Фармакология процессов адаптации и переносимости предельных нагрузок в спорте и режимах работы «до отказа»: второй тайм для дженериков // Биомедицина. № 4. 2010. С. 6-23.
2. *Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Денгина С.Е., Станкова Н.В.* Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. № 1. С. 72-74.
3. *Петунов С.Г., Бобков Д.В., Лукина А.М., Нечайкина О.В.* Оценка физической работоспособности при интенсивной физической нагрузке в моделях на лабораторных животных // Медико-биологические аспекты обеспечения химической безопасности Российской Федерации. Сб. тр. Всеросс. симпозиума, посвященного 50-летию со дня основания ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России. 2012. С. 101-102.
4. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N. et al.* Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment // Europ. J. Pharmacol. - 1978. - v. 47. - p. 379-391
5. Электронный ресурс: <http://www.sportium.org/>
6. Электронный ресурс: <http://sport-health.com.ua/readteoriya-sportarabotosposobnost.html>

Assessment of physical endurance of small laboratory animals against application of a sports food of “MioActiv Forsage”

V.N. Karkishchenko, I.A. Berzin, N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina, O.I. Stepanova, Yu.V. Fokin, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, E.L. Matveenko

Use of a compounding of “MioActiv Forsage” increases endurance and efficiency of laboratory rats by the 21st days of research in the test of the compelled swimming by 5 times. Porsolt at experimental animals allows to reach application of a compounding of “MioActiv Forsage” more good results in the father-in-law.

Key words: compounding of “MioActiv Forsage”, rat, the test of the compelled swimming, the test Porsolt, endurance.

Экспериментальная оценка адаптогенной активности препарата «МиоАктив Форсаж» в тесте принудительного плавания

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

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

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

Изучали влияние препарата «МиоАктив Форсаж» на выносливость и работоспособность организма. В тесте использовалась кинезогидродинамическая модель. Исследуемая рецептура оказывает благотворное действие, помогает легче справляться с нагрузками и достигать более высоких результатов.

Ключевые слова: «МиоАктив Форсаж», крысы, выносливость, работоспособность, кинезогидродинамическая модель.

Для оценки уровня подготовленности и переносимости сверхсильных и экстремальных физических нагрузок требуется количественное измерение основных параметров организма человека. В качестве первого шага на этом пути необходимы адекватные доклинические исследования на лабораторных животных, дающие возможность экстраполяции полученных данных и воздействия средств коррекции с животных на человека. В доступной отечественной и зарубежной литературе, а также в результате проведения патентного поиска нами не найдено адекватного и однозначного метода, позволяющего построить модель выносливости и работоспособности на лабораторных животных. Ранее известные методы (беговая дорожка – тредбан, вынужденное плава-

ние с грузом), дают неполное приближение к решению задачи, и позволяют косвенно определить характер изменений в организме животных.

Кинезогидродинамическая модель дает возможность получить исследователям однозначную объективную количественную информацию о работоспособности, выносливости и утомляемости животных. Выбор гидроканала как инструмента исследования кинезогидродинамики, в частности, выносливости подопытных животных и их поведения под действием различных препаратов при плавании объясняется тем, что наиболее энергозатратной работой организма является именно плавание, поскольку при этом расходуются как мышечная энергия, так и энергия на поддержание температуры тела.

Цель исследования

Осуществление экспериментальной оценки эффективности рецептуры препарата «МиоАктив Форсаж», оказывающего влияние на психофизические показатели (способность организма выдерживать предельные физические нагрузки, стрессоустойчивость и работоспособность) с использованием кинезогидродинамической модели.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России на крысах линии WAG/GY. Тестировались самки в возрасте 3 месяцев, массой 200 ± 20 г, в количестве по 10 особей в группе. Было сформировано 2 группы - опытная и контрольная. Животные получены из филиала «Столбовая» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА, Московская область, соответствуют категории SPF статуса. Крысы содержались в микроизоляторной системе Rain IsoSistem по 5 особей. В качестве корма использовали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода давалась в стандартных поилках. Введение препарата в виде кормовой добавки «МИОАКТИВ-ФОРСАЖ» давали ежедневно (9 г/кг) в течение 21 суток.

Устройство, на котором проводили исследование, представляет собой гидроканал из прозрачного пластика прямоугольной трапециевидной формы, длиной 200 см в поперечном сечении, оснащено с торцевых сторон водосборниками, обеспечивающих ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощностью

прокачки. После включения насоса, система стабилизируется на скорости квазиламинарного потока воды не ниже 5-ти м/мин. Температура воды $+24$ С.

«Правильное» направление движения у подопытных животных вырабатывают тем, что в конце маршрута в гидроканале (в нашем случае - у торца подачи потока жидкости в чашу) помещают домик-приманку. Установленные на борту гидроканала градуировочная шкала и датчики перемещения, а также видеокамера сопровождения обеспечивают корректную регистрацию скорости перемещения и продолжительности плавания подопытного животного.

До начала применения препарата в виде кормовой добавки «МиоАктив Форсаж» животные проходили отбор и обучение в течении 7 дней, после чего они самостоятельно плыли к домику при встречном потоке воды.

Данные исследования проводили в динамике: первым был снят фон обеих групп, затем на 2 сутки после введения, 7, 14, 21 сутки и 28 сутки (на 7-ые сутки без препарата).

Результаты и их обсуждения

Нами рассматривались следующие показатели: общее время плавания в сек, общее количество заплывов по группе, общее расстояние, средняя скорость плавания в м/сек., среднее количество заплывов.

В таблице (табл. 1) приведены основные характеристики животных во время проведения теста.

Выносливость – способность совершать работу заданного характера в течение возможно более длительного времени.

Таблица 1

Основные характеристики лабораторных животных в тесте принудительного плавания в гидроканале на фоне введения им препарата «МИОАКТИВ-ФОРСАЖ»

Общее время плавания, сек	Общее количество заплывов по группе	Общее расстояние, м	Средняя скорость при плавании, м/сек	Среднее количество заплывов
478	24	28,8	0,060	2,4
482	26	31,2	0,065	3,1
460	26	31,2	0,07	2,6
642	43	51,6	0,08	4,3
437	23	27,6	0,06	2,3
634	48	57,6	0,09	4,8
610	32	38,4	0,06	3,2
1655	126	151,2	0,09	12,6
651	32	38,4	0,06	3,2
2734	177	212,4	0,08	17,7
573	37	44,4	0,08	3,7
1124	82	98,4	0,09	8,2

Общее время плавания животных контрольной группы росло на протяжении всего эксперимента, достигло максимального значения на последний, 21-й день эксперимента увеличение составило 136,2% по отношению к фону.

У животных опытной группы увеличение времени плавания на фоне приема препарата увеличилось значительно. Рост на 2-й день составил 133,2%, далее, после незначительного снижения на 7-й день эксперимента (131,5% к фону опять последовал рост и показатель увеличился на 14-й день на 343,4%, на 21-й день – на 567,2% (максимальное значение) и на 28-й день после недельной отмены препарата - на 233,2% по отношению к фону.

Общее количество заплывов в контрольной группе увеличивалось на протяжении всего эксперимента, предположительно, за счет тренировок животных. Максимального значения данный показатель достиг на 28-й день эксперимента – 154,2% по отношению к фону.

В опытной группе животные так же увеличивали общее количество заплывов: на 7-й день увеличение составило 184,6% по отношению к фону, на 14 день – 484,6, на 21-й день – 680,8%.

После отмены ввода препарата на 28-й день эксперимента показатель по отношению к 21-му дню несколько снизился (на 46,3%) но остался высоким по отношению к фону (на 315,4%).

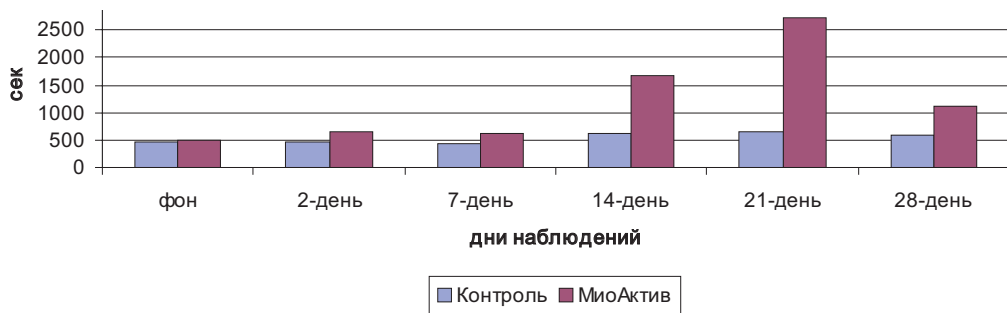


Рис. 1. Общее время плавания животных в тесте принудительного плавания в гидроканале у мелких лабораторных животных на фоне ввода препарата «МиоАктив Форсаж».

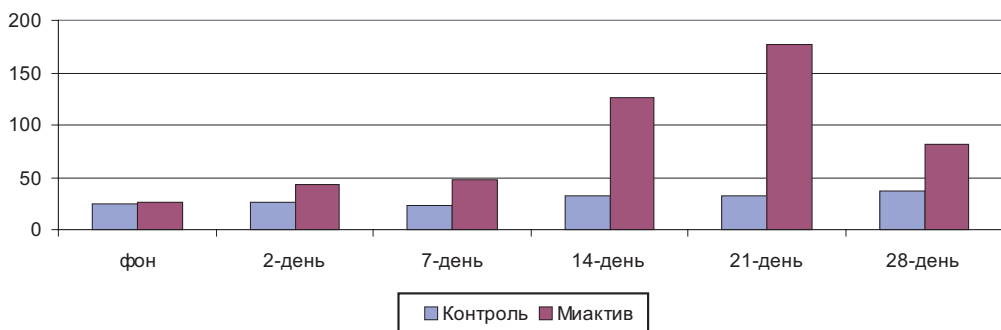


Рис. 2. Общее количество заплывов по группе в тесте принудительного плавания в гидроканале у мелких лабораторных животных на фоне ввода препарата «МиоАктив Форсаж».

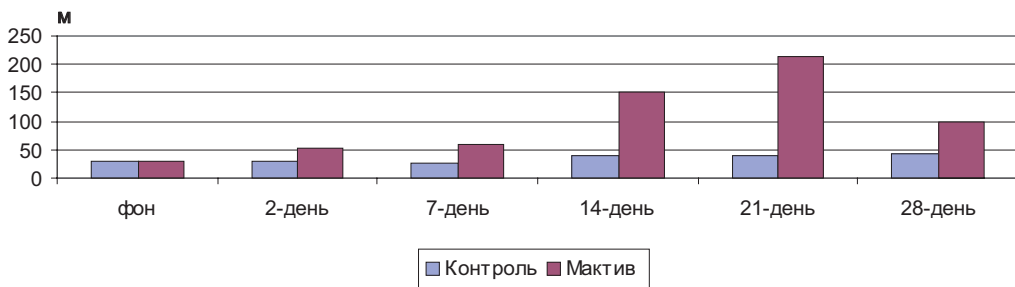


Рис. 3. Общее расстояние дистанции в тесте принудительного плавания в гидроканале у мелких лабораторных животных на фоне ввода препарата «МиоАктив Форсаж».

Общее расстояние в тесте у животных контрольной группы увеличилось со временем, но незначительно по отношению к опыту. Самый высокий показатель был достигнут на 28-й день эксперимента – 154,2 % по отношению к фону.

В контрольной группе общее рассто-

яние уже ко 2-му дню введения препарата увеличилось на 165,4% к фону, на 14 день на 484,6%, на 21-й день рост составил 680,8% (максимум), а на 28-й день эксперимента при некотором снижении к 21-му дню превосходство по отношению к фону составил 315,4%.

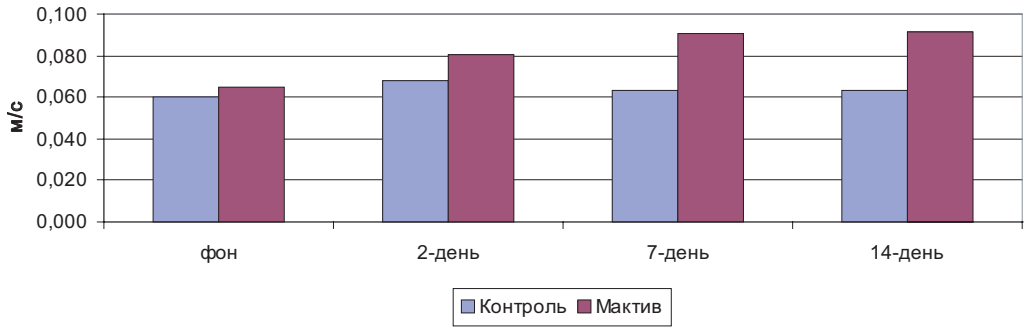


Рис. 4. Средняя скорость плавания в тесте принудительного плавания в гидроканале у мелких лабораторных животных на фоне ввода препарата «МиоАктив Форсаж».

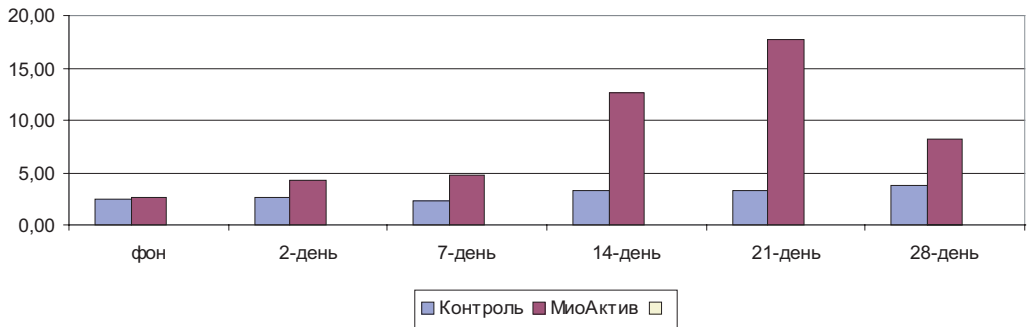


Рис. 5. Среднее количество заплывов по группе в тесте принудительного плавания в гидроканале у мелких лабораторных животных на фоне ввода препарата «МиоАктив Форсаж».

Средняя скорость плавания в гидроканале на протяжении всего эксперимента сохранялась и росла у животных контрольных и опытных групп. В контрольной группе максимальное значение фиксировалось на 28-й день эксперимента и прирост составил на 128,6% по отношению к фону, животные опытной группы плавали лучше фонового значения на 135,2% в 28 день эксперимента.

Общее количество заплывов во время эксперимента увеличивалось как у контроля, так и у животных опытной группы. В контрольной группе прирост к 28-му дню составил 154,2 % (максимальное значение), а опытной группе - 680,8% к 21-му дню эксперимента.

Работоспособность – это свойство организма в течение заданного времени и с определенной эффективностью выполнять максимально возможное количество работы.

Выводы

Введение препарата «МиоАктив Форсаж» в течение 21-го дня позитивно влияет на работоспособность и выносливость лабораторных животных в тесте принудительного плавания в гидроканале при заплыве на дальних дистанциях. Общее расстояние, которое преодолевали животные опытной группы на фоне вводимого препарата «МиоАктив Форсаж» было на 680,8% больше

Таблица 2

Относительные характеристики скорости и выносливости лабораторных животных в тесте принудительного плавания в гидроканале на фоне введения им препарата «МиоАктив Форсаж»

День наблюдения	Контроль	«МИОАКТИВ-ФОРСАЖ»
Общее время плавания, сек		
2 день/фон	96,2%	133,2%
7 день/фон	91,4%	131,5%
14 день/фон	127,6%	343,4%
21 день/фон	136,2%	567,2%
28 день/фон	119,9%	233,2%
Общее количество заплывов по группе		
2 день/фон	108,7%	165,4%
7 день/фон	95,8%	184,6%
14 день/фон	133,3%	484,6%
21 день/фон	133,3%	680,8%
28 день/фон	154,2%	315,4%
Общее расстояние, м		
2 день/фон	108,3%	165,4%
7 день/фон	95,8%	184,6%
14 день/фон	133,3%	484,6%
21 день/фон	133,3%	680,8%
28 день/фон	154,2%	315,4%
Средняя скорость, м/сек		
2 день/фон	112,6%	124,2%
7 день/фон	104,8%	140,4%
14 день/фон	104,5%	141,1%
21 день/фон	97,9%	120,0%
28 день/фон	128,6%	135,2%
Среднее количество заплывов		
2 день/фон	108,3%	165,4%
7 день/фон	95,8%	184,6%
14 день/фон	133,3%	484,6%
21 день/фон	133,3%	680,8%
28 день/фон	154,2%	315,4%

ше по отношению к фону и на 510,7% дольше по отношению к животным контрольной группы на таком же этапе эксперимента.

После отмены ввода препарата, на 28-й день эксперимента, изучаемый показатель падал по отношению к показа-

телю 21-го дня на 46,3%, но оставался высоким по отношению к фоновому показателю (315,4%) и к аналогичному показателю контрольной группы (204,5%), что свидетельствует о кумулятивном эффекте препарата «МиоАктив Форсаж».

Список литературы

1. *Каркищенко Н.Н.* Фармакология процессов адаптации и переносимости предельных нагрузок в спорте и режимах работы «до отказа»: второй тайм для дженериков // Биомедицина. № 4. 2010. С. 6-23.
2. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Касинская Н.В.* Кинезогидродинамическая оценка скоростных характеристик физической работоспособности животных в фармакологических исследованиях // Биомедицина. № 3. 2013. С. 6-17.
2. *Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В.* Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. № 1. С. 72-74.
3. *Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Касинская Н.В., Семенов Х.Х., Степанова О.И., Люблинский С.Л., Берзин И.А., Кольшев И.Ю.* Влияние рецептуры «МиоАктив-Спорт» на психофизические показатели лабораторных крыс // Биомедицина. 2012. № 4. С. 22-31.

Experimental assessment of adaptogeny activity of the preparation “MioActiv Forsage” in the test of compulsory swimming

V.N. Karkishchenko, N.N. Karkishchenko, N.V. Kasinskaya,
O.I. Stepanova, S.E. Dengina, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, I.A. Berzin,
A.O. Revyakin, E.L. Matveenko

Studied influence of the preparation “MioActiv Forsage” on endurance and operability of an organism. In the father-in-law the kinezogidrodinamic model was used. The studied compounding has salutary effect, helps to cope easier with loadings and to reach more good results.

Key words: “MioAktiv Forsage” rats, endurance, working capacity, kinezogidrodinamic model.



Исследование влияния специализированного продукта спортивного питания «МиоАктив Форсаж» на устойчивость крыс линии WAG/GY, к острой гипобарической гипоксии

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

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

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

Статья посвящена изучению влияния специализированного продукта спортивного питания «МиоАктив Форсаж» на резистентность организма крыс линии WAG/GY к острой гипобарической гипоксии. В результате проведенного исследования установлено, что «МиоАктив Форсаж» обусловил высокую устойчивость экспериментальных животных к острой гипобарической гипоксии, которая выразилась в существенном продлении жизни на «высоте», превысив (в несколько раз) показатели животных из контрольной группы. Антигипоксическая активность «МиоАктив Форсаж» сохраняется не менее 7 дней после прекращения его введения.

Ключевые слова: гипобарическая гипоксия, гипоксическая тренировка, антигипоксанты, адаптогены, крысы.

Спорт высоких достижений требует от спортсмена повышения аэробной и анаэробной производительности. При этом биологические механизмы повышения аэробной производительности непосредственно связаны с развитием функциональной системы дыхания в процессе адаптации к гипоксии как в процессе разных видов спортивной тренировки, так и во время пребывания спортсменов в атмосфере с пониженным парциальным давлением кисло-

рода в горах, барокамерах, в условиях нормобарической (прерывистой и интервальной) гипоксической тренировки. Данные литературы последних лет однозначно свидетельствуют о положительном влиянии адаптации к действию регламентированной гипоксии на организм человека и животных [1, 5, 6].

Тренировочный эффект достигается путем использования различных методов защиты организма от гипоксии, в том числе с применением препаратов

с антигипоксантами действием и комплексов биологически активных добавок – адаптогенов, антигипоксической направленности [9]. Как антигипоксантами, так и адаптогены повышают устойчивость организма к различным экстремальным факторам внешней среды, каковыми являются: жара, холод, недостаток кислорода (гипоксия), большая физическая нагрузка, ионизирующая радиация. Повышая приспособляемость организма к большим физическим нагрузкам, эти препараты способствуют росту спортивных результатов.

Полноценное питание спортсменов играет немаловажную роль в обеспечении тренировочного процесса и первой фазы фармакологической поддержки спортсменов. Разработанный специализированный продукт спортивного питания «МиоАктив Форсаж» [2] содержит белки сыворотки молока, триглицериды среднецепочечные, мальтодекстрин, гидролизат белков сыворотки молока и дрожжевого белка, топинамбур, тыкву и кабачки сублимационной сушки, гемоглобин, волокна пищевые растворимые (инулин, фибригам), волокна пищевые пшеничные и яблочные, обогатитель минеральный кальциевый из скорлупы куриных яиц, белки плазмы крови, концентрат белка пищевого птичьего, лецитин, кислота лимонная, кислота янтарная (Е 363), ванилин, стевиозид, кислота аскорбиновая (Е 300), белок йодированный молочный, металлохелаты магния, цинка, кобальта, марганца, меди, а также карнозин и холина хлорид.

Целью настоящей работы явилось изучение антигипоксического эффекта продукта «МиоАктив Форсаж» на организм крыс WAG/GY в тесте острой гипобарической гипоксии.

Материалы и методы

Эксперимент проведен в «ФГБУН НЦБМТ ФМБА России» на крысах линии WAG/GY, разводимых в филиале Центра «Андреевка». В опыте и контроле были использованы самки трехмесячного возраста массой 200 ± 20 г, по 10 особей в каждой группе. Крысы содержались в микроизоляторной системе «RAIR IsoSystem» по 5 голов в каждой. Животные соответствовали категории SPF. В качестве корма использовали стандартный комбинированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р51849-2001 Р5. Очищенная водопроводная вода давалась всем животным вволю в стандартных поилках. Крысы содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха $18-22^{\circ}\text{C}$ при относительной влажности воздуха 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. По прибытии животные 7 дней находились в карантине.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно

утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [8]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биологической комиссии Центра. Исследования направлены на определение выносливости животных, употребляющих продукт «МиоАктив Форсаж» в качестве пищевой добавки, в тесте на устойчивость к острой гипобарической гипоксии.

Мерой оценки чувствительности животных к острой гипобарической гипоксии служило время жизни на «высоте». Каждое животное «поднималось» на критическую высоту (11,5 тыс. м) со скоростью 165 м/с, где находилось до агонального состояния. Исследуемые показатели: ВПП – время первого падения (переход в лежачее положение), характеризующее порог реакции организма на данное воздействие, сек; ВЖ – время жизни на «высоте» (до появления агонального дыхания), сек; ВВП – время восстановления позы после спуска животного с «высоты», сек.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные данные по исследованию влияния продукта «МиоАктив Форсаж» на индивидуальную чувствительность к острой гипобарической гипоксии у экспериментальных животных представлены в табл.

Таблица
Показатели антигипоксической защиты препарата «МиоАктив Форсаж» крыс WAG/GY

Срок исследования	контроль	опыт
Время жизни на «высоте», сек		
1-й день (фон)	390,0±148,0	337,5±63,5
2-й день	400,5±164,5	568,5±107,1
7-й день	386,0±143,0	568,0±212,4
14-й день	373,0±157,0	754,0±248,0
21-й день	340,0±130,0	929,0±392,8
28-й день	338,0±172,8	863,0±296,2
Коэффициент антигипоксической защиты		
2-й день	1,42	1,68
7-й день	1,47	1,68
14-й день	2,02	2,23
21-й день	2,73	2,73
28-й день	2,55	2,55
Время первого падения, сек		
1-й день (фон)	9,0±2,4	12,5±2,5
2-й день	10,0±2,0	12,5±2,5
7-й день	11,0±2,4	10,5±1,8
14-й день	9,5±2,7	9,5±2,7
21-й день	14,0±3,4	12,5±4,0
28-й день	11,5±3,8	12,0±3,0
Время восстановления позы, сек		
1-й день (фон)	72,0±32,4	43,0±16,6
2-й день	57,5±20,5	48,0±24,0
7-й день	53,0±25,6	63,0±23,0
14-й день	43,0±21,6	44,5±23,5
21-й день	49,0±17,0	63,9±25,7
28-й день	39,0±15,2	57,8±26,9

На основании полученных результатов следует заметить, что препарат «МиоАктив Форсаж» обусловил существенную антигипоксическую устойчивость у крыс подопытной группы, которая проявилась в значительном продлении их жизни на «высоте» в сравнении с животными контрольной группы (рис. 1-3). Так, у лабораторных крыс, которые получали препарат «МиоАктив

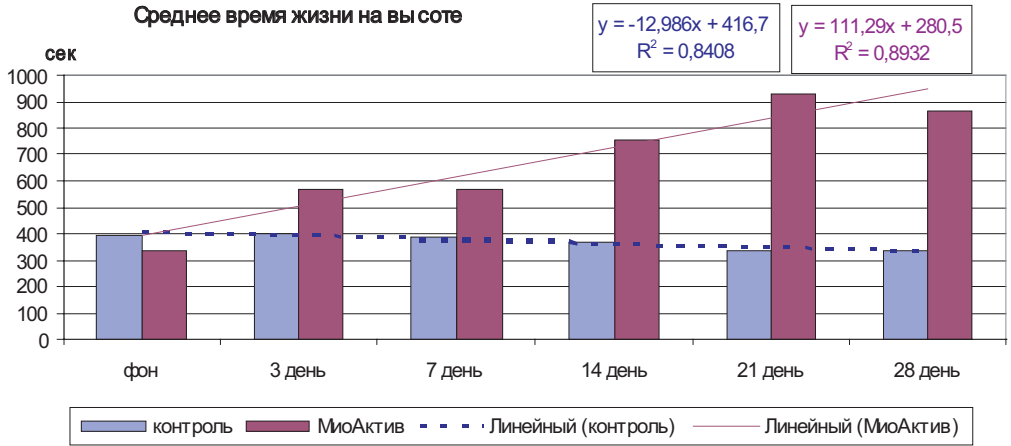


Рис. 1. Влияние продукта «МيوАктив Форсаж» на среднее время жизни на «высоте» крыс WAG/GY.

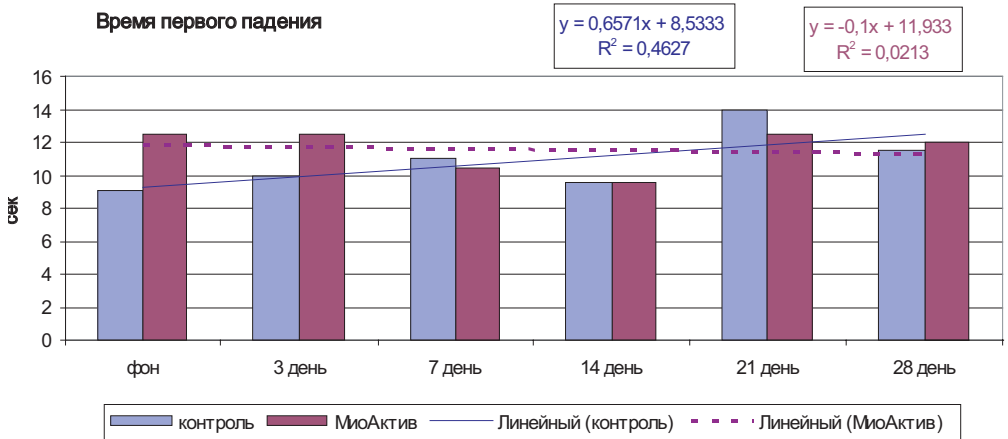


Рис. 2. Влияние продукта «МيوАктив Форсаж» на время первого падения крыс WAG/GY.

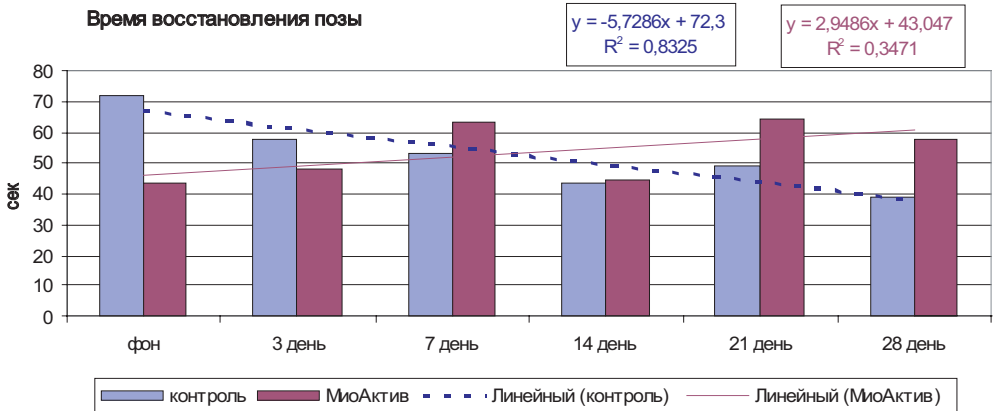


Рис. 3. Влияние препарата «МيوАктив Форсаж» на время восстановления позы крыс WAG/GY.

Форсаж» уже на 7-й день приема, время жизни на «высоте» было продлено по сравнению с показателями животных контрольной группы в 1,47 раза, на 14-й день наблюдалось увеличение в 2 раза, а на 21-й день – в 2,5-2,8 раза. Дисперсионный анализ выявил, что 36,8% общей вариации времени жизни на «высоте» можно объяснить влиянием употребляемого продукта «МиоАктив Форсаж», достоверность влияния $p < 0,001$; $F_{критическое} = 1,89$; $F_{фактическое} = 7,14$. Таким образом гипотеза о достоверности влияния препарата «МиоАктив Форсаж» на время жизни лабораторных крыс WAG/GY на «высоте» подтверждается.

Необходимо отметить также, что эффективность защиты от гипоксического стресса у препарата «МиоАктив Форсаж» сохранялась на высоком уровне и после прекращения его приема. Так, на 28-й день (через 7 дней после прекращения его приема), он способствовал продлению жизни на «высоте» животным опытной группы на 155% в сравнении с показателем в контрольной группе. Интересен тот факт, что время жизни на «высоте» у контрольной группы крыс, хотя и незначительно, но снижалось на каждом этапе тестирования. Так, если на 7-й день (во 2-й повтор гипоксии) время пребывания на «высоте» в сравнении с фоновым показателем снизилось на 1%, т.е. равнялось 386сек., то за 3 последующих повтора – 28-й день – оно снизилось уже на 13,3% и составляло 338сек.

Рассмотрение линии тренда (рис. 1) наглядно показывает, что среднее время жизни на «высоте» у крыс контрольной группы достоверно снижается, а в экспериментальной группе, также до-

стоверно, растет, несмотря на некоторое снижение результатов на 28-й день эксперимента, т.е. после 7 дней отмены продукта.

Изучение времени первого падения крыс показывает, что, хотя и не значительно, но в экспериментальной группе намечается тенденция к его снижению (табл., рис. 2). Время восстановления позы в контрольной группе достоверно снижается, а в экспериментальной – имеет тенденцию к росту. Однако при анализе этих показателей надо учитывать, что на протяжении эксперимента животные «тренировались» и приобрели некоторые навыки пребывания на «высоте», но в контрольной группе это были естественные процессы адаптации организма к условиям окружающей среды, а в экспериментальной, получавшей продукт «МиоАктив Форсаж» были замечены и другие явления. Существенное увеличение времени жизни на «высоте» по сравнению с фоновыми данными в экспериментальной группе составили 1,68 раза на 2-й и 7-й день; 2,23 раза – на 14-й день; 2,75 и 2,56 раза – на 21-й и 28-й день, соответственно. При этом время восстановления позы по сравнению с фоновыми значениями увеличилось в 1,12 раза на 2-й день; в 1,47 раза – на 7-й день; в 1,49 раза – на 14-й и 21-й дни и в 1,34 раза – на 28-й день. Таким образом, можно сказать, что существенное увеличение времени жизни на «высоте» привело к не столь заметному росту времени восстановления позы. Тогда как в контрольной группе произошло снижение времени жизни на «высоте» по сравнению с фоном в 1,03 раза на 2-й день, в 0,99 и 0,96 раза на 7-й и 14-й дни, соответственно, и в 0,87 раза на 21-й и 28-й

дни. При этом время восстановления позы по сравнению с фоном снизилось в 0,80 раза на 2-й день; в 0,74 раза – на 7-й день; в 0,60 раза – на 14-й день; в 0,68 раза – на 21-й день и в 0,80 раза – на 28-й день. Мы можем сказать, что снижение времени жизни на «высоте» и время восстановления позы в контрольной группе животных практически сопоставимы в своем изменении, в то время как в экспериментальной группе время восстановления позы существенно меньше в соотношении со временем жизни на «высоте».

Анализ времени восстановления позы относительно времени жизни на «высоте» показывает, что животные в контрольной группе затрачивали на восстановление позы в первый день наблюдений 0,18 сек на каждую секунду жизни на «высоте», во второй, третий и 21-й дни – 0,14 сек; в 14-й день – 0,12 и 28-й день – 0,17 сек. Эти показатели мало отличаются друг от друга и их среднее значение составляет 0,15 сек. Животные экспериментальной группы в первый день наблюдений затрачивали на восстановление позы 0,13 сек на каждую секунду жизни на «высоте», во второй и 14-й дни – 0,08 сек; в 7-й день – 0,11 сек; в 21-й и 28-й дни – 0,07 сек. В среднем животные экспериментальной группы затрачивали на восстановление позы 0,09 сек на каждую секунду жизни на «высоте», что в 1,65 раза ниже, чем в контрольной группе.

Можно предположить, что этот эффект достигается за счет входящих в состав препарата «МиоАктив Форсаж» лимонной и янтарной кислоты, которые участвуют в цикле Кребса, металлохелатов, а также гемоглобина, кото-

рый усиливает синтез собственного гемоглобина в крови испытуемых животных и повышает транспортную систему кислорода в крови.

Литературные данные последних лет однозначно свидетельствуют о положительном влиянии адаптации к действию гипоксии на организм человека и животных [1, 4, 5, 7, 9]. Однако этого можно достигнуть на экспериментальных моделях в результате многократного (25-35 дней ежедневно, 4-6 ч/день) пребывания в барокамере на «высоте» не более 5000 м [3]. В нашем же случае проведено лишь 6 повторов гипобарической гипоксии на критической «высоте» (11,5 тыс. м). По-видимому, в данном случае причиной снижения времени жизни на «высоте» является страх, сохраняющийся в памяти крыс от предыдущего и предыдущих гипоксических стрессов.

Заключение и выводы

Согласно полученным в тесте на индивидуальную чувствительность к острой гипобарической гипоксии данным, препарат «МиоАктив Форсаж» проявил высокую антигипоксическую активность, что выразилось в значительном продлении жизни подопытным животным на «высоте» в сравнении с фоновыми показателями и показателями аналогов в контрольной группе. Наибольшую активность по защите организма от гипоксии «МиоАктив Форсаж» проявил на 21-й день курса приема животными. Под его влиянием время жизни на «высоте» у экспериментальных крыс было продлено более чем в 2,5-2,8 раза. При этом время восстановления позы снизилось по сравнению с контрольной группой в 1.65 раза в пересчете на 1 секунду жизни на «высоте».

Список литературы

1. *Агаджанян Н.А., Миррахимов М.М.* Горы и резистентность организма. М.: Наука. 1970. с. 184.
2. *Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В. Касинская Н.В., Семенов Х.Х., Степанова О.И., Люблинский С.Л., Берзин И.А., Кольшев И.Ю.* Влияние рецептуры «МиоАктив-Спорт» на психофизические показатели лабораторных крыс // Биомедицина, № 4. 2012. с.22-31.
3. *Лукьянова Л.Д., Ушаков И.Б.* Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. М. 2004. с.167.
4. *Меерсон Ф.З.* Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. / Нур. Med. Ltd. М. 1993. 332 с.
5. *Меерсон Ф.З., Твердохлиб В.П., Боев В.М. и др.* Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике. М. Наука. 1989. с.70.
6. *Никоноров А.А., Твердохлиб В.П.* Влияние адаптации к действию регламентированной гипобарической гипоксии различной продолжительности на организм спортсменов, специализирующихся в видах спорта на выносливость // Теория и практика физической культуры № 1. 2004. <http://lib.sportedu.ru/press/tpfk/2004n1/p9-11.htm>
7. *Озолин Э.С.* Использование гипербарической оксигенации и нормобарической гипоксии в подготовке спортсменов / Теория и практика физической культуры. 2005. №1. с. 5-8.
8. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под редакцией Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М: Профиль-2С. 2010. 358с.
9. *Сухов С.В., Акимова О.Г., Карнаух Н.А.* Динамика физической работоспособности и аэробных возможностей у спортсменов в условиях сочетанной гипоксии при приеме комплекса БАД. / Вестник Каз НМУ – 2011.

Research of influence of a special product for sport nutrition “MioActiv Forsage” on WAG/GY-rats resistance to a sharp hypobaric hypoxia

Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkishchenko, I.A. Berzin, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, E.L. Matveenko, N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina

Article is devoted to studying of influence of a special product for sport nutrition “MioActiv Forsage” pharmaceutical on resistance of an organism of WAG/GY rats to a sharp hypobaric hypoxia. As a result of the conducted research it is established that “MioActiv Forsage” caused high resistance of experimental animals to a sharp hypobaric hypoxia which was expressed in essential extension of life at “height”, having exceeded (several times) indicators of analogs from control group. Antihypoxant activity works at least 7 days after the termination of its introduction.

Key words: hypobaric hypoxia, hypoxemic training, antihypoxants, adaptogens, rats.



Противоопухолевая активность наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот в отношении экспериментальной аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6

В.Ю. Балабаньян¹, В. Боят¹, Г.Д. Капанадзе², Я.М. Хамди³, В.И. Швец³

¹ – Общество с ограниченной ответственностью «Технология лекарств», Московская область

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

³ – Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва

Контактная информация: Балабаньян Вадим Юрьевич bal.pharm@mail.ru

В экспериментах *in vivo* выявлена способность наносомальной формы паклитаксела оказывать выраженный цитостатический эффект в отношении аденокарциномы молочной железы Ca755 у мышей линии C57BL6, экспрессирующей Р-гликопротеин.

Ключевые слова: наночастицы, паклитаксел, аденокарцинома молочной железы, Р-гликопротеин.

Паклитаксел – химиотерапевтическое средство из группы таксанов, ингибитор образования микротрубочек с антиангиогенным и апоптогическим действием [12, 13]. Паклитаксел оказывает выраженный цитостатический эффект в исследованиях *in vitro*, при этом его клиническое применение лимитировано следующими показаниями: немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак молочной железы и саркома Капоши у больных СПИД-ом [6]. Снижение ак-

тивности паклитаксела *in vivo* в определенной степени обусловлено множественной лекарственной устойчивостью опухолевых клеток [8,9]. Паклитаксел является субстратом Р-гликопротеина, что существенно снижает его эффективность при лечении высокорезистентных опухолей, продуцирующих Р-гликопротеин [10].

Одним из способов преодоления лекарственной резистентности опухолевых клеток является создание нанораз-

мерных форм цитостатиков на основе полимерных наночастиц [11]. Учитывая вышеизложенное, нами была разработана технология получения наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) с поверхностью частиц, модифицированной полоксамером 188 (Плюроник Ф 68). Предложенная технология позволяет получать стабильную наносуспензию с размером частиц 250 ± 50 нм при степени включения паклитаксела 90-95 % [2]. Проведенные нами исследования *in vitro* выявили способность разработанной наносомальной формы паклитаксела оказывать выраженный цитостатический эффект *in vitro* в отношении высокорезистентных клеток Т-лимфобластного лейкоза (Jurkat WT), экспрессирующих Р-гликопротеин [1,3,7].

Целью данного исследования явилось изучение противоопухолевой активности наносомальной формы паклитаксела на модели *in vivo* – резистентной аденокарциноме молочной железы Ca 755 у мышей линии C57BL6.

Материалы и методы

Исследование выполнено на перевиваемой модели опухолевого роста мышей – солидной опухоли - аденокарциноме молочной железы, штамм Ca755, экспрессирующий Р-гликопротеин. Штамм Ca755 получен из коллекции опухолей Научно-исследовательского института морфологии человека РАМН.

Аденокарцинома Ca755 впервые получена в 1936 г. от спонтанной опухоли молочной железы у самки мыши C57BL6. Штамм был создан в Национальном институте рака США 5 сентя-

бря 1973 г. Средняя продолжительность жизни животных с опухолью – 23-27 дней. Поддерживается на мышах линии C57BL6. В опытах использовали 2-ой пассаж перевиваемой модели. Опухоли перевивали по стандартной методике половозрелым мышам-самкам линии C57BL6 массой 18-22 г (в каждой группе по 16 животных). Инокуляция опухолевых клеток проводилась подкожно в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1:10 (5×10^6 клеток). Введение наносомальной и стандартной форм паклитаксела проводилось один раз в сутки в хвостовую вену в течение 7 дней; первое введение препаратов осуществляли через 48 часов после прививки опухолевых клеток. Наблюдение за мышами проводилось в течение 50 дней после введения опухолевых клеток животным. Исследуемые лекарственные формы тестировали в 3-х дозах: 19 мг/кг, 9,5 мг/кг и 6,4 мг/кг (в расчете на паклитаксел).

Оценку эффективности лечения проводили по показателям увеличения продолжительности жизни и торможения роста опухоли [4].

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) леченных животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле 1:

$$\text{УПЖ \%} = (\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_к) / \text{СПЖ}_к \times 100 \quad (1),$$

где СПЖ₀ и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных. Показатели эффективности изучаемых препаратов определяли в сравнении с контрольными группами.

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле 2:

$$\text{ТРО \%} = (V_k - V_0) / V_k \times 100 \quad (2),$$

где V_k и V_0 – средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах, который для каждой солидной опухоли определялся как произведение размеров трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили на 1, 6, 8 и 14-е сутки после прекращения лечения.

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Статистика 6.0 (StatSoft, USA). Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими методами, так как тип распределения был нормальным. В качестве параметрического критерия использовали t-критерий Стьюдента для независимых переменных. Различия были определены при 0.05 уровне значимости. Результаты исследования выражали как среднее \pm ошибка среднего.

Результаты и их обсуждение

Результаты определения продолжительности жизни на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 у мышей линии C57BL6 представлены в таблице 1. При вычислении средней продолжительности жизни мышей в каждой группе не учитывали животных, павших в период лечения. Это позволило отделить противоопухолевое действие тестируемых лекарственных форм от токсического эффекта.

Увеличение продолжительности жизни на 25% и более считается показателем терапевтической эффективности тестируемого вещества [4]. На основании этого можно заключить, что наносомальная форма паклитаксела оказала выраженный цитостатический эффект в отношении аденокарциномы молочной железы во всех трех тестируемых дозах, тогда как стандартная форма подобным эффектом не обладала. При введении тестируемых форм мышам в

Таблица 1
Влияние наносомальной и стандартной форм паклитаксела на продолжительность жизни мышей линии C57BL6

Препарат	Доза активного вещества, мг/кг	Средняя продолжительность жизни (дни, $M \pm m$)	Увеличение продолжительности жизни (%)
Контроль (физиологический раствор)	0	23,9 \pm 0,98	-
Паклитаксел (стандартная форма)	19	25,3 \pm 0,53	5,8
	9,5	27,5 \pm 0,77*	15,0
	6,4	26,7 \pm 0,68*	11,7
Паклитаксел (наносомальная форма)	19	30,9 \pm 0,71*	29,2
	9,5	35,2 \pm 0,91*	47,2
	6,4	31,5 \pm 0,78*	31,2

Примечание: * – статистически значимое отличие от контроля по t-критерию Стьюдента, при $p < 0,05$.

более высокой дозе (19 мг/кг) показатель УПЖ снижался, что объясняется токсичностью паклитаксела, в результате которой происходила частичная гибель животных на ранних сроках исследования. При этом наносомальная форма существенно снижала токсичность паклитаксела.

Результаты влияния тестируемых форм паклитаксела на рост опухоли представлены в табл. 2.

Активными в противоопухолевом отношении считаются дозы препаратов, вызывающие торможение роста опухоли $\geq 70\%$ продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [4]. Анализируя терапевтическое действие тестируемых форм паклитаксела, мож-

но отметить, что по показателю ТРО наносомальная форма проявила эффективность во всех трех экспериментальных дозах. При этом эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения, что обусловлено постепенной биодеградацией наночастиц и выходом из них паклитаксела. Стандартная форма паклитаксела статистически достоверно тормозила рост опухоли, однако показатель ТРО находился в диапазоне от 46 до 19 %, тогда как для наносомальной формы этот показатель составил от 81 до 70 %.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что наносомальная форма паклитаксела оказывает выраженный цитостатический эффект в

Таблица 2

Влияние наносомальной и стандартной форм паклитаксела на рост аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6

Препарат	Доза активного вещества, мг/кг	Объем опухоли (мм ³ , M±m), (ТРО)			
		Дни после окончания лечения			
		1	6	8	14
Контроль (физиологический раствор)	0	2896±356	6228±708	9490±899	28218±3140
Паклитаксел (стандартная форма)	19	1613±84* (44%)	3949±263* (37%)	6458±310* (32%)	21249±834* (25%)
	9,5	1724±133* (40%)	3718±309* (40%)	5124±615* (46%)	20522±1019* (27%)
	6,4	1942±141* (33%)	4284±434* (31%)	6910±645* (27%)	22880±1376* (19%)
Паклитаксел (наносомальная форма)	19	547±97* (81%)	1743±279* (72%)	2457±583* (74%)	7108±831* (75%)
	9,5	733±130* (75%)	1872±383* (70%)	2681±565* (72%)	8186±864* (71%)
	6,4	810±121* (72%)	1784±471* (71%)	2596±588* (73%)	7925±1225* (72%)

Примечание: * – статистически значимое отличие от контроля по t-критерию Стьюдента, при $p < 0,05$.

отношении резистентной аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6. В свою очередь, выявленный эффект является результатом проникновения паклитаксела в клетки аденокарциномы, экспрессирующие Р-гликопротеин. Существенную роль в этом процессе играет плуроник Ф 68, применяемый для модификации поверхности наночастиц. Известно, что плуроник Ф 68 индуцирует конформационные изменения, приводящие к снижению сродства Р-гликопротеина для лекарственных веществ и АТФ, а также вызывает внутриклеточное снижение АТФ, необходимое для функционирования системы Р-гликопротеина [5,14]. Полученные нами результаты коррелируют с данными Vauthier С. и соавт. о способности полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом 80, обеспечивать транспорт доксорубина в резистентные опухолевые клетки [15].

Список литературы

1. **Боят В., Балабаньян В.Ю., Аляутдин Р.Н.** Внутриклеточное накопление и противоопухолевая активность наносомальных форм паклитаксела // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011. Т.74, №3. С. 22-25.
2. **Боят В., Хамди Я.М., Балабаньян В.Ю. и др.** Получение наносомальной лекарственной формы паклитаксела // Фармация. 2010. №4. С. 32-33.
3. **Боят В., Хамди Я.М., Балабаньян В.Ю. и др.** Цитотоксический эффект паклитаксела, включенного в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т.151. №3. С. 315-318.
4. **Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1.** М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
5. **Anand P., Nair H.B., Sung B., et. al.,** Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochem Pharmacol* 79(3) (2010) 330-338.
6. **Bardelmeijer H.A., Beijnen J.H., Brouwer K.R., et. al.,** Increased oral bioavailability of paclitaxel by GF120918 in mice through selective modulation of P-glycoprotein, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 4416-4421.
7. **Bojat V., Balabanyan V.Yu., Alyautdin R.N.** The entrapment of paclitaxel in PLGA nanoparticles increases its cytotoxicity against multiresistant cell line // *British Journal of Medicine and Medical Research.* -2011.- №1(4).- P. 306-319.
8. **Cornaire G., Woodley J., Hermann P., et.al.,** Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo, *Int J Pharm.* 2004 Jun 18;278(1):119-31.
9. **Gallo J.M., S. Li, P. Guo, K. Reed, et. al.,** The effect of P-glycoprotein on paclitaxel brain and brain tumor distribution in mice. *Cancer Res* 63(16) (2003) 5114-5117.
10. **Ganta S., Amiji M.,** Coadministration of Paclitaxel and Curcumin in Nanoemulsion Formulations To Overcome Multidrug Resistance in Tumor Cells. *Mol. Pharmaceutics* 6 (3) (2009) 928-939.
11. **Musyanovych A., Schmitz-Wienke J., Mailander V., et. al.,** Preparation of

- biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. *Macromol Biosci* 8(2) (2008) 127-139.
12. **Grogan BT, Gilmartin B, Carney DN,** Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1785:96-132.
13. http://www.vidal.ru/poisk_preparatov/act_793.htm
14. **Thomas H., Coley H.M.,** Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control*. 2003;10:159-165.
15. **Vauthier C., Dubernet C., Chauvierre C., et.al.,** Drug delivery to resistant tumors the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles.// *J. Control. Release*. 2003. V.93. N 2. P. 151-160.

Antitumor activity of nanoparticulate paclitaxel formulation based on lactic and glycolic acids copolymer in an experimental mammary adenocarcinoma in C57BL6 mice

V.Yu. Balabanyan, V. Bojat, G.D. Kapanadze, Ya.M. Hamdy, V.I. Shvets

Potent cytotoxic effect of nanoparticulate paclitaxel was revealed in vivo against P-glycoprotein expressing mammary adenocarcinoma Ca755 in C57BL6 mice.

Key words: nanoparticles, paclitaxel, mammary adenocarcinoma, P-glycoprotein.

Экспериментальная сравнительная оценка эффективности режимов абляции различной длительности импульсами CO₂ лазеров на кожных покровах мини-свиней для целей лазерной дермабразии

Н.Е. Горбатова¹, С.А. Золотов¹, Я.О. Симановский², С.М. Никифоров²,
С.В. Голубев², С.С. Алимбиев³, А.В. Гейниц⁴, В.И. Елисеенко⁴,
Н.В. Станкова⁵

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

² – ООО «Энергомаштехника», Москва

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

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

⁵ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская Область

Контактная информация: д.м.н. Горбатова Наталья Евгеньевна natashgorbatov@yandex.ru

Абляция биоткани излучением CO₂ лазера в настоящее время наиболее эффективный и перспективный физический механизм для устранения патологических изменений, включая рубцовую деформацию, кожных покровов.

В экспериментальной работе *in vivo* на кожных покровах мини-свиней светлогорской популяции на основании анализа сравнительного гистологического исследования было определено, что эффективность и прецизионность абляции значительно выше для импульсно-периодического CO₂ лазера с длительностью импульса 20 мкс и мощностью в импульсе более 2 кВт, при этом обеспечивается максимальное сохранение жизнеспособности тканей по периферии и прогрессивная динамика регенерации абляционных ран, а излучение непрерывного CO₂ лазера с мощностью 50 Вт и длительностью импульса 500 мкс и даже 200 мкс вызывает значительно большее термическое повреждение тканей, окружающих зону воздействия.

Таким образом, данная экспериментальная работа на тканевом уровне подтвердила уникальность и эффективность лазерной абляции кожных покровов излучением импульсно-периодического CO₂ лазера с длительностью импульса 20 мкс и перспективу применения реализуемой им лазерной дермабразии в клинической практике для устранения патологических изменений кожных покровов, включая рубцовую деформацию.

Ключевые слова: импульсно-периодический CO₂ лазер, лазерная абляция, кожные покровы, гистологические исследования.

Введение

В настоящее время лазерная дермабразии, реализуемая физическим механизмом абляции биоткани излучением

CO₂ лазера, является наиболее эффективным и перспективным методом, применяемым в кожно-пластической реконструктивно-восстановительной

хирургии для устранения патологических изменений, в том числе рубцовой деформации, кожных покровов, там где предпочтительнее прецизионное, послойное и параллельное поверхности удаление дефектных тканей, при минимальном термическом повреждении по периферии. [2, 6, 13, 15, 17, 18].

Под лазерной абляцией принято понимать комплекс процессов при воздействии лазерного излучения на биологическую ткань, приводящих к резкому, взрывному, выбросу вещества из зоны воздействия излучения. Для медицинских приложений интересен режим, при котором удаление вещества из зоны воздействия происходит так быстро, что окружающие лазерный кратер ткани не успевают нагреться за счет передачи тепла, для этого длительность импульса CO₂ лазера не должна превышать 100 мкс, а дальнейшее его укорочение должно обеспечить сокращение зоны теплового повреждения и положительный эффект. [1, 11, 16, 19, 20].

Рядом исследователей установлено, что для лазерной дермабразии оптимальный режим абляции биологических тканей, обеспечивающий удаление их в строго ограниченном слое при минимальном термическом повреждении вокруг зоны воздействия, может быть реализован излучением импульсно-периодического CO₂ лазера с поперечным разрядом с эксклюзивно короткой длительностью импульса 20 мкс для CO₂ лазеров. [3, 4, 5, 8].

Для применения метода лазерной дермабразии в клинической практике кожно-пластической реконструктивно-восстановительной хирургии в ООО «Энергомаштехника» на основе импульсно-периодического CO₂ лазера с попе-

речным разрядом создается лазерный медицинский Аппарат. [3, 4, 5, 8, 9, 10].

Общий вид опытного образца лазерного медицинского Аппарата приведен на рис. 1.



Рис. 1. Общий вид опытного образца лазерного медицинского Аппарата.

Выполненные ранее экспериментальные исследования *in vitro* на модельных биологических тканях (листья растений и образцы охлажденной кожи свиньи) определили ряд позитивных особенностей воздействия излучения импульсно-периодического CO₂ лазера, с длительностью импульса 20 мкс и энергией в импульсе 20-40 мДж. [3, 4, 5, 8].

Эти исследования обозначили возможность применения импульсно-периодического CO₂ лазера в клинической практике кожно-пластической реконструктивно-восстановительной хирургии для целей прецизионного, послойного и параллельного поверхности удаления патологических тканевых

структур, без значительного термического повреждения тканей на периферии зоны абляции.[3, 4, 5, 8].

В экспериментальной работе *in vivo* на коже лабораторных животных для определения преимуществ и возможностей абляции биоткани излучением импульсно-периодического CO₂ лазера с длительностью импульса 20 мкс, были выполнены морфологические гистологические исследования и изучен характер изменений кожи и ее регенерация после воздействия импульсов данного лазера, а также проведено сравнение с результатами при использовании длинных (200 и 500 мкс) модулированных импульсов, генерируемых непрерывным CO₂ лазерным хирургическим аппаратом «Ланцет-2».[12].

Экспериментальные исследования

В эксперименте, в зависимости от поставленной конкретной задачи исследования режимов абляции, использовали определенные рабочие характеристики сравниваемых CO₂ лазеров, а именно,

энергию в импульсе, длительность импульса, количество импульсов в одну точку за время равное 1 секунде.

Результат абляции оценивали на основании изучения гистологических препаратов, образцов кожи модельных биообъектов после воздействия в режиме абляции импульсов сравниваемых CO₂ лазеров. Сравнивались форма абляционного кратера - дефекта, размер и выраженность зоны термического периферического повреждения, а также характер и сроки заживления абляционных ран.

Экспериментальное оборудование, материалы и методы

В экспериментальной работе использовали опытный образец лазерного медицинского Аппарата на основе импульсно-периодического CO₂ лазера с поперечным разрядом и серийный лазерный хирургический аппарат «Ланцет-2», на основе непрерывного CO₂ лазера с радиочастотной накачкой. Параметры CO₂ лазеров приведены в табл. 1.

Таблица 1

Параметры CO₂ лазеров

Параметры сравниваемых CO ₂ лазеров	Импульсно-периодический CO ₂ лазер	Модулированный непрерывный CO ₂ лазер - аппарат «Ланцет-2»
Длительность импульса по уровню 0.1	20 мкс	200мкс 500 мкс
Энергия в импульсе	20, 30, 40 мДж	10 мДж (200мкс) 25 мДж (500 мкс)
Длина волны излучения	10.6 мкм	10.6 мкм
Импульсная мощность	Более 2000 Вт.	50 Вт
Количество импульсов в одну точку, однократно за 1 секунду	1, 5, 10, 25, 50	10
Режим непрерывного излучения	нет	есть
Диаметр пятна излучения на поверхности по уровню 0.5	0.8 - 1	0.8 - 1

При проведении сравнительных экспериментов соблюдали воспроизведение заданных параметров излучения на обрабатываемой поверхности. Для сохранения размеров пятна окончную часть лазерного манипулятора фиксировали на кронштейне, что позволяло сохранять постоянным расстояние, составляющее 100-102 мм от фокусирующей линзы до поверхности кожи.

Для измерения энергии импульсов использовали цифровой лазерный измеритель мощности Gentec Solo PE.

Эксперименты проводились следующим образом. Оконечное устройство фиксировалось в штативе на заданном расстоянии от поверхности кожи и проводилось последовательное воздействие заданным количеством лазерных импульсов на одну и ту же точку на коже животного. Количество импульсов в серии изменялось от 1 до 50 при использовании импульсно – периодического CO₂ лазера и от 1 до 10 при использовании лазера «Ланцет 2».

Результаты каждого режима абляции оценивали на основании морфологического гистологического исследования трех соответствующих образцов кожи, с лазерными абляционными точечными ранами. Забор образцов кожи осуществляли сразу после воздействия лазерного излучения (0 срок) и в отдаленные сроки, включая 3-и, 4-е, 7-е, 14-е, 21-ые и 30-е сутки, а также через 6 месяцев после операции. Для морфологического гистологического исследования образцы кожи фиксировали в 10% водном растворе формалина и затем готовили по установленной технологии с окрашкой гематоксилином - эозином.

Гистологические препараты исследуемых образцов кожи изучали при

помощи лабораторного микроскопа с цветной цифровой фотокамерой в проходящем свете. Морфометрические исследования глубины повреждения тканей при воздействии лазерного излучения выполняли с использованием окулярмикрометра МОВ-1-15 X. При анализе гистологического материала, было использовано увеличение: X 80; X 100, X 120, X 180, (объектив 3, 5, 7, 10; окуляр – 10).

В исследованиях было использовано 6 особей мини-свиней светлогорской породы. В возрастном аспекте все лабораторные животные были одного помета в возрасте 6 месяцев, с кожей розового цвета, толщина которой соответствует средней толщине кожных покровов человека 14 - 25 летнего возраста. Так как розовые кожные покровы мини свиней имеют наибольшее сходство с кожей человека по анатомическому строению, элементам и содержанию воды, они являются оптимальным объектом для исследования процессов абляции и заживления абляционных ран [7, 14].

Фотография лабораторного животного перед проведением эксперимента приведена на рис. 2.



Рис. 2. Мини свинья с отмеченными татуировкой зонами для лазерной абляции.

Предварительно на коже мини-свиней была произведена методом татуировки разметка планируемых зон лазерного воздействия.

Эксперимент выполняли на базе ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», в условиях экспериментальной операционной с соблюдением всех хирургических принципов при работе с лабораторными животными.

Все инвазивные вмешательства на лабораторных животных, мини-свиньях, были выполнены под общей анестезией препаратом Золетил, внутримышечно, в установленных весовых дозировках, из расчета 15-25 мг/кг веса животного.

Экспериментальное формирование лазерных абляционных ран, проводили не ранее чем через 2 недели после стихания воспалительного процесса в местах нанесения татуировки. Для каждого абляционного режима воздействия выполняли 6 точечных ран.

Образцы для исследования забирали хирургическим иссечением в форме «лодочки» (рис. 3). После взятия образцов кожи, операционные раны ушивали, швы снимали в общепринятые сроки; все раны зажили первичным натяжением.



Рис. 3. Образец кожи мини-свиньи для морфологического исследования.

Морфологическое гистологическое исследование режимов абляции кожи излучением импульсно-периодического CO₂ лазера с длительностью импульса 20 мкс

В этой серии морфологических гистологических исследований на тканевом уровне были изучены и уточнены характерные особенности термических изменений и процесса регенерации в зонах воздействия излучения импульсно-периодического CO₂ лазера с длительностью импульса 20 мкс.

Абляция проводилась при энергии импульса 20, 30 и 40 мДж. Количество импульсов изменялось от 1 до 50 при общем времени воздействия (длительности серии) 1 секунда.

В работе были изучены особенности термических изменений на поверхности и стенках лазерного кратера-дефекта, его форма, а также характер регенерации абляционных точечных ран.

На основании исследования гистопрепаратов образцов кожи мини-свиней, взятых сразу после воздействия импульсно-периодического CO₂ лазера, была отмечена отчетливая реализация эффекта абляции, при всех используемых режимах излучения, а также определены характерные изменения тканей присущие абляции коротким импульсом 20 мкс. Примеры соответствующих гистологических препаратов приведены на рис. 4-9.

На всех гистопрепаратах при энергии в импульсе 20 мДж и 30 мДж и количестве импульсов в серии от 1 до 10, была отмечена близкая по характеру изменений гистологическая картина. Глубина термических повреждений стенок абляционного кратера не превышала 10-

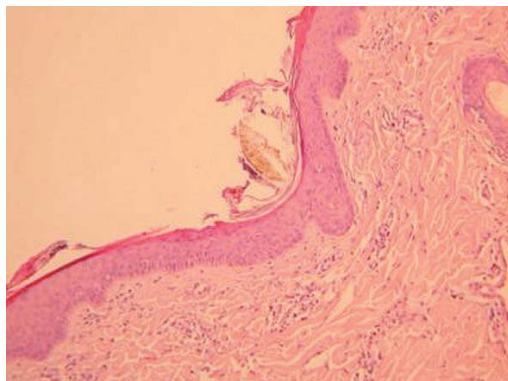


Рис. 4. Режим абляции: 20 мДж, 10 импульсов. Дефект эпидермиса дугообразного профиля. Эпидермис истончен, но его структура не изменена. Над его поверхностью и в просвете дефекта фрагменты коагулированного рогового слоя эпидермиса. Стенки дефекта выполнены тонким слоем оксифильного коагуляционного некроза толщиной не более 5 - 10 мкм. Дерма не изменена. Элементов карбонизации нет. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 80.

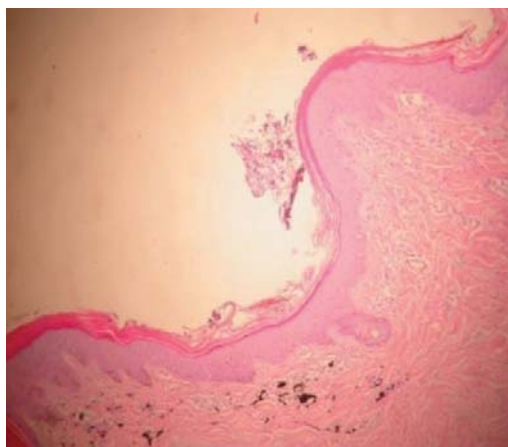


Рис. 5. Режим абляции: 30 мДж, 10 импульсов. Область воздействия имеет вид втянутого в дерму дефекта, относительно глубокого до 2,5 мм и широкого с уплощенным дном. Его ложе и стенки выполнены компактным тонким слоем оксифильного коагуляционного некроза толщиной не более 20 - 30 мкм. В просвете дефекта - фрагменты коагулированного рогового слоя эпидермиса. Элементы карбонизации не определяются. Сохранившийся эпидермис и дерма без патологических изменений. В дерме отмечается артефакт - пигмент от татуировки. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X80.

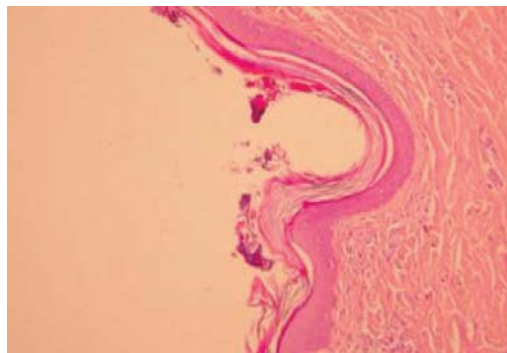


Рис. 6. Режим абляции: 30 мДж, 25 импульсов. Дефект эпидермиса овальной формы с уплощенным дном. Эпидермис стенок дефекта истончен, но его структура не изменена. На поверхности стенок дефекта рыхлый, слоистый термический струп в виде оксифильного коагуляционного некроза, толщиной от 30 до 50 мкм, почти не связанный с сохранившимся эпидермисом. Между струпом и эпидермисом четкая граница в виде светлой полосы. Элементы карбонизации не определяются. Дерма без особенностей. Окраска гематоксилином - эозином. Увеличение X 100.

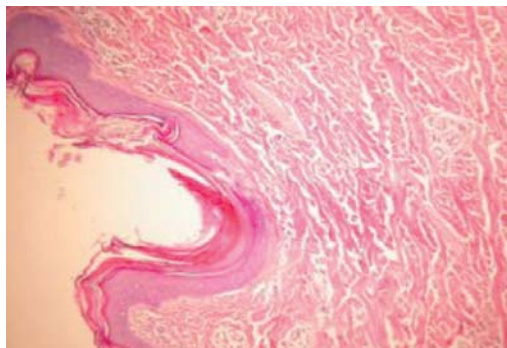


Рис. 7. Режим абляции: 30 мДж, 50 импульсов. Область воздействия представляет относительно глубокий дефект эпидермиса, с втяжением в дерму до 3,5 мм. Форма дефекта овально-цилиндрическая. На поверхности дефекта и в просвете - термический струп, представленный оксифильным коагуляционным некрозом глубиной от 50 - до 150 мкм, рыхло связанный с подлежащими тканями. Стенки и дно дефекта гладкие, выполнены тонким слоем коагуляционного некроза, слегка утолщенным в области дна, но не более 10-20 мкм. Более глубокие слои эпидермиса и дерма без изменений. Элементы карбонизации не определяются. Окраска гематоксилином - эозином. Увеличение X 120.

30 мкм, что обеспечивало сохранение неповрежденными подлежащие слои эпидермиса, включая его ростковые базальные структуры (рис. 4, 5).

Режимы абляции с энергией в импульсе 20 мДж и 30 мДж и при количестве импульсов 25 и 50, приводили к более глубокому термическому повреждению тканей и, соответственно, образованию на поверхности дефекта компактного струпа большей ширины, в среднем от 50 до 150 мкм (рис. 6, 7).

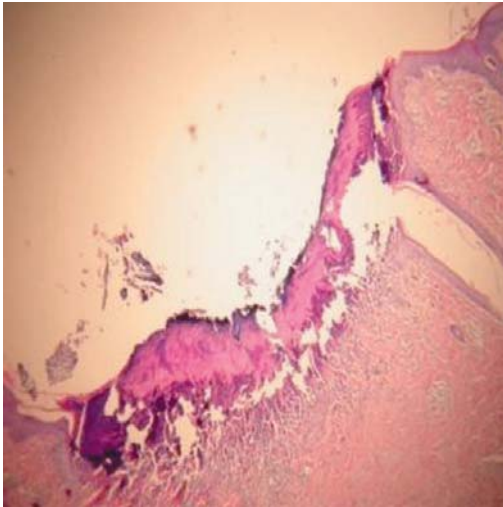


Рис. 8. Режим абляции: 40 мДж, 25 импульсов. Зона воздействия представлена дефектом кожи, глубиной до 4 мм, широкой дугообразной формы. Дефект кожи заполнен компактным термическим оксифильным некрозом эпидермиса и подлежащей дермы. Толщина коагуляционного струпа составляет от 130 до 300 мкм. На поверхности струпа не резко выраженные элементы карбонизации. Близлежащие поверхностные тканевые структуры по краям дефекта не изменены. Струп рыхло связан с подлежащими тканями дермы и отделен от нее широкой светлой зоной отека. Поверхностный слой подлежащей дермы представлен ее фрагментированными коагулированными тканями с толщиной зоны термического повреждения до 80 мкм. Более глубокие слои дермы и придатки кожи не изменены. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 120.

Увеличение энергии в импульсе до 40 мДж, при количестве импульсов 25 и особенно при 50-ти, вызывали еще значительно более выраженные термические изменения и образование широкой зоны от 150 до 300 мкм компактного коагуляционного некроза, струпа, на поверхности дефекта глубиной не менее 5 мм (рис. 8, 9).

Термический струп оксифильного компактного коагуляционного некроза, образующийся сверху стенок, дна и краев

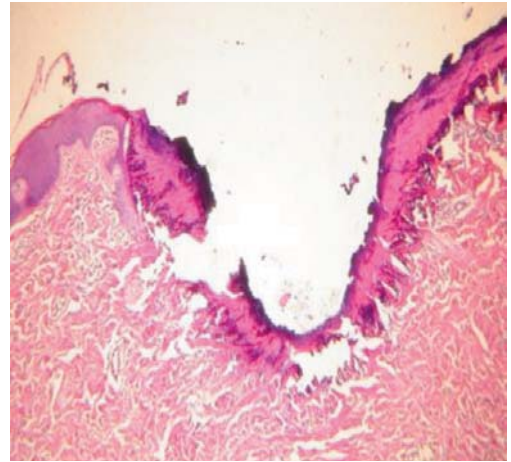


Рис. 9. Режим абляции: 40 мДж, 50 импульсов. Глубокий и широкий полуовальный дефект кожи (эпидермиса и дермы) очагового характера диаметром до 5 мм, с термическим струпом, толщиной от 100 до 300 мкм, в виде компактного коагуляционного некроза всех слоев эпидермиса и подлежащего сосочкового слоя дермы. Резкая граница термических изменений на поверхности краев дефекта, близлежащие ткани не изменены. Некротический струп отделен от подлежащей дермы зоной отека в виде участков просветления. Поверхностный слой подлежащей дермы в области стенок и дна дефекта представлен фрагментированными коагулированными тканями с толщиной термического повреждения от 30 до 80 мкм. В верхнем слое термического струпа определяется поверхностное фрагментарное обугливание. Более глубокие слои дермы и придатки кожи не изменены. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 120.

абляционного дефекта, при всех используемых режимах абляции, определялся в виде отграниченной зоны термического повреждения, рыхло связанной с подлежащими относительно неизменными тканевыми структурами.

При всех исследуемых режимах абляции, формировался относительно широкий абляционный дефект - кратер, с плавными овално-дугообразными контурами и уплощенным дном, стремящийся к цилиндрической форме (рис. 4-9).

Анализ результатов данных гистологических исследований, показал, что при всех исследуемых режимах излучения импульсно-периодического CO₂ лазера, отчетливо реализуется эффект лазерной абляции кожи, который при увеличении энергии импульсов и их количестве, частоты следования, становится более выраженным, то есть непосредственно связан со средней мощностью излучения.

При этом отмечается увеличение глубины лазерного дефекта от 0,1 мм до 5 мм и соответственно ширины зоны компактного коагуляционного некроза, струпа от 10 мкм до 300 мкм. Однако во всех случаях сохраняется отчетливое разграничение этой некротической зоны от подлежащих не удаленных тканевых структур стенок и дна абляционного дефекта, толщина термических поверхностных изменений которых составляет в среднем от 10 до 80 мкм и практически не зависит от показателей режимов абляции.

Исследования позволили, предположить, что для клинического использования предпочтительными режимами точечной абляции излучения импульсно-периодического CO₂ лазера, можно рассматривать импульсную энергию 20 мДж и 30 мДж, при однократном воздей-

ствии в одну точку не более 10 импульсов в секунду. Данные режимы абляции являются одновременно эффективными и термически щадящими, обеспечивая испарение тканевых структур с сохранение неизменными росткового слоя эпидермиса, а также полное отсутствие карбонизации. Режимы абляции энергетически более емкие, при клинической необходимости, могут быть использованы для более глубокой абляции кожных покровов.

Особенности репаративных процессов абляционных лазерных ран, после воздействия излучения импульсно-периодического CO₂ лазера, были определены на основании результата исследования гистопрепаратов образцов кожи, взятых в ближайшем и отдаленном послеоперационном периоде, включая 6 месяцев. Примеры соответствующих гистологических препаратов приведены на рис. 10-15.

Начало формирования грануляционной ткани уже было отмечено на третьи послеоперационные сутки (рис. 10).

Признаки реэпителизации лазерных кратеров, при энергии в импульсе 20 мДж и 30 мДж и количестве импульсов не более 10, определялись с 7-х послеоперационных суток, а при импульсной энергии 30 мДж и увеличении количества импульсов до 25-ти и 50-ти начало эпителизации было отмечено на 14-е сутки (рис. 11, 12).

При большей энергии в импульсе 40 мДж, и количестве импульсов не более 10-ти, эпителизация появлялась, также на 14-тые послеоперационные сутки, а при этой же энергии и увеличении количества импульсов до 25-ти и 50-ти она начиналась с 21-х послеоперационных суток (рис. 13).

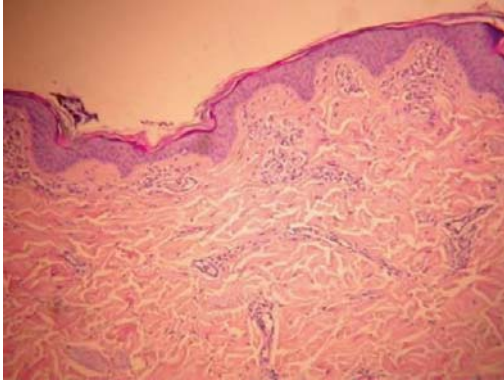


Рис. 10. Режим абляции: 40 мДж, 10 импульсов, 3-и сутки. В области лазерного воздействия в виде слоев фрагменты гомогенного оксифильного термического струпа. Эпидермис неравномерно истончен и его поверхность в этих местах с втяжениями в виде складок. Структура сохранившихся слоев эпидермиса не нарушена. В дерме элементы грануляционной ткани в виде новообразованных капилляров. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 100.

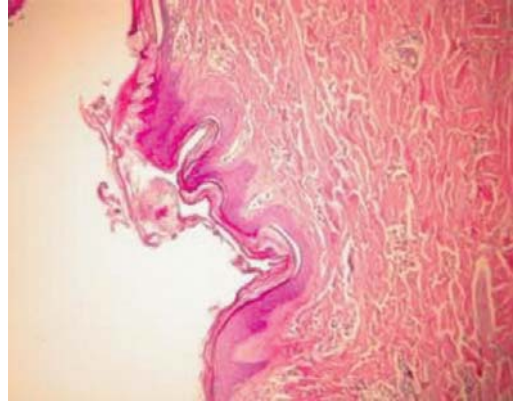


Рис. 11. Режим абляции: 30 мДж, 10 импульсов, 7-е сутки. В просвете широкого с уплощенным дном дефекта, над поверхностью эпидермиса слоистый некротический струп из рогового слоя эпидермиса. Под ним неповрежденные все слои эпидермиса. В сосочковом слое дермы отмечаются новообразованные капилляры грануляционной ткани очагового характера. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 120.

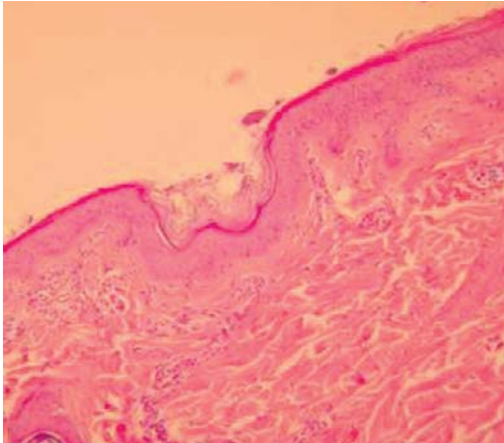


Рис. 12. Режим абляции: 30 мДж, 50 импульсов, 14-и сутки. Очаговое углубление эпидермиса в месте воздействия лазера. На поверхности эпидермиса фрагменты струпа в виде тонких слоистых роговых масс, почти не связанных с подлежащим эпидермисом. Определяются все слои эпидермиса, включая роговой слой, типичный акантоз. Грануляционная ткань располагается субэпидермально и островками в акантотических тяжах эпидермиса. Дерма не изменена. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 80.

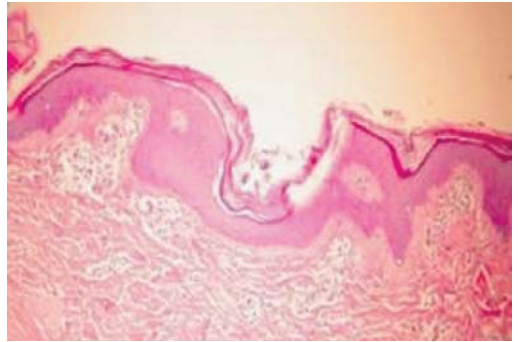


Рис. 13. Режим абляции: 40 мДж, 50 импульсов, 21-е сутки. Фрагменты отторгающегося термического струпа в области лазерного воздействия, имеющего вид втяжения дугообразного характера с уплощенным дном. В дне втяжения отмечается истончение эпидермиса, роговой слой прослеживается, блестящий и зернистый слой не изменены. Над поверхностью втянутого эпидермиса определяется тонкая пленка коагуляционно-гомогенного термического некроза. В дерме определяются элементы формирующейся грануляционной ткани с большим количеством новообразованных капилляров. Воспалительных проявлений на термическое повреждение нет. Присутствует артефакт – пигмент тату. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 80.

Полное восстановление структуры кожного покрова, без следов фиброзной деформации, не зависимо от энергетике режима абляции, имело место к 30-м послеоперационным суткам (рис. 14).

На гистологических препаратах образцов кожи, взятых через 6 месяцев после воздействия режимов абляции излучения импульсно-периодического CO₂ лазера был отмечен хороший положительный результат, без патологических изменений тканей кожных покровов (рис. 15).

На основании результатов гистологического исследования процессов репарации абляционных ран, после воздействия режимов абляции излучения импульсно-периодического CO₂ лазера, было отмечено ускорение процесса регенерации, опережающее физиологические сроки, в связи с сокращением экссудативной фазы асептического характера воспаления, более ранним отторжением некротического струпа и развитием грануляционной ткани с новообразованными капиллярами, а также возможностью сохранения ростковых структур эпидермиса. Все это обеспечивало активную, быструю, без фиброзной трансформации грануляционной ткани, реэпителизацию раневых дефектов.

Таким образом, на основании данной серии гистологических исследований было установлено, что используемые режимы абляции импульсно-периодического CO₂ лазера эффективно и прецизионно реализуют абляцию кожи, при этом максимально сохраняя жизнеспособность остающихся тканей, а также определено, что наиболее оптимальными режимами абляции для дальнейшего клинического применения можно рассматривать энергию в импульсе 20

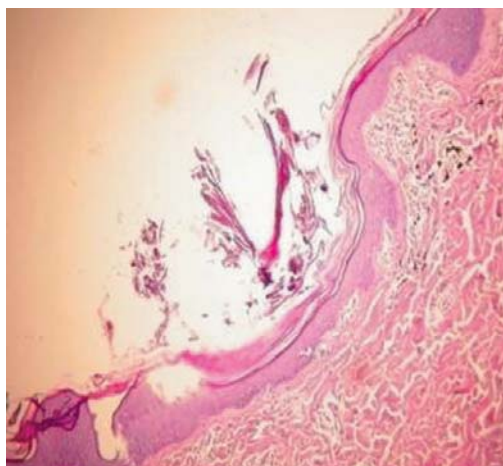


Рис. 14. Режим абляции: 40 мДж, 50 импульсов, 30-е сутки. В месте лазерного воздействия, в самом центре его сохраняется небольшой втянутый дефект с незначительным истончением эпидермиса, все слои последнего полностью восстановлены, включая поверхностный роговой слой. Структура дермы не изменена, в ней субэпидермально, расположены сливные очажки грануляционной ткани. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 80.

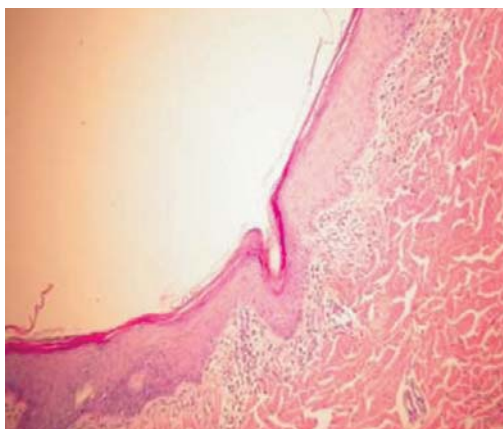


Рис. 15. Режим абляции: 40 мДж, 50 импульсов, через 6-ть месяцев. В области воздействия выявляется очаговый поверхностный плоский дефект эпидермиса, с небольшим истончением его толщины. Все слои эпидермиса полностью восстановлены. Дерма не изменена. Характерно наличие периваскулярных лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов в дерме, морфологических манифестантов активации неспецифического иммунитета. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение X 80.

мДж и 30 мДж, при однократном воздействии в течение одной секунды не более 10 в одну точку. Данные режимы абляции, обеспечивая испарение тканевых структур с сохранением росткового слоя эпидермиса, позволят в дальнейшем выполнять эффективную и термически щадящую лазерную дермабразию в клинических условиях. Режимы абляции энергетически более емкие могут быть использованы для более глубокой абляции кожных покровов, при наличии соответствующих клинических показаний.

Морфологическое гистологическое исследование режимов абляции модулированными импульсами непрерывного CO₂ лазера с длительностью импульсов 500 и 200 мкс.

Для сравнения и уточнения отличительных особенностей режимов абляции излучения импульсно-периодического CO₂ лазера с длительностью импульса 20 мкс были проведены морфологические гистологические исследования образцов кожи мини-свиней с точечными зонами воздействия режимов абляции модулированными импульсами излучения непрерывного CO₂ лазера с длительностью импульсов 500 и 200 мкс.

В качестве источника импульсов длительностью 500 и 200 мкс использовался лазерный хирургический аппарат «Ланцет-2», непрерывный CO₂ лазер с возможностью модуляции выходного излучения. В импульсном режиме с длительностью импульса 500 и 200 мкс выходная импульсная мощность лазера постоянная и составляла 50 Вт, поэтому энергия импульсов составляла соответственно 25 и 10 мДж. Таким образом, сравнение CO₂ лазеров прово-

дили при одинаковой энергии импульса, с режимами абляции модулированным импульсом длительностью 500 мкс, а с длительностью 200 мкс, соответственно, при меньшей импульсной энергии.

Точечную абляцию кожи излучением непрерывного CO₂ лазера, выполняли за время равное 1 секунде воздействуя в одну точку сериями от 1 до 10 импульсов. Это соответствует полной энергии в серии импульсов 100 и 250 мДж соответственно.

В процессе анализа гистологических препаратов полученных из образцов кожи мини-свиней после воздействия излучением сравниваемых CO₂ лазеров изучали различия и особенности формы лазерных кратеров, выраженность термических изменений на стенках и дне лазерного дефекта, а также регенерацию абляционных точечных ран.

Примеры гистологических препаратов, полученных из образцов кожи мини-свиней после воздействия излучения лазерного хирургического аппарата «Ланцет-2», с длительностью импульса 500 мкс и 200 мкс приведены на рис. 16-21.

Излучение непрерывного CO₂ лазера с длительностью импульса 500 мкс, при последовательном воздействии 10 импульсов с импульсной энергией 25 мДж, слабо реализует эффект абляции, что подтверждает испарение только поверхностного, преимущественно рогового слоя эпидермиса (рис. 16).

В зоне воздействия хорошо наблюдаются выраженные термические повреждения, определяющиеся относительно широким, без четких границ на поверхности, толстым термическим струпом, переходящим в глубокие некротические изменения коагулированных подлежащих тканей всех слоев эпидермиса и верхнего слоя дермы (рис. 16, 17).

Формирование очагов грануляционной ткани отчетливо начинает определяться только на 7 сутки после воздействия, а фиброзная трансформация грануляционной ткани завершается к 30-м суткам (рис. 18, 20).

Отторжение некротического струпа и подлежащих ему коагулированных тканей начинает отчетливо определяться на 14 послеоперационные сутки и сохраняется почти до 30 суток (рис. 19, 20).

Восстановление структуры кожи и почти полное заживление абляцион-

ных ран имеет место только к 30-м послеоперационным суткам (рис. 20).

Импульсное модулированное излучения непрерывного CO₂ лазера с более короткой длительностью импульса 200 мкс, с энергией в импульсе 10 мДж, реализует аналогичный предыдущему режиму, с длительностью импульса 500 мкс, слабо выраженный эффект абляции, сопровождающийся сходными, но с несколько менее выраженными термическими изменениями, при этом процессы регенерации не имеют особых временных различий (рис. 21).

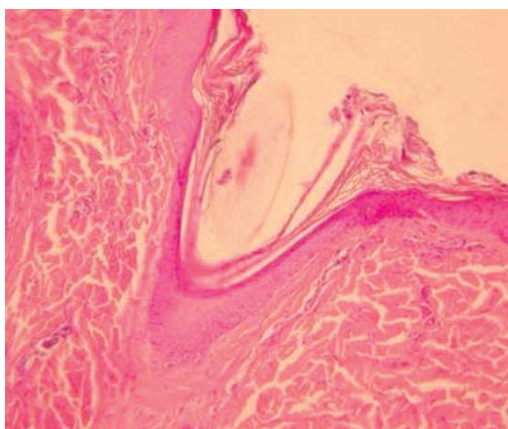


Рис. 16. Режим абляции: 25 мДж, 500 мкс, 10 импульсов, 0 сутки. Очаг повреждения отчетливой узко-клиновидной формы, относительно глубокий не менее 5 мм. Глубина повреждения всех слоев эпидермиса и распространяется на сосочковый и сетчатый слои дермы. В просвете элементы компактного коагуляционного некроза. Термический струп с коагуляционным гомогенным некрозом эпидермиса и дермы выполняет края, стенки и дно дефекта. Его толщина от 50 мкм до 150 мкм и более в области дна дефекта. Образующие ткани кратер, эпидермис и подлежащая дерма, особенно в области дна дефекта уплотнены, деструктурированы, частично гомогенизированы. На поверхности краев дефекта определяется коагуляционный некроз, переходящий на близлежащие ткани. Окраска гематоксилином - эозином. Увеличение 100.

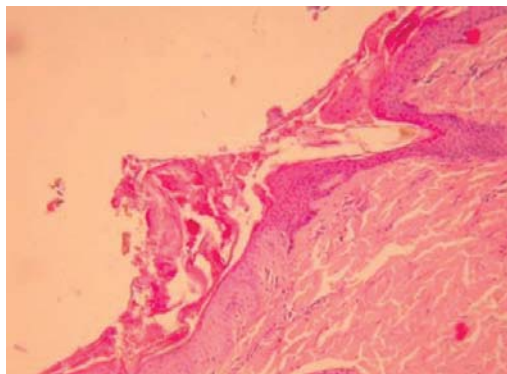


Рис. 17. Режим абляции: 25 мДж, 500 мкс, 10 импульсов, 3-и сутки. Глубокий, очагового характера в форме относительно узкого клина, дефект кожи, эпидермиса и дермы. Ширина дефекта на поверхности не менее 5 мм, глубина не менее 3 мм. Термических повреждений на поверхности, диаметром не менее 5 мм, без четких границ, представлены выраженным термическим струпом, местами свободно лежащим, частично в виде компактного коагуляционного некроза, частично из фрагментов коагулированного эпидермиса. Поверхностный слой стенок и дна дефекта выполнен компактным коагуляционным некрозом, толщиной от 20 мкм до 50 мкм. Остальные более глубокие слои дефекта, эпидермис и прилежащий сосочковый слой дермы значительно уплотнены, деструктурированы и гомогенизированы, и представляют массив коагуляционного некроза, толщиной не менее 150 мкм. В дерме отмечается субэпидермальный отек. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 100.

На основании данного гистологического исследования было определено, что воздействие длинным импульсным модулированным излучением длительностью 500 и 200 мкс непрерывного CO₂ лазерного хирургического аппарата «Ланцет-2» приводит к выраженному и глубокому термическому коагуляционному поражению подлежащих тканей, окружающих зону воздействия, что определяет длительное их отторжение и, как следствие, увеличение времени заживления послеоперационных ран.

С физической точки зрения этот результат объясняется длительностью диф-

фузии тепла из зоны воздействия лазерного импульса. При лазерном импульсе длительностью 200-500 мкс происходит довольно медленный нагрев ткани и потери тепла вне области воздействия, как следствие снижение эффективности абляции и более значительное термическое поражение близлежащих окружающих тканей. Известно, что длина диффузии тепла пропорциональна корню квадратному из длительности импульса. Поэтому для уменьшения глубины термического поражения в 3 раза длительность импульса должна быть уменьшена в 10 раз, то есть до 20 - 50 мкс. Именно

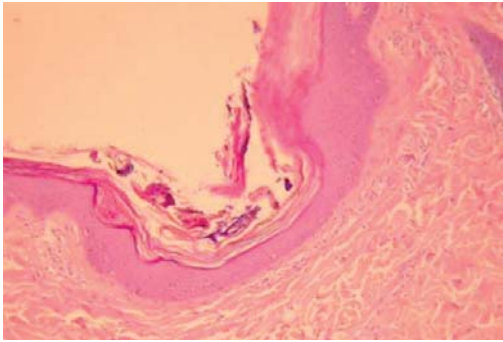


Рис. 18. Режим абляции: 25 мДж, 500 мкс, 10 импульсов, 7-е сутки. Отмечается глубокое термическое воздействие с повреждением эпидермиса и подлежащей дермы. Сформирован дефект с уплощенным широким дном и суженной апертурой. На дне дефекта истончение эпидермиса. В просвете множественные свободно лежащие фрагменты некротического струпа с мелкими элементами обугливания. Ткани стенок и дна дефекта выполнены коагуляционным термическим некрозом, эпидермиса и близлежащей дермы, уплотнены, деструктурированы и гомогенизированы, особенно справа. На поверхности краев дефекта коагулированные ткани эпидермиса, без определенных границ по периферии. Общая толщина коагуляционного термического некроза местами в пределах дермы не менее 500 мкм. В неизмененных, ниже слоя некроза, тканях дермы отек и новообразование капилляров в формирующейся грануляционной ткани. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 100.

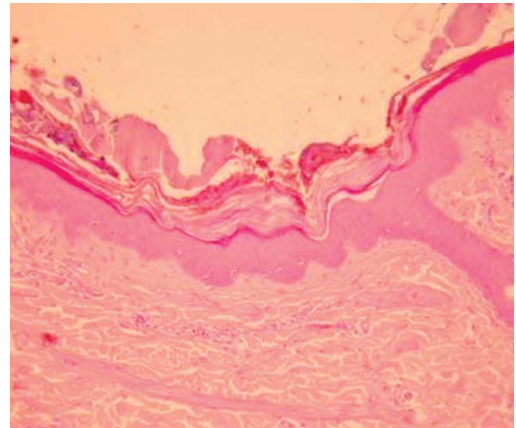


Рис. 19. Режим абляции: 25 мДж, 500 мкс, 10 импульсов, 21-е сутки. В области воздействия имеется широкого дугообразного профиля дефект, относительно небольшой глубины, с мелкими очаговыми углублениями эпидермиса в эпицентре воздействия. Толщина и структура эпидермиса в области дефекта почти не изменены. В просвете дефекта и по его краям над поверхностью эпидермиса множественные плотные фрагменты термического струпа и слоистые роговые массы, толщиной до 300 мкм. Границы зоны воздействия на поверхности краев дефекта не определяются. В струпе присутствуют элементы карбонизации. Сосочковый слой дермы несколько уплотнен. В дерме очаги грануляционной ткани. Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение 80.

такой длительностью импульса обладает используемый в данной работе импульсно-периодический CO₂ лазер, опытного образца лазерного медицинского Аппарата, что подтверждает полученные результаты выполненного исследования [3, 4, 5, 8].

Таким образом, на основании сравнительного анализа результатов исследования гистопрепаратов из образцов кожи, после воздействия режимов абляции излучения сравниваемых CO₂ лазеров, было определено, что эффект абляции значительно более выражен при использовании короткого импульса 20 мкс импульсно-периодического CO₂ лазера и регенерация таких абляционных ран, происходит значительно активнее и в более короткие сроки по сравнению

с импульсами 500 мкс и 200 мкс непрерывного CO₂ лазера.

Это обусловлено значительно меньшей глубиной термического повреждения не испаренных тканей, сокращением эксудативной фазы при асептическом воспалении, более ранним отторжением некротического струпа и развитием грануляционной ткани с новообразованными

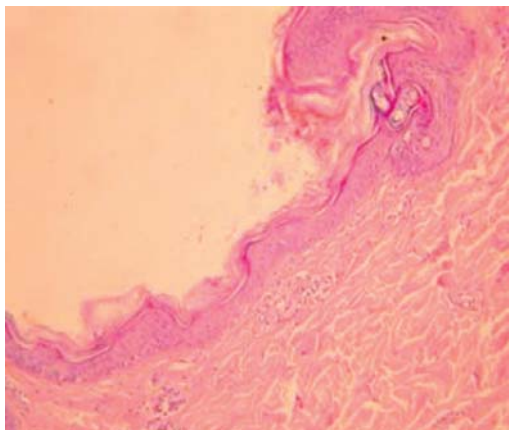


Рис. 20. Режим абляции: 10 мДж, 500 мкс, 10 импульсов, 30-е сутки. Зона воздействия представляет относительно плоский дефект с небольшим узким, неопределенной формы, втяжением эпидермиса. Структура и толщина эпидермиса восстановлены полностью, кроме зоны втяжения, где на дне и в просвете определяются небольшие фрагменты оксифильного коагуляционного некроза. Над поверхностью эпидермиса мелкие фрагменты остатков термического струпа и слоистые роговые массы. Структура дермы не изменена, в ней островки грануляционной ткани. Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение 100.

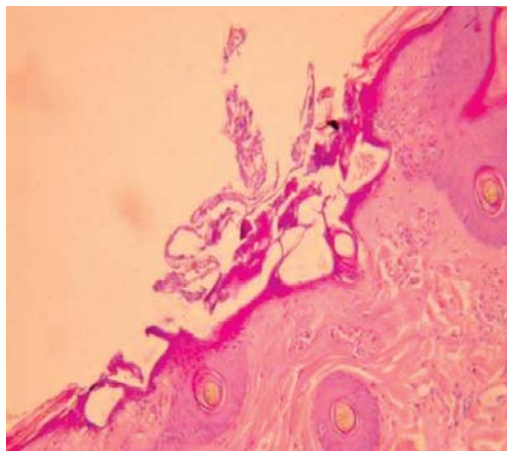


Рис. 21. Режим абляции: 10 мДж, 200 мкс, 10 импульсов, 0 сутки. Формирование обширного по площади и глубине, до 3 мм, очага повреждения, с неровной поверхностью из небольших клиновидных дефектов. Общий профиль повреждения ближе к клиновидной форме. Отмечается коагуляционный термический некроз на всю толщу эпидермиса и подлежащего сосочкового слоя верхней трети дермы. В просвете дефекта большое количество фрагментов плотных коагулированных тканей эпидермиса и дермы, единичные не выраженные элементы карбонизации. Стенки, дно и края дефекта выполнены компактным относительно широким слоем оксифильного коагуляционного некроза толщиной от 30 мкм до 100 мкм. На поверхности краев дефекта также определяется зона коагуляционного некроза, без разграничения с близлежащими поверхностными тканями эпидермиса. Подлежащие дну дефекта ткани дермы, не менее чем на глубину до 100 мкм - 150 мкм уплотнены, деструктурированы и гомогенизированы. Более глубокие слои дермы и ее придатки не изменены. Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение 120.

ми капиллярами, а также возможностью сохранения ростковых структур эпидермиса, обеспечивающих ускорение реэпителизации раневых дефектов.

Выводы

1. Исследуемые режимы абляции импульсно-периодического CO₂ лазера с длительностью импульса 20 мкс и мощностью более 2 кВт эффективно и прецизионно реализуют абляцию кожи, при этом максимально сохраняя жизнеспособность окружающих зону воздействия не удаленных тканей и формируя относительно широкий лазерный кратер – дефект по форме близкий цилиндру, с плавным дугообразным профилем уплощенного дна.

2. Исследуемые режимы абляции импульсно-периодического CO₂ лазера обеспечивают активную динамику регенерации и ускорение реэпителизации абляционных ран, что определено уменьшением экссудативной фазы, ранним отторжением некротического струпа и более ранним развитием грануляционной ткани, а также значительно меньшей глубиной теплового повреждения окружающих тканей и сохранением ростковых структур эпидермиса по сравнению с излучением CO₂ лазера с длительностью импульса 200 и 500 мкс и мощностью 50 Вт.

3. Для целей лазерной дермабразии кожных покровов оптимальными режимами абляции излучением импульсно-периодического CO₂ лазера является энергия в импульсе 20 мДж и 30 мДж, при частоте следования импульсов 10 Гц и количестве импульсов не более 10 в одну точку. Такой режим позволяет эффективно и прецизионно реализовывать абляцию кожи с максимальным сохранением не удаляемых ее тканей.

4. Увеличение частоты следования импульсов импульсно – периодического

лазера более 10 Гц при количестве импульсов более 10 в одну точку формирует абляционный кратер, значительно большей глубины с более выраженными термическими изменениями в виде отграниченной широкой зоны компактного коагуляционного некроза, которая сохраняет рыхлую связь с подлежащими относительно неизменными тканевыми структурами. Такие режимы абляции могут быть использованы для более глубокой абляции кожных покровов, при наличии соответствующих клинических показаний, требующих большей глубины испарения тканей.

Заключение

Выполненные гистологические исследования позволили на тканевом уровне показать несомненное преимущество режимов абляции короткими импульсами (20 мкс импульсная мощность более 2 кВт) излучения импульсно-периодического CO₂ лазера, по сравнению с длинными импульсами (500 мкс и 200 мкс, импульсная мощность 50 Вт) модулированного излучения непрерывного CO₂ лазера, для целей лазерной дермабразии кожных покровов и подтвердить перспективу применения его в практике кожно-пластической реконструктивно-восстановительной хирургии для эффективного, прецизионного удаления патологических кожных структур, что должно обеспечить достижение оптимально возможного лечебного и эстетического результата.

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

Список литературы

1. Алимпиев С.С., Конов В.И., Никифоров С.М. Масс-спектрометрическое исследование приповерхностного оптического пробоя Крат, сообщения по физике. ФИАН. 1987. С. 17-19.
2. Гончарова А., Толстопятов А.М., Фисталь Н.Н. Косметическая коррекция посттравматических и послеоперационных рубцов методом лазерной дермабразии // Центр лазерной косметологии и пластической хирургии «Lege Artis», Институт неотложной и восстановительной хирургии АМН Украины. Донецк. Украина Травма. 2001. Т.2. № 2. С. 216-218.
3. Горбатова Н.Е., Золотов С.А., Симановский Я.О. и др. Абляция биоткани излучением CO₂-лазеров с импульсами различной длительности // Научно-прикладной журнал «Биомедицинская радиоэлектроника». 2012. № 8. С. 37-45.
4. Горбатова Н.Е., Золотов С.А., Симановский Я.О. и др. Биомедицинское моделирование абляции биологических тканей излучением импульсно-периодического CO₂ лазера с поперечным разрядом для целей кожно-пластической реконструктивно-восстановительной хирургии // Научно-практический журнал «Московский хирургический журнал». – 2012. № 5 (27).- С. 17-24.
5. Горбатова Н.Е., Золотов С.А., Симановский Я.О. и др. Моделирование абляции биологических тканей излучением импульсно-периодического CO₂ - лазера для целей лазерной дермабразии рубцовых деформаций кожных покровов // Научный журнал ФМБА РФ «БИОМЕДИЦИНА». 2013. №1. С. 22-35.
6. Доронин В.А. «Дермабразия CO₂ лазером эпидермально-дермальных дефектов кожи в амбулаторных условиях» // Дис. канд. мед. наук. М. 2004. 116 с.
7. Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини свиней // Биомедицина. 2007. № 6. С. 71-81.
8. Никифоров С.М., Алимпиев С.С., Симановский Я.О. и др. Импульсно - периодический CO₂-лазер с поперечным разрядом для хирургических применений // Научно-прикладной журнал «Биомедицинская радиоэлектроника». 2012. № 8. С. 72-76.
9. Патент РФ 2118025 Импульсно-периодический газовый лазер, Никифоров С.М., Алимпиев С.С., Симановский Я.О., Горбатова Н.Е., 1998.
10. Патент РФ 2286628 Импульсно-периодический газовый лазер и лазерная хирургическая установка, Никифоров С.М., Алимпиев С.С., Симановский Я.О., Горбатова Н.Е., 2005.
11. Самохин А.А. Фазовые переходы первого рода при действии лазерного излучения на поглощающие конденсированные среды // Действие лазерного излучения на поглощающие конденсированные среды (Труды ИОФАН, т.13). М.: Наука. 1990. С. 1-98.
12. Скобелкин О.К., Козлов В.И., Гейниц А.В. и др. «Применение лазерных хирургических аппаратов «ЛАНЦЕТ» в медицинской практике» // Пособие для врачей. М. 2000. 94 с.
13. Смирнов Д.В. «Лазерная дермабразия в комплексном лечении послеожоговых рубцов эстетически важных зон кожного покрова у детей» // Дис. канд. мед. наук. М. 2003. 128 с.

14. **Швецова Е.В., Роговая О.С., Киселев И.В.и др.** Модели для исследования кожи. Свиная кожа как адекватная модель исследования восстановительных процессов в коже человека // Клиническая дерматология и венерология. 2006. № 4. С. 47-50.
15. **Alster Tina S., MD Ivy J Groover MD** «Laser Revision of Scars» Last Updated: June 25. 2001. © Copyright 2002, eMedicine.com, Inc.
16. **Vogel A., Venugopalan V.** *Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues* // Chem. Rev. 2003. V. 103 (2). P. 577-644.
17. **Nanni C.A., Alster T.S.** of carbon dioxide laser resurfacing. An evaluation of 500 patients // Dermatol Surg. 1998; V. 24. P. 315-320.
18. **Ross E.V., Barnaette D.J., Glatter Rd., et al.** *Effects of overlap and pass number in CO₂ laser skin resurfacing: A study of residual thermal damage, cell death and wound healing* // Lasers Surg Med. 1999. V. 24. P. 103-112.
19. **Shim .E, Tse Y., Velazquez E., et al.** Short-pulse carbon dioxide laser resurfacing in the treatment of rhytides and scars. A clinical and histopathological study // Dermatol Surg. 1998.V. 24. P. 113-119.
20. **Walsh J.T., Flotte T.J., Anderson R.R., Deutsch T.F.** Pulsed CO₂ laser tissue ablation: effect of tissue type and pulse duration on thermal damage // Lasers Surg. Med. 1988. V. 8. P. 108-118.

Experimental assessment of efficiency of modes of an ablyation impulses of CO₂ lasers of various duration of integuments of mini-pigs for a laser dermabraziya

**N.E.Gorbatova, S.A. Zolotov, Ya.O. Simanovsky , S.M. Nikiforov,
S.V. Golubev, S.S. Alimpiyev, A.V. Geynits, V.I.Eliseenko, N.V. Stankova**

Ablyation of biofabric the radiation of CO₂ laser now the most effective and perspective physical mechanism for elimination of pathological changes, including cicatricial deformation, integuments.

In experimental work of in vivo on integuments of mini-pigs of Svetlogorsk population on the basis of the analysis of comparative histologic research it was defined that efficiency and a pretzionnost of an ablyation is much higher for pulse and periodic CO₂ laser lasting impulse of 20 microsec and capacity in an impulse more than 2 kW, the maximum preservation of viability of fabrics on the periphery and progressive dynamics of regeneration of ablative wounds, and radiation of continuous CO₂ laser with a power of 50 W and lasting impulse of 500 microsec is thus provided and even 200 microsec cause bigger thermal damage of the fabrics surrounding a zone of influence is considerable.

Thus, this experimental work at fabric level confirmed uniqueness and efficiency of a laser ablyation of integuments with the radiation of pulse and periodic CO₂ of the laser lasting impulse of 20 microsec and prospect of application of a laser dermabraziya realized by it in clinical practice for elimination of pathological changes of integuments, including cicatricial deformation.

Key words: pulse and periodic CO₂ laser, laser ablyation, integuments, histologic researches.

Изучение дифференцировки эмбриональных стволовых клеток при длительном кокультивировании с адипоцитами

М.В. Ковина¹, Л. Зильберман², Ю.М. Ходарович³

¹ – *Институт Биохимии им. Баха РАН, Москва*

² – *The University of Texas Health Science Center at Houston, Medical School, Department of Integrative Biology & Pharmacology*

³ – *Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Контактная информация: Институт Биохимии им. Баха, РАН, Ленинский проспект 33, 119071, Москва, Россия, тел. (7-499)-613-3223, факс (7-495)-954-2732, e-mail gershi2001@yahoo.com

В зрелом монослое адипоцитов, крупных сферических светоотражающих клеток, проделали скребком бесклеточные дорожки 1-5 мм ширины. Плоские веретенообразные свето-поглощающие клетки, мигрирующие с границ дорожек, покрыли их монослоем через 8-10 дней. Новый монослой морфологически стабилен в течение нескольких недель после образования и резко отличен от старого – его клетки плоские и темные, без свето-отражающих включений (жировых капель). Если к адипоцитарному монослою с прорытыми бесклеточными дорожками добавить мышинные эмбриональные стволовые клетки (мЭСК), то формирующийся к 6-7 дню новый монослой содержит блестящие точки, и к 15-20 дню превращается в сплошной блестящий ковер молодых адипоцитов, наполненных по периферии каждой клетки циркулярно расположенными мелкими светоотражающими липидными капельками. Обсуждается вопрос об истинной или индуктивной дифференцировке, как причине данного явления.

Ключевые слова: дифференцировка, контактная дифференцировка, кокультивирование, эмбриональные стволовые клетки, адипоциты.

Введение

Одним из способов индукции дифференцировки стволовых клеток является их кокультивирование с дифференцированными клетками. Дифференцированные клетки секретуют регуляторные молекулы и формируют со стволовыми клетками межклеточные контакты, что и является стимулом к дифференцировке стволовых клеток. Наиболее часто

кокультивирование используется для терминальных этапов дифференцировки стволовых клеток, причём, как правило, совместно с добавлением в культуральную среду экзогенных ростовых факторов. Влияние кокультивирования на ранних этапах дифференцировки эмбриональных стволовых клеток изучено мало. Ранее нами было показано, что при кокультивировании мЭСК

с эндотелиоцитами можно добиться эффективной дифференцировки при условии длительной копролиферации и многократного пересева культуры [1]. В настоящей работе мы изучали дифференцировку в случае, если возможность многократного пересева отсутствует. В качестве матричной культуры мы взяли адипоциты, полученные дифференцировкой из культуры преадипоцитов 3Т3-L1. В настоящее время для дифференцировки ЭСК в адипоциты используется многостадийная методика, имитирующая адипоцитарную дифференцировку ходе эмбриогенеза [2, 7]. По этой методике, вначале из ЭСК формируются эмбрионидные тельца, которые затем культивируются в присутствии ретиноевой кислоты, а на последнем этапе - в присутствии инсулина и трийодтиронина. При этом образуется смешанная популяция клеток, с долей адипоцитов около 15%. Для получения более чистой культуры необходимы дополнительные этапы, включающие сортировку клеток с активированной флуоресценцией [5]. Недавно было показано, что возможна эффективная прямая дифференцировка ЭСК в адипоциты без промежуточных этапов с помощью введения в ЭСК малой интерферирующей РНК, подавляющей экспрессию гена *Ost4* [3]. Целью нашей работы было выяснить, возможна ли прямая дифференцировка мЭСК в адипоциты под влиянием кокультуры зрелых адипоцитов, а также насколько гомогенна полученная культура потомков мЭСК.

Методы

Получение и культивирование адипозных клеток. Адипозные клетки получали из 3Т3-L1 преадипоцитов

как описано ранее [4] с небольшими изменениями. 3Т3-L1 клетки были любезно предоставлены доктором Knutson (University of Texas Health Science Center at Houston) и культивировались в 100 мм чашках Петри в среде ДМЕМ (Cellgro) содержащей 10% фетальной сыворотки телят (Sigma). Для проведения дифференцировки преадипоциты растили до достижения 100% конfluence. Через два дня после достижения 100% конfluence клетки помещали в свежую среду объёмом 3.5 мл, содержащую 10% фетальной сыворотки телят, 0.5 мМ изобутилметилксантин (Sigma), 1 пгр. дексаметазон на 1 мл (Sigma) и 10 пгр. инсулина на 1 мл (Elanco). Каждые два дня среда менялась на свежую такого же состава. На седьмой день более 90% клеток экспрессировало адипозный фенотип. Клеточный монослой адипоцитов использовался в экспериментах в возрасте 7-10 дней культивирования после начала дифференцировки. За 48 часов перед началом эксперимента клетки переносили в среду, не содержащую инсулина (ДМЕМ и 10% фетальной сыворотки), среда менялась трижды перед началом экспериментов по кокультивированию.

Кокультивирование мЭСК и адипоцитов. Несколько дорожек, лишённых клеток, шириной 1-5-мм и длиной 50-100-мм, были сделаны на каждой чашке с адипоцитами методом механического соскрёба стерильным шпателем. Каждый эксперимент повторялся 3 раза. Плашки засеивались 5×10^3 - 1×10^4 мЭСК, в то время как контроль оставался незасеянным. Среду меняли каждый второй день. Культуру после начала эксперимента не пересевали.

Результаты и их обсуждение

Для изучения дифференцировки мЭСК в присутствии зрелых адипоцитов мы использовали чашки с монослоем зрелых адипоцитов, полученные, как описано в материалах и методах. В монослое адипоцитов с помощью шпателя делали дорожки, лишённые клеток. Уже через день после соскребания в образовавшемся просвете можно наблюдать морфологически отличные от адипоцитов плоские веретенообразные свето-поглощающие клетки, мигрирующие с границ дорожек. Это адипоциты, подвергшиеся частичной дедифференцировке при потере части клеточных контактов и приобретшие свойства преадипоцитов. В дальнейшем дорожки постепенно заполняются этими клетками, оставаясь морфологически стабильными, т.е. сохраняя отмеченный выше диморфизм: круглые крупные жиросодержащие зрелые адипоциты и темные плоские веретенообразные преадипоциты. К части чашек с дорожками мы добавляли ЭСК мыши. В этом случае преадипоциты и мЭСК копролиферировали вместе на свободных поверхностях. По нашим данным, копролиферация ЭСК с детерминированными клетками (в данном случае, с преадипоцитами) способствует дифференцировке ЭСК по этому же пути [1]. На рис. 1 показаны контрольные и засеянные дорожки через одну-пять недель после соскребания; панели слева показывают незасеянные ЭСК области, справа - засеянные. Клетки в засеянных каналах растут более быстро; очень хорошо видна их диморфность: наряду с описанными выше темными веретенообразными клетками появляются новые клеточные кластеры, образованные маленькими, ярко блестящими клетками, заполнен-

ными липидными каплями (рис. 1 Е, вставка). Эти клетки морфологически неотличимы от терминально дифференцированных адипоцитов. Мы полагаем, что кластеры блестящих круглых клеток получены из мЭСК, в то время как темные веретенообразные клетки происходят из клеток матрицы (адипозного слоя). Неспособность преадипоцитов в присутствии кокультуры зрелых адипоцитов к терминальной дифференцировке подтверждается и в недавней работе доктора Song с коллегами [6]. Почему делящиеся потомки клеток матрицы не переходят к конечной стадии дифференцировки – экспрессии жировых капель, а потомки мЭСК – их быстро экспрессируют? Вероятно, потомки мЭСК, детерминируясь по адипоцитарному пути, развивают мощные внутренние сигналы к дифференцировке в данном направлении и уже не могут остановить начавшуюся дифференцировку на промежуточных стадиях (преадипоциты), быстро достигая конечной стадии, в то время как пролиферирующие клетки матрицы, не имеют таких сигналов. В следующие недели липидные капли в ярко блестящих круглых клетках увеличились в количестве, формируя кольца на поверхности каждой клетки, и выросли в размерах. На рисунке 2 показаны молодые, только что сформировавшиеся (слева) и старые, предсуществующие (справа) адипоциты при увеличении 450х.

Множественное формирование клеток со светящимися кольцами из капель на плашке, засеянной мЭС клетками, наблюдалось на всей области соскребания, (рисунок 1 Е-К), в то время как дорожки в контрольных чашках зарастали сплошь темными клетками; иногда мы находили

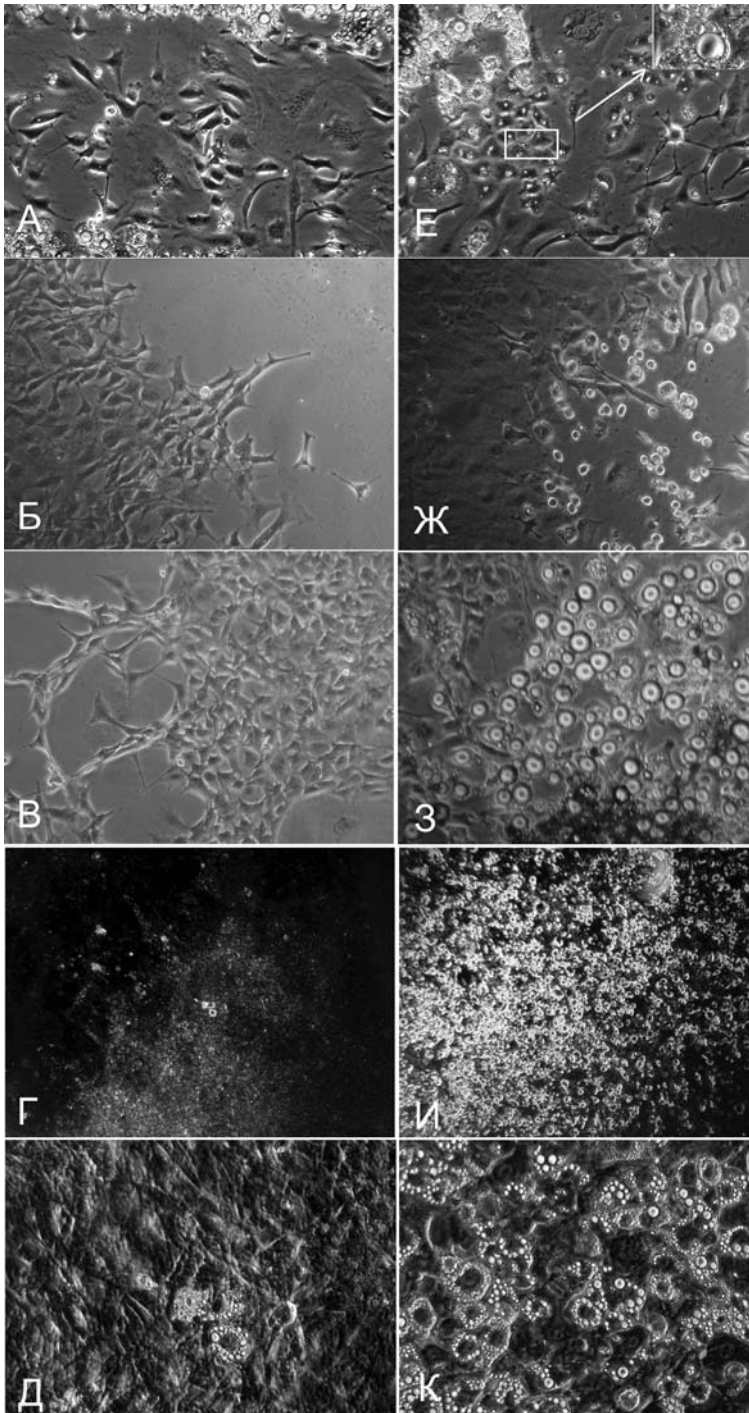


Рис. 1. Не засеянные (А-Д) и засеянные мЭСК (Е-К) адипоциты через 1 (А, Е), 2 (Б,Ж), 3 (В,З) и 5 (Г, Д и К) недель после соскрёба дорожки при увеличении 100х (А-В, Е-З), 40х (Г, И), и 200х (Д, К).

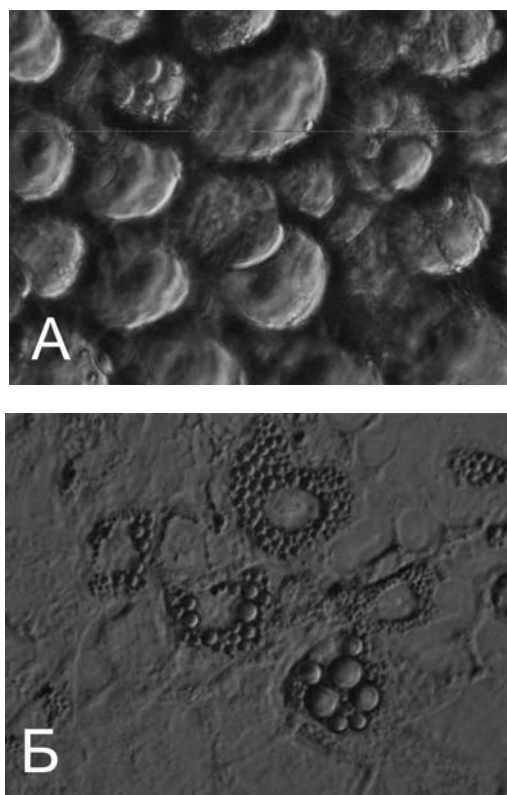


Рис. 2. Фотография с высоким разрешением старых (А) и молодых (Б) адипоцитов; увеличение 450х.

только одну-две молодые адipoцитарные клетки на всей контрольной чашке (рисунок 1 Г,Д). Стволовые клетки не росли ни в свежей среде для роста адипоцитов, ни в прекоиндиционной среде. Таким образом, направленная дифференцировка мЭСК в адипоциты под влиянием матричной культуры является наиболее вероятным объяснением наблюдаемых результатов. При дальнейшем культивировании клеток, параллельно с процессом образования адипоцитарного монослоя в бесклеточных дорожках, засеянных ЭСК, к концу второй недели после начала эксперимента мы заме-

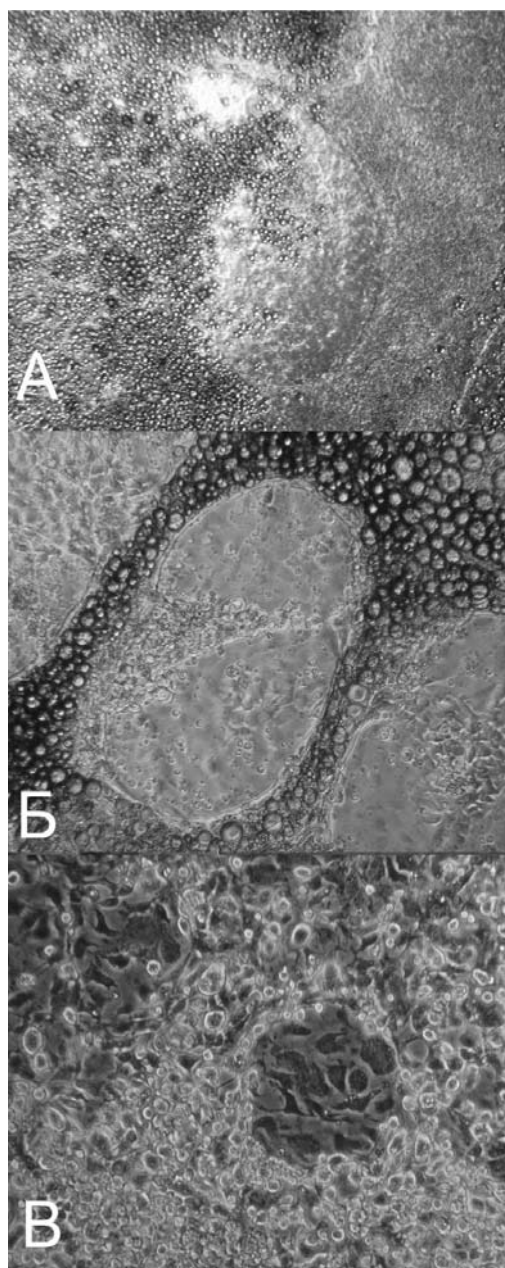


Рис. 3. А, Б - Эмбриональные тельца, сформировавшиеся в исходном монослое зрелых адипоцитов за 3 недели кокультивирования с 10^4 мЭСК. В - начальная стадия образования эмбрионального тельца в молодом слое адипоцитов, выросшем на месте соскреба, 4 недели с момента засева мЭСК. Увеличение 40х (А) и 100х (Б и В).

чали в толще старого слоя адипоцитов многочисленные кругообразные расхождения адипоцитарного слоя. В центре образующихся четко очерченных кругов и овалов через 3-4 недели после засева начинается биение (рисунок 3 АБ). С некоторым запозданием, начиная с 4-5 недели, подобный же процесс начинается и в новом слое образовавшихся молодых адипоцитов (рисунок 3Д), нарушая, таким образом, диморфное однообразие молодого монослоя внедрением растущих эмбриональных телец. Таким образом, через 4-7 недель после высева на адипоцитарную культуру, ЭСК формировали многочисленные бьющиеся эмбриональные тельца без добавления нами в среду индукторов кардиомиоцитарной дифференцировки. В отсутствие кокультуры адипоцитов образование эмбриональных телец идёт существенно менее эффективно. Увеличение эффективности образования эмбриональных телец при длительном кокультивировании без пересева мы ранее наблюдали и при кокультивировании мЭСК и эндотелиоцитов [1]. Таким образом, в отсутствии пересева кокультуры, наряду с образованием дифференцированных потомков мЭСК появляются разросшиеся колонии мЭСК, которые, под влиянием кокультуры, эффективно образуют бьющиеся эмбриональные тельца.

Выводы

Беспересевное кокультивирование мЭСК и адипоцитов приводит к направленной дифференцировке мЭСК в адипозном направлении, причем первые 2-3 недели молодая кокультура, растущая на свободной поверхности, сохраняет строгий биморфизм – в ней присутствуют только плоские темные веретено-

образные клетки (предположительно, преадипоциты) и молодые адипоциты, экспрессирующие светоотражающие жировые включения. В последующие недели, при отсутствии пересева, в кокультуре начинают появляться гетерогенные колонии, содержащие, в частности, бьющиеся островки клеток. Таким образом, направленная дифференцировка мЭСК в направлении кокультуры наблюдается только в условиях копролиферации используемых культур клеток.

**«Работа была поддержана
Министерством образования и науки,
Государственный контракт
№ 16.512.11.2086.»**

Список литературы

1. *Ковина М.В., Ходарович Ю.М.* Эффективная дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в эндотелиоциты методом длительного со-культивирования с первичной тканевой культурой // В сб.: Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей. М., МАКС Пресс. 2011. С.189-200.
2. *Dani C., Smith A., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C., Ailhaud G.* Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro // *J Cell Sci*, 1997.v. 110 p. 1279-1285.
3. *Hannan N.R., Wolvetang E.J.* Adipocyte differentiation in human embryonic stem cells transduced with Oct4 shRNA lentivirus // *Stem Cells Dev*. 2009. v. 18. P. 653-660.
4. *Ronnett G.V., Knutson V.P., Lane M.D.* Insulin-induced down-regulation of insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered rate of receptor inactivation // *J Biol Chem*. 1982.v. 257. P. 4285-4291.

5. *Schaedlich K, Knelangen J.M., Navarrete Santos A., Fischer B., Navarrete Santos A.* A simple method to sort ESC-derived adipocytes // *Cytometry A*. 2010.v. 77. P. 990-995.
6. *Song K., Li W., Wang H., Wang H., Liu T., Ning R., Wang L.* Investigation of coculture of human adipose-derived stem cells and mature adipocytes // *Appl Biochem Biotechnol*, 2012. v.167. p. 2381-2387.
7. *Taha M.F., Valojerdi M.R., Mowla S.J.* Effect of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on adipocyte differentiation from mouse embryonic stem cells // *Anat Histol Embryol*. 2006.v. 35. P. 271-278.

Studying of embryonic stem cells differentiation at a long cocultivation with adipocits

M.V. Kovina, L. Zilberman, Yu.M. Hodarovich

In a mature monolayer adipocits, large spherical reflecting cages, did a scraper acellular paths of 1-5 mm of width. The flat spindle-shaped light-absorbing cages migrating from borders of paths, covered them with a monolayer in 8-10 days. The new monolayer is morphologically stable within several weeks after education and is sharply other than the old – its cage flat and dark, without reflecting inclusions (fatty drops). If to an adipositarney monolayer with the dug acellular paths to add mouse embryonic stem cells (MESK), the new monolayer which was formed to 6-7 day contains brilliant points, and by 15-20 day turns into a continuous brilliant carpet young адипоцитов, filled on the periphery of each cage tsirkulyarno the located small reflecting lipidic droplets. The question of a true or inductive differentiation, as to the reason of this phenomenon is discussed.

Key words: differentiation, contact differentiation, kokultivirovaniye, embryonic stem cells, adipocits.

Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза

А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина

ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии минздрава развития России», Уфа

Гистологическими, гисто- и иммуногистохимическими, электронно-микроскопическими методами исследования показано, что подкожное введение экспериментальным животным диспергированного ксеногенного биоматериала, обработанного по оригинальной технологии Аллоплант®, может служить в качестве экспериментальной модели для индукции процессов хронического воспаления и фиброза (рубцевания) в тканях. Установлено, что ксеногенный биоматериал дезактивирует функциональную способность макрофагов, в результате чего в тканях развивается хроническое воспаление по типу гиперчувствительности замедленного типа. При заживлении очага повреждения происходят процессы несбалансированного фиброза с формированием грубоволокнистого рубца.

Ключевые слова: экспериментальная модель, хроническое воспаление, фиброз, ксеногенный биоматериал, макрофаги.

В биологии и медицине проблема коррекции очагов хронического воспаления в органах и тканях широко обсуждается и остается актуальной. Известно, что хроническое воспаление заметно ухудшает течение раневого процесса, часто приводит к неадекватному заживлению, рубцовой трансформации тканей и является основой патогенеза многих заболеваний, в том числе и рака. Поэтому при разработке новых методов лечения воспаления, а также при коррекции рубцовых изменений тканей поиск удобных и простых экспериментальных моделей для воспроизведения процессов хронического воспаления продолжается. Многолетние исследования процессов замещения различных биоматериалов обработанных по оригинальной технологии Аллоплант® показали, что исход заживления очага воспаления по-

сле имплантации во многом зависит от степени иммунного воспаления вокруг трансплантата [18, 5]. Установлено, что применение ксеногенного биоматериала, приводит к затяжному течению воспалительного процесса и неадекватному заживлению [2, 4]. Поэтому, мы предлагаем использовать его для экспериментального моделирования процесса хронического воспаления. Целью нашего исследования явилось изучение морфологических изменений в тканях крыс после имплантации диспергированного ксеногенного биоматериала.

Материал и методы.

Эксперимент проведен на 54 крысах породы Wistar обоего пола массой от 0,18 до 0,2 кг, которым подкожно вводили диспергированный биоматериал (125 мг), изготовленный из соединитель-

нотканых образований человека по оригинальной технологии Аллоплант®. Ксеногенный биоматериал растворяли в 2 мл 0,9%-ного физиологического раствора. В контрольной группе животных вводили 0,9%-ный физиологический раствор в количестве 2 мл.

Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» за № 1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.77), «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. и Федерального закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Животные содержались в одинаковых условиях со стандартным рационом питания. Их выводили из эксперимента ингаляционной передозировкой паров эфира. На исследование забирали кусочки тканей из места введения биоматериалов. Забор образцов проводили в сроки 2, 4, 7, 14, 30 суток, 2 и 6 месяцев. Кусочки тканей фиксировались в 10%-ном нейтральном забуференном формалине и после обезвоживания в серии спиртов возрастающей концентрации заливались в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия). Микроскопические исследования проводились с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 PASCAL фирмы «CARL ZEISS» (Германия).

Гистологические методы включали окраску гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, гистохимические - реакцию Хейла на выявление гиалуроники и серебрение по Футу. Иммуногистохимические исследования проводили с помощью непрямого стрептовидин – биотинового метода на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм с минимальной площадью 1 см². Использовались моноклональные антитела к TGF- β 1 (трансформирующий фактор роста- β 1), TNF- α (фактора некроза опухоли- α), виментину (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1999-2002). Уровень экспрессии цитокинов определяли с помощью программы анализа изображений AxioVision (Carl Zeiss, Германия). Достоверность оценивали по критерию Стьюдента ($p < 0,05$). Построение диаграмм производилось с помощью программы Microsoft Excel.

Для электронно-микроскопического исследования биоптаты фиксировали в 2,5%-ном глютаральдегиде, приготовленном на какодилатном буфере (pH 7,2-7,4) с последующей дофиксацией в 1%-ном растворе OsO₄ на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике [8]. Предварительно изготавливали полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим на 2,5%-ном растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-III 8800 (Швеция). Ультратонкие срезы контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу [8] и изучали в транс-

миссионном микроскопе JEM-100 CX II фирмы “JEOL” (Япония) при увеличениях 5200 – 29000 раз.

Результаты исследования.

В ранние сроки (2-4 сутки) в зоне имплантации биоматериала выявлялись признаки острой воспалительной реакции. Отмечалась высокая клеточная плотность за счет макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток и сегментоядерных нейтрофилов. Среди иммунокомпетентных клеток определялись малые и средние лимфоциты. Сами частицы ксеногенного биоматериала были интенсивно инфильтрированы эозинофилами и нейтрофилами. Концентрируясь на границе с частицами ксеногенного биоматериала, клетки образовывали относительно широкий клеточный вал, ограничивая чужеродный для организма материал (рис.1). Электронно-микроскопически выявлялись нейтрофильно-макрофагальные, макрофагально-макрофагальные и лимфоцитарно-макрофагальные контакты. Ультраструктура макрофагов указывала на то, что клетки были функционально истощенными. Их цитоплазма была перегружена фагосомами и остаточными тельцами, цитомембрана сглажена. Ядра клеток были с признаками снижения биосинтетических свойств, обнаруживалось разрушение или недоразвитие органелл, задействованных в энергетическом обмене (митохондриях) и секреторной деятельности (лизосомах, комплексе Гольджи) (рис.2). Сами частицы биоматериала подвергались набуханию и при окраске по Ван-Гизону приобретали сероватый оттенок, свидетельствующий о начале некротических процессов. При окраске по Хейлу синее окрашивание в части-

цах ксеногенного биоматериала не выявлялось. Обращала на себя внимание выраженная сосудистая реакция окружающих тканей, выражающаяся в дилатации сосудов и стазе эритроцитов. В окружающей ткани встречались небольшие участки кровоизлияний.

Спустя 7 суток наряду с отдельными некротизированными частицами биоматериала и вышеуказанными клетками вокруг обнаруживалось большое количество мезенхимных и малодифференцированных клеток. Это были звездча-

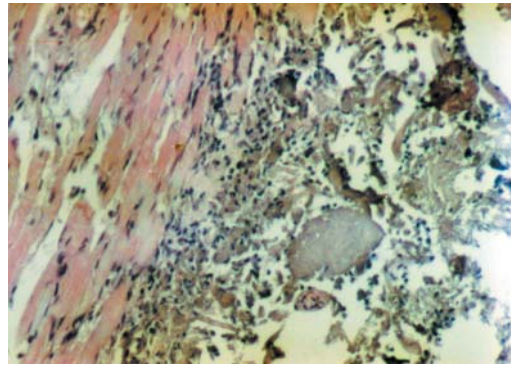


Рисунок 1. Инфильтрация имплантированного материала (↑) макрофагами, нейтрофилами, лимфоцитами через 2 суток после введения ксеногенного биоматериала. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x 50.

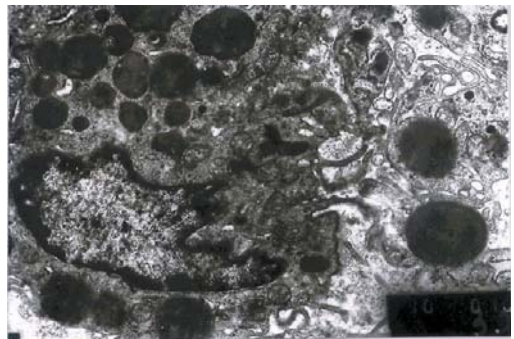


Рисунок 2. Макрофаг с признаками функционального истощения через 7 суток после введения ксеногенного биоматериала. Фагосомы и остаточные тельца (↑). Электронная микрофотография. Ув. x 10000.

тые по форме веретеновидные клетки, иногда соединяющиеся между собой или с другими окружающими их клетками посредством нексусов. Иммуногистохимически они экспрессировали в цитоплазме виментин – маркер клеток мезенхимального происхождения. Клетки активно дифференцировались в фибробласты и миофибробласты. Между клетками выявлялись тонкие новообразованные коллагеновые волокна.

Через 14 суток наряду с замещением очага воспаления и отдельных некротических участков грануляционной тканью, одновременно происходило ее преобразование в фиброзную ткань. Единичные лизированные частицы имплантата постепенно замещались тонкими аргентофильными ретикулиновыми волокнами (незрелый коллаген III типа) (окраска по Футу). В ткани обнаруживалась разнонаправленная сеть расширенных капилляров, в просвете которых наблюдались форменные элементы крови. Между тонкими коллагеновыми фуксинофильными волокнами выявлялось большое количество фибробластов, миофибробластов, макрофагов и лимфоцитов. Электронно-микроскопически определялись многочисленные лимфоцитарно-фибробластические контакты. Крупные фибробласты характеризовались неправильной извилистой формой, наличием широкого ободка цитоплазмы с большим количеством резко расширенных каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР) - признаков усиленного синтеза коллагена (коллагенобласты II типа). Миофибробласты также имели крупные размеры, длинные извилистые отростки, выраженную извилистость, иногда даже ворсинчатость клеточной поверхности. В цитоплазме

обнаруживалось большое количество рибосом и полисом, контрактильные структуры по периферии цитоплазмы, сильно расширенные развитые каналы ГЭР, глубокие инвагинации кариолеммы, крупные ядрышки (от 1 до 3-х) в кариоплазме, свидетельствующие об усиленной функциональной активности как ядерных, так и цитоплазматических компонентов. Вдоль неровной поверхности фибробластических клеток выявлялось множество беспорядочно ориентированных новообразованных тонких фибрилл, которые вследствие интенсивного ускоренного синтеза не успевали собираться в упорядоченные пучки. При импрегнации солями серебра по Футу коллагеновые волокна приобретали черно-коричневый оттенок, свидетельствующий об их медленном созревании (рис. 3). Данные фиброзные прослойки ограничивали грануляции в виде островков. В зоне введения ксеногенного биоматериала также наблюдались начальные признаки развития гранулематозного воспаления, выражающиеся в наличии эпителиоидных клеток с дальнейшей их трансформацией в гигантские клетки инородных тел и клетки Пирогова-Лангханса концентрирующихся возле нерезорбированных кусочков ксенотрансплантата (рис.4). При окраске по Хейлу синее окрашивание наблюдалось только в зонах новообразования соединительной ткани, но не в самих частицах биоматериала.

Через 1-2 месяца гистологические исследования выявили в месте введения ксеногенного биоматериала признаки усиления фиброобразования очага воспаления. Наряду с выраженной клеточной инфильтрацией, продолжающейся обнаруживаться возле остатков трансплантата, наблюдались зрелые плотные пучки

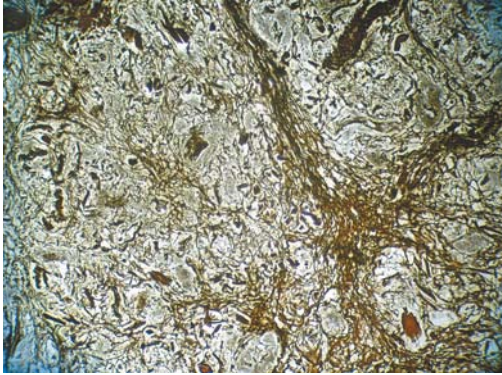


Рисунок 3. Аргентофильные ретикулярные волокна I типа через 14 суток после введения ксеногенного биоматериала. Импрегнация по Футу. Ув. х 50.

новообразованных коллагеновых волокон, формирующих толстую плотную соединительнотканную капсулу (рис.5). Спустя 6 месяцев частицы биоматериала подкожно не определялись. На их месте обнаруживался соединительнотканый аваскулярный регенерат, состоящий из толстых фуксинофильных пучков коллагеновых волокон инфильтрированных фиброцитами.

Иммуногистохимические исследования показали, что после подкожного введения крысам ксеногенного био-

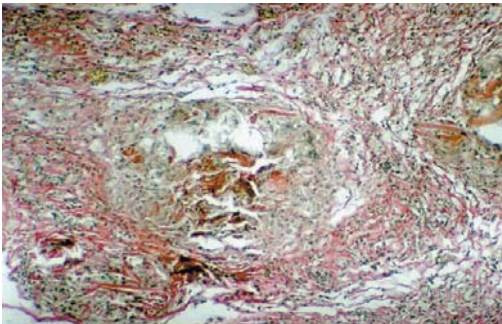


Рисунок 5. Образование соединительнотканной капсулы вокруг нерезорбированных частиц ксеногенного биоматериала через 30 суток после введения. Окраска по Ван-Гизону. Ув. х 50.

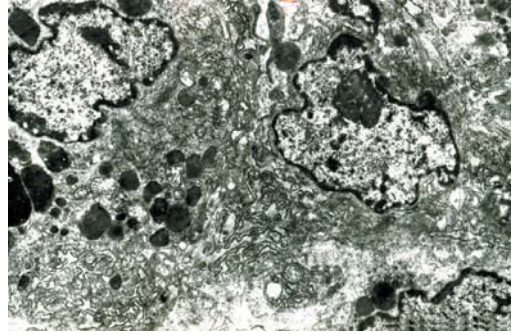
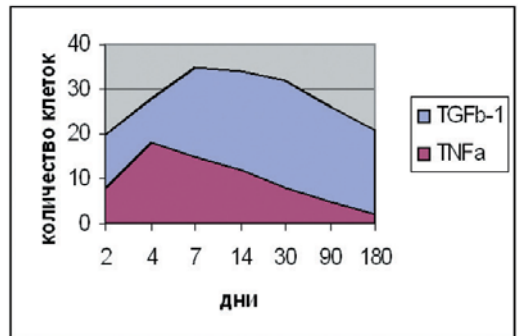


Рисунок 4. Гигантская клетка макрофагального происхождения. Фагосомы с инертным материалом, разрушенные митохондрии. Через 14 суток после введения ксеногенного биоматериала. Электронная микрофотография. Ув. х 8500.

материала в собственной пластинке дермы выявлялось большое количество противовоспалительного цитокина TGF- β 1 – маркера фиброза. В период от 4 до 7 суток его содержание достигало максимальных значений, спустя 14 суток экспрессия цитокина клетками соединительной ткани несколько снижалась. Выраженность экспрессии цитотоксического фактора некроза опухолей (TNF- α) в ткани при ксенотрансплантации была незначительна (Диаграмма 1).

Диаграмма 1. Количество клеток, экспрессирующих TGF- β и TNF- α после введения ксеногенного биоматериала



В соединительной ткани у крыс контрольной группы в начальные сроки эксперимента (2-4 суток) выявлялись преимущественно гистиоциты. Они были округлой формы с неровными краями и с бобовидным или овальным ядром, меньшим по размеру, чем у фибробластов. В цитоплазме определялись многочисленные вакуоли, гранулы, рибосомы, полирибосомы и мелкие темные лизосомы. Встречалось умеренное количество и активных фагоцитирующих макрофагов небольших размеров овальной или округлой формы. В их цитоплазме содержалось незначительное количество вакуолей средних и мелких размеров с темным содержимым и редкие фаголизосомы. Также был ярко выражен микропиноцитоз. В поздние сроки эксперимента признаки пиноцитоза были менее выражены. В цитозоле обнаруживались мелкие митохондрии с темным матриксом, в которых выявлялись параллельно расположенные кристы. Был умеренно развит комплекс Гольджи, каналы ГЭР четко выражены. Эктоплазма образовывала длинные тонкие выросты и инвагинации. В сроки от 7 суток до 6 месяцев в тканях изредка встречались блуждающие макрофаги. Они были с типичной для них вышеописанной ультраструктурой. Место инъекции физиологического раствора не отличалось по структуре от окружающей ткани, представленной рыхлой волокнистой соединительной тканью. Цитокины TGF- β 1 и TNF- α в тканях не выявлялись.

Обсуждение результатов

После введения биоматериала в соединительной ткани крыс выявлялся широкий диапазон клеточных элемен-

тов, среди которых преобладали воспалительные и иммунокомпетентные клетки. Причем, в начальные сроки эксперимента к нейтрофильно – макрофагальной инфильтрации довольно быстро присоединялась лимфоцитарная, что указывало на развитие иммунной реакции в месте имплантации за счет высокой антигенности биоматериала [6, 22]. Сосудистая реакция, вызванная введением ксеногенного биоматериала – расширение сосудов, стаз крови, образование микротромбов и кровоизлияния в ткани отражала развитие застойной гиперемии в зоне воспаления. Совокупность этих признаков также играет важную роль в формировании ограниченного клеточного вала, отделяющего очаг воспаления от здоровых тканей организма [7].

Многие исследователи утверждают, что ключевым моментом, определяющим характер индуцированного воспаления, является аминокислотный состав биоматериала [13]. Результаты проведенных гистохимических исследований на выявление свободных гликозаминогликанов в тканях свидетельствуют о том, что ксеногенный биоматериал большей частью не подвергается фракционированию в “чужом” для него организме. Почти два месяца нерезорбированные частицы ксеногенного биоматериала определялись в месте введения, вызывая иммунную воспалительную реакцию.

При репарации тканей регуляторами межклеточных взаимодействий являются макрофаги [9, 19, 20]. Проведенные нами электронно-микроскопические исследования показали, что в зоне введения биоматериала накапливались функционально истощенные неактивные

макрофагальные клетки. Известно, что при поглощении макрофагами инертного или нелизирующегося материала теряется их подвижность, ослабляется как фагоцитоз, так и секреторная функция [10]. Существует точка зрения, рассматривающая именно в дефиците активных макрофагов причину незавершенного фагоцитоза и, как следствие, пролонгирования воспаления, принимающего затяжной вялотекущий характер [1, 3]. Выявленные скопления эпителиоидных клеток в зоне введения биоматериала можно расценивать как признак развития компенсаторно-адаптивной клеточной реакции, выражающейся в гипертрофии макрофагов. Последующая их трансформация в гигантские клетки инородных тел и клетки Пирогова-Лангханса свидетельствует о развитии гранулематозного воспаления [7, 10, 17]. Как известно, гранулемы являются признаком дисрегенерации и часто приводят к негативным исходам: хронизации воспалительного процесса, фиброзу с образованием рубца и т.д., что и наблюдалось в нашем эксперименте.

При ксенотрансплантации на фоне фагосекреторной несостоятельности, макрофаги привлекают в работу по восстановлению структурно-функциональной целостности ткани другие клеточные популяции, как то Т-, В-лимфоциты, большое количество мезенхимальных клеток. Лимфоцитарно-фибробластические контакты являются одним из механизмов, регулирующих количество и активность фибробластов. Лимфоциты ускоряют дифференцировку фибробластов, усиливают синтез коллагена, осуществляют контроль за правильностью их дифференцировки [22]. И к тому же, наличие лимфо-макрофагальных

комплексов в ткани свидетельствует об иммунном характере воспалительной реакции, протекающей по типу гиперчувствительности замедленного типа и хронизации процесса [6]. А многочисленные мезенхимные клетки принимают активное участие в формировании молодой недифференцированной ткани. Их дальнейшая трансформация в клетки фибробластического ряда - коллагенобласты II типа и контракильные клетки - миофибробласты, интенсивно продуцирующие коллаген, приводит к быстрому заполнению тканевого дефекта коллагеновыми волокнами и формированию фиброзной ткани [14, 15]. По-видимому, именно совокупность выявленных вышеприведенных признаков способствовала образованию вокруг имплантированного ксеногенного биоматериала толстой плотной соединительнотканной капсулы, отграничивающей данный биоматериал от окружающих тканей и образованию рубца.

Известно также, что не только дефицит активных макрофагов, но и многочисленные скопления макрофагов могут привести к хронизации воспалительного процесса, гранулематозному воспалению и фиброзу [16]. Но есть данные и о том, что далеко не всякое скопление мононуклеаров дает толчок к нерегулируемому росту соединительной ткани, обуславливающему фиброз. Если известно, что в одних гранулемах фиброзные преобразования начинаются уже в самом начале инфильтрации, а в других - макрофаги долго персистируют в инфильтрате, который не подвергается склеротическим изменениям [3]. Ответы на эти спорные вопросы кроются как в фенотипических особенностях клеток моноцитарно - макрофагальной систе-

мы, так и в спектре цитокинов (TNF- α , TGF- β 1), оказывающих регуляторное влияние на активность других клеточных популяций, в частности фибробластов.

Иммуногистохимически в зоне введения ксеногенного биоматериала выявлялось большое содержание цитокина TGF- β 1, которое со временем снижалось, но его экспрессия отмечалась до 6 месяцев наблюдения. Выраженность цитотоксических субстанций (TNF- α), которые бы способствовали лизису и резорбции частиц биоматериала, была незначительна. Как известно, TGF- β 1 способствует локальной иммунодепрессии в ткани и дезактивирует цитотоксическую функцию макрофагов, ингибируя продукцию цитотоксических монокинов, в том числе и TNF- α [11]. Также TGF- β 1 является стимулятором пролиферации фибробластов, синтеза коллагена и развития фиброза [12, 14]. Эти данные вполне согласуются с полученными нами результатами исследований. При ксенотрансплантации продуктивная фаза воспаления является наиболее выраженной и длительной, перекрывая по глубине и продолжительности деструктивную фазу, что приводит к фиброзированию места имплантации ксеногенного биоматериала и рубцеванию.

Таким образом, введение ксеногенного биоматериала дезактивирует функциональную способность макрофагов, в результате чего в тканях развивается хроническое воспаление по типу гиперчувствительности замедленного типа. При заживлении очага повреждения происходят процессы несбалансированного фиброза с формированием грубоволокнистого рубца за счет подавления цитотоксических и усиления

ростстимулирующих потенциалов клеток. Подкожное введение животным диспергированного ксеногенного биоматериала может служить в качестве экспериментальной модели для создания очага хронического воспаления или формирования очага фиброза (рубцевания) в тканях. Предлагаемая экспериментальная модель очень проста и удобна для воспроизведения.

Литература

1. *Кутина С.Н., Маянский Д.Н.* Особенности развития цирроза печени у крыс при стимуляции печеночных макрофагов // Бюл. exper. биол., 1981, N9, с.366-369.
2. *Лебедева А.И.* Структурно-функциональная характеристика макрофагов, выявленных при имплантации биоматериалов (экспериментально-морфологическое исследование) Автореф. дис. ... канд. биол. наук.- Уфа, 2004, 23 с.
3. *Маянский Д. Н.* Роль макрофагов в репаративных процессах.- В кн.: Механизмы патологических реакций. Томск, 1991, с. 56–62. (а).
4. *Мусина Л.А.* Функциональная морфология макрофагов при регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами. Автореф. дис. ... докт. биол. наук, Саранск, 2007, 49 с.
5. *Муслимов С. А.* Морфологические аспекты регенеративной хирургии.- Уфа.: Башкортостан, 2000, 168 с.
6. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология.- М.: Мир, 2000, с. 464-489.
7. *Серов В.В., Пауков В.С.* Воспаление. Руководство для врачей.- М.: Медицина, 1995.- 640 с

8. **Уикли Б.** Электронная микроскопия для начинающих. Пер. с англ.-М.: Мир, 1975.-324 с.
9. **Шехтер А.Б., Серов В.В.** Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) // Арх. Патолог, 1991, с.7-14.
10. **Шехтер А.Б., Розанова И.Б.** Тканевая реакция на имплантат. В кн.: Биосовместимость. Под ред. В.И.Севастьянова.-М., 1999, с. 174-211.
11. **Bogdan, C., Nathan, C.** Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10 //Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 685, p. 1993713–1993739.
12. **Cucoranu I., Clempus R., Dikalova A., Phelan P.J., Ariyan S., Dikalov S., Sorescu D.** NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. // Circ Res., 2005, Vol. 97, N9, p. 900-907.
13. **Derwin KA, Baker AR, Spragg RK, Leigh DR, Iannotti JP.** Commercial extracellular matrix scaffolds for rotator cuff tendon repair. Biomechanical, biochemical, and cellular properties. // J Bone Joint Surg Am., 2006, Vol. 88, N 12, p. 2665-2672.
14. **Desmouliere A., Chaponnier C., Gabbiani G.** Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. // Wound Repair Regen., 2005, Vol. 13, N1, p. 7-12.
15. **Eyden B.** Electron microscopy in the study of myofibroblastic lesions. //Semin Diagn Pathol., 2003, Vol. 20, N1, p.13-24.
16. **Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clément K, Lacasa D.** Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. // Mol Endocrinol., 2009, Vol. 23, N1, p. 11-24.
17. **Mackiewicz Z., Rimkevicius A., Petersen J., Andersen C.B., Dudek E., Vytrasova M., Kontinen Y.T.** Macrophages overloaded with tissue debris in Wegener's granulomatosis. // Ann Rheum Dis., 2005, Vol. 64, N8, P.1229-1232.
18. **Muldashev E. R., Muslimov S. A., Nigmatullin R. T. et al.** Basic research conducted on alloplant biomaterials // Eur. J. Ophthalmol., 1999, Vol. 9, N 1, p. 8-13.
19. **Sobiczwska E., Szmigielski S.** The role of selected growth factors in the wound healing process // Przegl. Lek., 1997, Vol. 54, N 9, p. 634-638.
20. **Sutherland J., Denyer M., Britland S.** Motogenic substrata and chemokinetic growth factors for human skin cells. // J. Anat., 2005, Vol. 207, N1, p. 67-78.
21. **Toshiyuki Yamamoto.** Autoimmune mechanisms of scleroderma and a role of oxidative stress // Self Nonsell., 2011, Vol. 2, N1, p. 4–10.
22. **Valenzuela NM, Reed EF.** The link between major histocompatibility complex antibodies and cell proliferation. // Transplant Rev (Orlando), 2011, p. 29.

Experimental modeling of the chronic inflammation process and fibrosis.

A.I. Lebedeva, S.A. Muslimov, L.A. Musina

Histological, gisto- and immunohistochemistry, electron-microscopic research methods shown that subcutaneous introduction experimental animal dispersed xenogenic biomaterial, treated according to the Alloplant® technology, can serve as an experimental model for the induction of processes of chronic inflammation and fibrosis (scarring) in the tissues. It is established, that xenogeneic gore will disable the functional ability of macrophages, resulting in the tissues of developing chronic inflammation of the type of delayed hypersensitivity type. In healing the hearth of damage processes are unbalanced fibrosis with the formation of the rough fibrous scar.

Key words: experimental model, chronic inflammation, fibrosis, xenogeneic gore, macrophages.

Моделирование лекарственного токсического гепатита на крысах

А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Касинская,
О.И. Степанова, О.В. Баранова, А. Г. Киселев

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

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, scbmt@yandex.ru

В работе представлены данные экспериментального моделирования лекарственного токсического гепатита на крысах. Выявлены дозы и сроки введения парацетамола для получения умеренного хронического гепатита.

Ключевые слова: биомодель, токсический гепатит, крысы, парацетамол.

В последнее время остро стоит проблема токсических поражений внутренних органов, в частности печени, в связи с большим количеством потребляемых лекарств. Токсический гепатит идет «в ногу» с применением лекарств в домашних условиях. В связи с этим становится актуальным вопрос о защите печени и предотвращении ее заболеваний. Моделирование лекарственного токсического гепатита – необходимая составляющая доклинических исследований гепатопротекторных лекарственных средств.

Целью эксперимента являлось получение модели лекарственного токсического гепатита на крысах.

Материалы и методы

Эксперименты выполнялись в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России на лабораторных белых аутбредных мышах и крысах. Лабораторные животные поступили из филиала ФГБУ «НЦБМТ ФМБА» «Андреевка», пос. Андреевка, Московской

обл. Животные были взяты в эксперимент методом случайной выборки. Кормление осуществлялось стандартным полнорационным комбикормом, поение вволю. Животные содержались в групповых станках по 3 головы. Зоогигиенические параметры содержания были в пределах нормы. Ежедневно всем животным перорально вводили суспензию парацетамола в воде в дозе 500 мг/кг и 1 мл. 40% спирта. Длительность введения составила 2 недели. По окончании эксперимента животных умерщвляли путем декапитации с отбором образцов печени для гистологических исследований.

Результаты и их обсуждение

Дольковое и балочное строение печени сохранено, отмечается умеренно выраженное полнокровие части центральных вен и трети синусоидов. Гепатоциты центральных отделов долек в состоянии белковой дистрофии, единичные клетки в состоянии мелкокапельной жировой

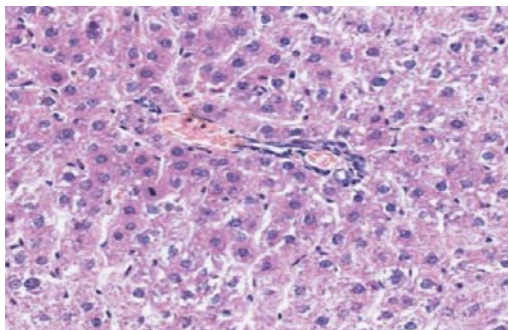


Рис. 1.

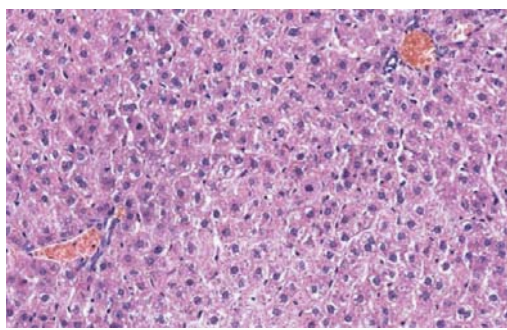


Рис. 2.

дистрофии, часть гепатоцитов с признаками глыбчатого распада цитоплазмы, пикноза и фрагментации ядер. Портальные тракты не расширены, незначительно инфильтрированы лимфоцитарными элементами, отмечается проникновение части воспалительного инфильтрата в центральные отделы долек с формированием очаговых скоплений в просвете синусоидов (5-10 клеток воспалительного инфильтрата). У части животных отмечаются участки гибели отдельных гепатоцитов и небольших групп гепатоцитов (признаки плазморексиса, кариорексиса, кариолизиса) преимуще-

ственно в центральных отделах долек, отмечаются отдельные гепатоциты с признаками митотической активности (фигуры митозов 1-2 в 4 полях зрения) рис 1, 2.

Выводы:

Была получена модель лекарственного токсического гепатита с умеренными морфофункциональными изменениями печени.

Алкоголь усиливает токсическое действие парацетамола, что может привести к белковой и жировой дистрофии печени, а так же к некрозу гепатоцитов.

Modeling of medicinal toxic hepatitis on rats

**A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, N.V. Kasinskaya, O.I. Stepanova,
O.V. Baranova, A. G.Kiselyov**

Present data experimental modeling of rats toxic hepatitis. Identified doses and timing giving paracetamol for moderate chronic hepatitis.

Key words: biomodel, toxic hepatitis, rats, paracetamol.

Изменение параметров сердечной деятельности по данным ЭКГ у мини-свиней в условиях стресс-индуцированной тахикардии

Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе, В.Н. Каркищенко, А.О. Ревякин,
Н.В. Станкова, А.Е. Ким

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Контактная информация: Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Проведено сопоставление ЭКГ-параметров сердечной деятельности мини-свиней в обычных условиях пребывания в виварии и в условиях стресс-индуцированной тахикардии физической нагрузки. Показано, что перестройка работы сердца мини-свиней в условиях стресс-индуцированной тахикардии принципиально не отличается от аналогичной перестройки у людей, что позволяет считать мини-свиней адекватной биологической моделью для оценки влияния фармакологических средств на деятельность сердца при проведении различных модельных исследований кратковременных патологических процессов.

Ключевые слова: ЭКГ, мини-свиньи, стресс-индуцированная тахикардия, биологические модели, экстремальные состояния.

Современная экспериментальная фармакология в настоящее время не имеет адекватных биологических моделей сердечной деятельности человека в экстремальных (критических) ситуациях, в том числе – требующих оказания неотложной помощи (ургентные состояния). В основном это связано с тем, что сердечная деятельность (регуляция, метаболизм, тканевая гемодинамика) мелких лабораторных животных (мыши, крысы, хомячки, морские свинки, кролики, кошки) не является адекватной для переноса полученных результатов на человека, а применение крупных животных (свиньи, овцы, лошади, приматы) в экспериментальных фармакологических исследованиях в настоящее время является

достаточно проблематичным. Исключительное положение между группами мелких и крупных экспериментальных животных занимают мини-свиньи [6-8]. Эти животные, с одной стороны, по основным метаболическим процессам и механизмам регуляции физиологических функций достаточно близки к человеку и могут рассматриваться в качестве достаточно адекватной биологической модели основных тканевых процессов человека [1, 2, 4], а с другой стороны, могут легко содержаться в условиях стандартного вивария [1, 3], и проведение каких-либо манипуляций с ними (включая хирургические манипуляции) не представляет собой особо сложную задачу. В связи с этим нами была предпринята попытка

изучить возможность экстраполяции на человека результатов, полученных при оценке сердечной деятельности мини-свиней по параметрам ЭКГ. В качестве кратковременного воздействия, выводящего сердечную деятельность мини-свиней в экстремальный диапазон, была использована методика стресс-индуцированной тахикардии физической нагрузки.

Организация и методы исследования

Исследование было проведено в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» в соответствии с нормативной документацией. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией Центра.

Эксперименты выполнялись на лабораторных светлогорских мини-свиньях, самцах, в количестве 59 голов, масса животных перед началом эксперимента $16,0 \pm 1,5$ кг. Животных содержали в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». Животные содержались в стационарных клетках, индивидуально. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для свиней ПК 58. Водопроводная очищенная вода давалась в поилках *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное, 12-часовой световой цикл.

ЭКГ у мини-свиней регистрировалось в отведениях от конечностей, так как из-за анатомических особенностей грудной клетки животных зарегистрировать у них ЭКГ в грудных отведениях практически не возможно (крайне низкий вольтаж зубцов).

В исследовании анализировались особенности ЭКГ 59 мини-свиней, записанных в положении стоя при обычном пребывании в манипуляционном блоке вивария. Для мини-свиней сама процедура перевода в манипуляционный блок и наложение электродов является стрессом, поэтому записанные ЭКГ не характеризуют состояние покоя у животных и не могут быть прямо экстраполированы на ЭКГ человека в состоянии покоя лежа, обычно используемые в клинической практике. В то же время, векторный анализ ЭКГ мини-свиней и человека показал, что облака рассеивания электрических векторов сердца человека и мини-свиньи во многом пересекаются и зона такого пересечения существенно больше, чем для ЭКГ кошек [4]. Для человека в обычных условиях жизни и профессиональной деятельности также характерна определенная мобилизация регуляторных систем, в том числе и стресс-реализующих, поэтому фоновые (в обычных условиях) записи ЭКГ мини-свиней вполне могут быть соотнесены с характеристиками ЭКГ человека в процессе активного дневного бодрствования [10-12] (рис. 1).

Стресс-индуцированная тахикардия создавалась у предварительно отобранных (к бегу на тредбане обычно способны не более 30% популяции молодых животных) и обученных мини-свиней за счет выполнения ими интенсивной физической работы (бег на тредбане со

Параметры

P, сек.:	0.00	R-R, сек.:	0.65
PQ, сек.:	0.85	AQRS, град.:	-90
QRS, сек.:	0.06	ЧСС, уд/мин.:	92
QT/QTБ, сек.:	0.27/0.40	QTcor(Bazett), с:	0.33
RRмакс.-RRмин.:	0.70-0.61	А.Д., мм.рт.ст.:	120/80

Заключение

Синусовый ритм с ЧСС = 92 уд/мин.
Неопределенная электрическая позиция сердца.
Блокада передне-верхних разветвлений левой ножки пучка Гиса.

Врач:

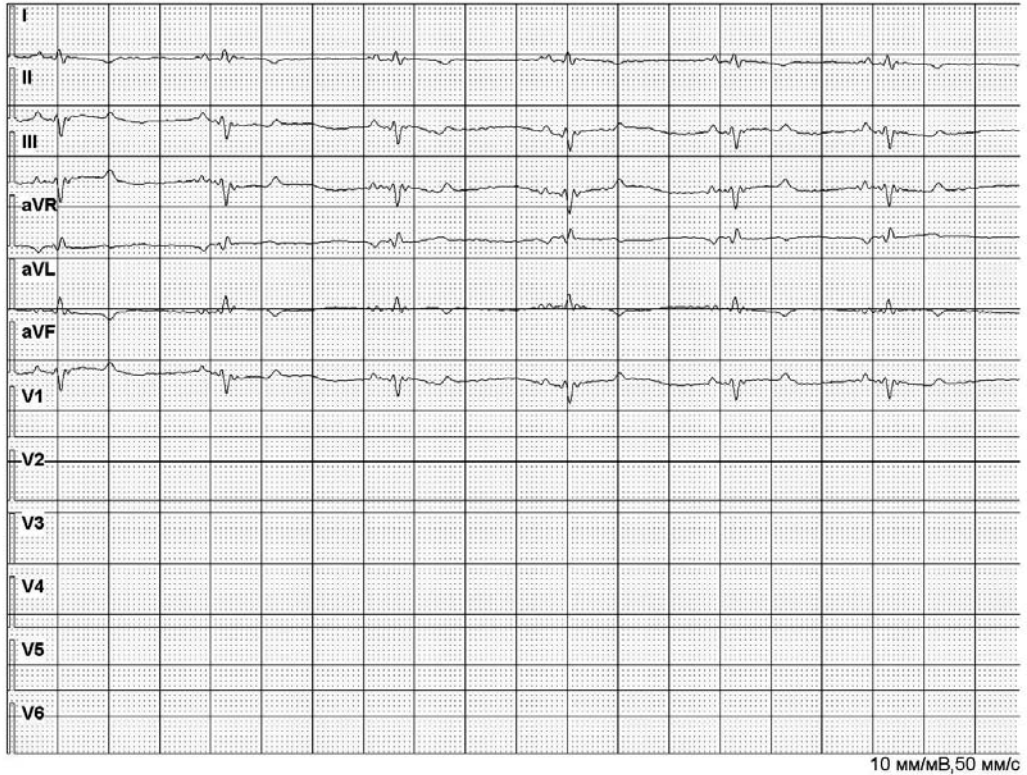


Рис. 1. Типовая ЭКГ мини-свиньи в фоновых условиях.

скоростью 7 км/час) до отказа. Для мини-свиней бег не является физиологическим видом двигательной нагрузки, и необходимость бега является очень сильным стрессовым фактором для этих животных, вызывающим предельное напряжение всех систем регуляции.

Предварительно животных в течение 15 дней до начала исследования обуча-

ли бегу на беговой дорожке. Скорость движения ленты во время обучения – 5 км/час. Длительность обучения – 30 минут ежедневно. Отбор и обучение бегу на тредбане прошло 14 мини-свиньи (из общей группы 59 голов). Общий вид типовой ЭКГ этих лабораторных животных сразу после физической нагрузки представлен на рис. 2.

Изменение параметров сердечной деятельности по данным ЭКГ у мини-свиней в условиях стресс-индуцированной тахикардии

Параметры

P, сек.:	0.00	R-R, сек.:	0.33
PQ, сек.:	0.18	AQRS, град.:	50
QRS, сек.:	0.21	ЧСС, уд/мин.:	182
QT/QTБ, сек.:	1.10/0.68	QTcor(Bazett), с:	0.85
RRмакс.-RRмин.:	0.56-0.25	А.Д., мм.рт.ст.:	120/80

Заключение

Синусовая аритмия (выраженная).
Полугоризонтальная электрическая позиция сердца.

Врач:

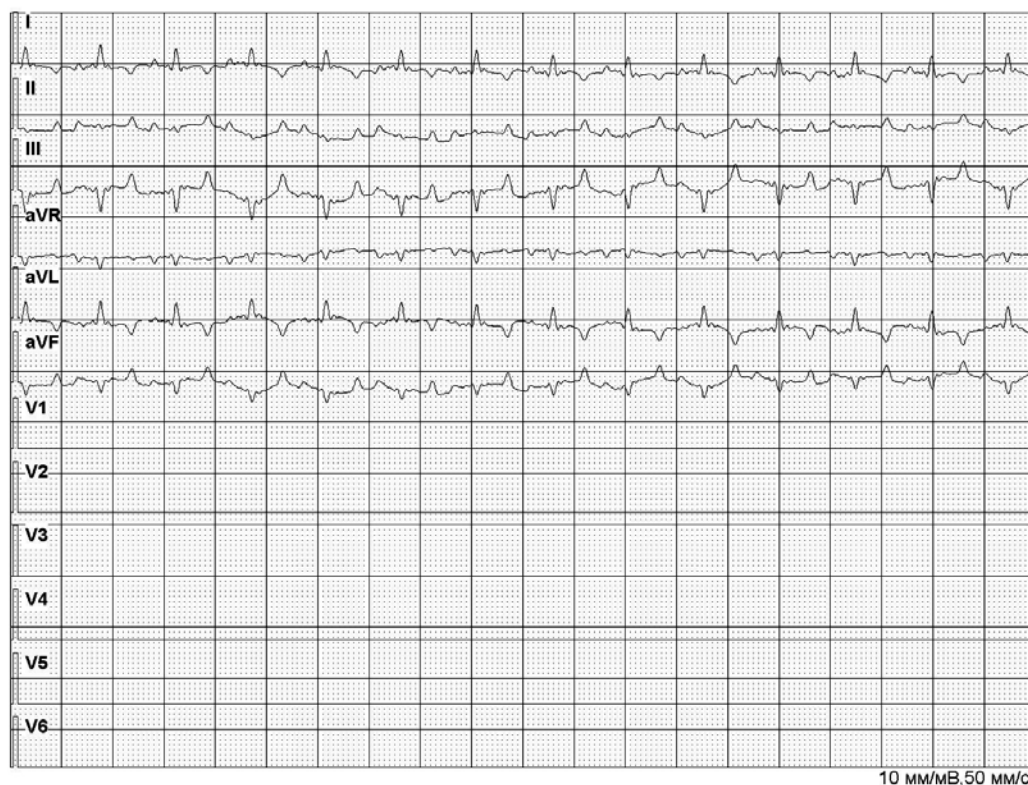


Рис.2. Типовая ЭКГ мини-свиньи сразу после завершения интенсивной физической нагрузки.

Анализ рисунков 1 и 2 показывает, что у мини-свиней формируется картина ЭКГ, крайне похожая на ЭКГ человека. В ЭКГ мини-свиней, записанных в стандартных отведениях от конечностей, присутствуют те же зубцы и интервалы, что и в ЭКГ человека. Характеристика регистрируемого сердечного ритма у мини-свиней в фоновых условиях представлена в табл. 1.

Анализ данных табл. 1 показывает, что для состояния функционального покоя (фоновые условия) для мини-свиней характерно относительное преобладание парасимпатической регуляции сердечного ритма (преобладание синусовой брадиаритмии, миграция водителя ритма, наличие животных с неопределенным ритмом, высокая частота встречаемости неполной блокады верхнего

Структура встречаемости особенностей сердечного ритма у мини-свиней в фоновых условиях

Особенности ЭКГ	Частота встречаемости, %	
	Фон	После нагрузки
Характеристика ритма		
Нормальный синусовый ритм	19	0
Синусовая брадиаритмия	44	0, p=0,001
Синусовая тахикардия	17	86, p=0,05
Миграция водителя ритма	12	0
Эктопический предсердный ритм	5	0
Пароксизмальная тахикардия наджелудочковая	0	14
Неопределенный ритм	3	0
Экстрасистолы		
Без экстрасистол	66	30
Одиночные наджелудочковые экстрасистолы	13	14
Одиночные желудочковые экстрасистолы	13	30
Групповые желудочковые экстрасистолы	3	21
Политопные экстрасистолы	5	5
Нарушения проведения		
Без нарушений	67	79
Неполная блокада верхнего пучка левой ножки пучка Гиса	30	14
Атрио-вентрикулярная блокада I ст	3	7
Электрическая позиция сердца		
Неопределенная	86	79
Полугоризонтальная	14	7
Полувертикальная	0	14
Отклонение электрической оси сердца		
Без отклонений	32	57
Вправо	58	43
Влево	10	0

Примечание: достоверность отличий определялась методом точной вероятности Фишера для четырехпольной таблицы.

пучка левой ножки пучка Гиса) и устранение вагусных влияний выплеском катехоламинов на фоне стресса физической нагрузки (преобладание синусовой тахикардии, появление случаев пароксизмальной наджелудочковой тахикардии и желудочковых экстрасистол). Исчезновение случаев брадиаритмии и

резкий рост частоты встречаемости синусовой тахикардии при стрессе физической нагрузки являются статистически достоверными.

В табл. 2 представлены данные, характеризующие интервалы электрокардиограммы человека (по [5]) и мини-свиньи.

Таблица 2

Сравнительная характеристика длительности интервалов ЭКГ человека и мини-свиньи (секунды)

Интервал	Человек, диапазон нормы	Мини-свиньи (средние по группе, М±m)	
		Фон (n=59)	Стрессовая физическая нагрузка (n=14)
PQ	0,12-0,2	0,31±0,07	0,23±0,11
QT	0,35-0,42	0,29±0,02	0,21±0,02 p=0,05
QTcor (Bazett)	0,39-0,45	0,41±0,03	0,49±0,07
RR	0,75-1,00	0,63±0,02	0,40±0,01 p=2*10 ⁻¹⁰
QRS	0,06-0,09	0,07±0,01	0,12±0,03 p=0,05
ЧСС (уд/мин)	60-90	98±2	153±4 p=8*10 ⁻²¹
RRmax		0,77±0,03	0,72±0,10
RRmin		0,52±0,02	0,33±0,01 p=6*10 ⁻⁵
RR (вариационный размах)		0,25±0,03	0,39±0,11

Анализ данных табл. 2 показывает, что, по сравнению с человеком, ЭКГ мини-свиней в фоновом исследовании характеризуется несколько увеличенным периодом систолы предсердий (интервал PQ) и практически соответствующим человеку продолжительностью систолы желудочков (интервал QRS) и продолжительностью общего желудочкового комплекса (интервал QTcor(Bazett), учитывающий поправку Базетта для разных значений частоты сердечных сокращений). При этом среднее значение длительности кардиоцикла (интервал RR) несколько короче, чем у здоровых людей, а частота сердечных сокращений, соответственно, несколько выше верхней границы нормы для человека.

В ответ на интенсивную физическую нагрузку у мини-свиней, также как и у человека, происходит закономерное укорочение длительности кардиоциклов (интервал RR), что сопровождается резким повышением (более чем в 1,5 раза) значениями ЧСС. Наблюдается сокращение на 25% продолжительности систо-

лы предсердий (интервал PQ) и нескорректированных значений интервала PQ. Происходит снижение минимальных значений интервалов RR при практически сохраненном диапазоне максимальных значений интервалов RR. Такие изменения характерны для резкой активации на нагрузку симпатoadренальной системы.

Важным показателем работы сердца является частота сердечных сокращений. На рисунке 3 представлены частотные кривые встречаемости значений ЧСС в фоновых условиях и стресс-индуцированной тахикардии.

Анализ частотных кривых показывает, что в фоновых условиях распределение значений ЧСС у мини-свиней практически подчиняются закону нормального распределения с максимумом в диапазоне 90-100 уд/мин. Имеющийся небольшой «хвост» наблюдений в области более высоких значений может быть объяснен наличием животных с выраженной синусовой тахикардией (вероятно, у этих животных или исходно тонус симпатической регуляции

был более высокий, или они проявили более выраженную стресс-реакцию на перевод в манипуляционное отделение вивария и наклейку электродов для регистрации ЭКГ).

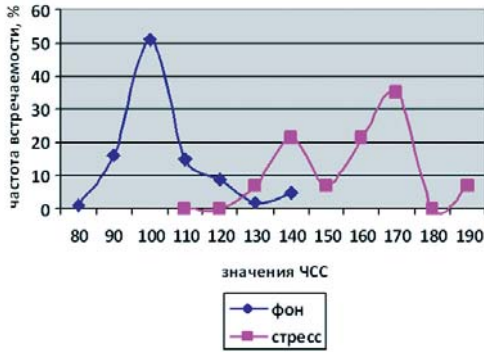


Рис. 3. Кривые частотного распределения встречаемости ЧСС в фоновых условиях и при стресс-индуцированной тахикардии.

В условиях стрессовой физической нагрузки характер частотной кривой носит двугорбый характер. Вероятно, он связан с тем, что длительность выполнения беговой нагрузки у мини-свиней была не стандартизирована по времени, а протекала в режиме «до отказа». Уровень предельно переносимой нагрузки у животных имеет естественную вариативность в 10-15%, в силу чего часть животных отказывалась от нагрузки при меньшей ее выраженности, что и обеспечивало появление малого куполообразного пика в области значений ЧСС около 140 уд/мин. Большая же часть животных смогла выполнить более длительную нагрузку, с чем связано появление главного куполообразного пика в области значений ЧСС около 170 уд/мин.

Сам факт того, что при нагрузке у мини-свиней формируется 2 пика частот встречаемости на значениях ЧСС 140 и 170 уд/мин представляет дополнительный интерес, так как позволяет предположить

возможность введения нормированного показателя физической работоспособности мини-свиней, аналога показателю PWC_{170} для человека. При этом в большинстве случаев этот показатель может быть определен у мини-свиней непосредственно, а в части случаев – расчетным методом (по аналогии с двухступенчатым тестом PWC_{170} для человека).

Выводы:

Параметры ЭКГ мини-свиней в условиях относительного покоя и при выполнении стрессовой предельно переносимой физической нагрузки являются близкими к показателям ЭКГ человека в тех же условиях.

В условиях относительного покоя у мини-свиней выявляется преобладание тонуса парасимпатических влияний на проводящую систему сердца при в целом более коротком кардиоцикле.

Изменения в показателях ЭКГ у мини-свиней в условиях стресс-индуцированной тахикардии носят закономерный характер, отражающий выраженную активацию симпатoadренальной системы. Наличие в структуре перестройки показателей ЭКГ изменений желудочкового комплекса (интервалов QT, QRS, увеличение частоты встречаемости желудочковых экстрасистол) может быть соотнесено с эффектами циркулирующего в крови животных адреналина надпочечников, а увеличение частоты встречаемости синусовой тахикардии, появление случаев пароксизмальной наджелудочковой тахикардии, изменения в минимальных и средних значениях длительности кардиоциклов (интервалы RR) – с влияниями стрессовой активации симпатических вегетативных структур.

Близость между характеристиками ЭКГ человека и мини-свиней, однотипность их реагирования на ситуацию выраженного стресса физической нагрузки позволяют считать, что сердечная деятельность мини-свиней, изучаемая по показателям ЭКГ, может быть использована для биологического моделирования состояний сердечной деятельности человека.

Список литературы

1. *Капанадзе Г.Д.* Некоторые зоотехнические и гематологические показатели у мини-свиней светлогорской популяции // Доклады ТСХА. выпуск 279. М. 2007. С. 140-143.
2. *Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.* Светлогорская популяция мини-свиней // Биомедицина, 2007. № 6. С. 71-81.
3. *Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В.* Разработка методики оценки физической выносливости лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. №1. С. 4-23.
4. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое издательство ВПК. 2004. 608 с.
5. *Норма в медицинской практике: Справочное пособие.* М.: МЕДпресс. 2001. 144 с.
6. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева* М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
7. *McAnulty A., Dayan A.D., Ganderup N-C., Hasting K.L.* The Minipig in Biomedical Research. Peter CRC Press. 2012. 662 p.
8. *Bollen P.J.A., Hansen A.K., Rasmussen H.J.* The Gottingen minipig in pharmacology and toxicology // Pharmacology and toxicology. 2000. V. 80 (Suppl). P. 3-4.
9. *Davey P.* Anatomy of pig heart: comparison with normal human cardiac structure // J. of Anatomy. 2002. V. 193. № 1. P. 105-119.
10. *Eckenfels A., Shuler S.* The normal electrocardiogram of miniature swine // Arzneimittelforschung, 1988. V. 38. P. 253-259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3370073>
11. *Schuleri K.H., Boyle A.J., Centola M.* The Adult Gottingen Minipig as a Model for Chronic Heart Failure After Myocardial Infarction: Focus on Cardiovascular Imaging and Regenerative Therapies. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2710749>
12. *Stuban M., Markert M., Mayer K., Trautmann T., Klumpp A., Henke J., Guth B.* Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Gottingen minipig. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434212>

Parameters of cardio activity according to ECG mini-pigs in a stress-induced tachycardia conditions

E.B. Shustov, G.D. Kapanadze, V.N. Karkishchenko, A.O. Revyakin, N.V. Stankova, A.E. Kim

A comparison of ECG parameters of mini-pigs cardiac works under normal conditional of stay in the laboratory and in stress-induced tachycardia exercise. It is shown that the reconstruction of the heart mini-pigs in stress-induced tachycardia is not fundamentally different from that in humans tuning that allows us to consider a mini-pigs adequate biological model to assess the effects of pharmacological agents on the heart during various modeling studies of short-term pathological processes.

Key words: ECG, mini-pigs, stress-induced tachycardia, the biological model, the extreme state.



Культивирование как способ выявления и реализации биологических и терапевтических эффектов стромальной фракции стволовых и прогениторных клеток костного мозга

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

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

Контактная информация: Степанова Ольга Ивановна scbmt@yandex.ru

Отработан метод выделения из костного мозга (стромальной фракции) стволовых и прогениторных клеток с культивированием их в ростовой среде для идентификации специфичности клеток в культуре мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

Ключевые слова: костный мозг, стромальная фракция, идентификация.

В эмбриогенезе каждый орган развивается из разных стволовых компартов и с участием различных клеток предшественников, которые, мигрируя в него по строгим законам развития, обеспечивают информационный обмен и создание соответствующих клеточных линий. Во взрослом организме клеточный состав каждого органа жестко фиксирован. Именно поэтому при гибели паренхимы органов процессы восстановительной регенерации в них могут быть эффективно воспроизведены путем рекапитуляции эмбриогенеза, за счет активной и возросшей миграции региональных стволовых клеток в зоны тканевого повреждения.

Известно, что миграционной и, следовательно, регенерационной способностью, во взрослом организме, обладают клетки иммунной системы и, прежде всего, костный мозг (КМ), который является самым мощным в организме донором стволовых и прогениторных клеток.

КМ сам по себе относится к органам, имеющим мезенхимальное происхождение, а т.к. практически все органы и ткани содержат в своей структуре клетки мезенхимы, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из костного мозга (гемопозитические и стромальные) должны быть наиболее активными участниками восстановительных процессов в органах при их повреждении.

Регенерационные эффекты МСК костного мозга гемопоэтической (преимущественно лимфоидной) и стромальной фракций клеток реализуются не только за счет стимуляции ими неоангиогенеза и предифференцировки МСК стромального ряда в специализированные клетки, но и за счет продукции ими широкого спектра цитокинов и ростовых факторов в процессе жизнедеятельности. Процесс культивирования клеток костного мозга является способом не только их клонирования но варьируя режимами и условиями культивирования клеток можно также изменять их пластические свойства и влиять на некоторые механизмы межклеточного взаимодействия.

Цель: Отработать технологические режимы культивирования и предифференцировки стволовых клеток костного мозга в другие типы клеток (фибробластоподобные) и идентифицировать их и использовать для восстановления структуры и функции пораженных органов на моделях с хроническими патологиями.

Перед нами были поставлены следующие **задачи работы:**

Отработать технологию раздельного выделения из костного мозга мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток и идентифицировать в культуре мезенхимальные стволовые клетки.

Отработать технологий получения и идентификации клеточных культур.

Получить первичную культуру МСК и предифференцировать МСК в фибробластоподобные (ФМСК),

Материалы и методы

Донорами стволовых и прогениторных клеток костного мозга были использованы здоровые доноры – мыши 2-х линий:

- мыши линии B10.GFP (n=30) для получения как терапевтического эффекта и для маркировки введенных клеток в организм реципиента при аллогенной трансплантации;

- гетерозиготные мыши db/+ (n=30), для получения терапевтического эффекта при изогенной трансплантации.

Технология проведения культуральных исследований.

Работа по выделению клеток и их культивированию проводилась в соответствии с общими принципами осуществления культуральных исследований.

Получение культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ).

У животных под эфирным наркозом, получали стерильно клеточный аспират из костномозгового канала трубчатых костей путем вымывания из полости раствором Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}). Суспензию клеток центрифугировали 5 мин. при 1500 об/мин; осадок клеток ресуспендировали в лизирующем растворе (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:1 при комнатной температуре $t^0=(22^\circ\text{C})$ в течение 1 мин. и центрифугировали 3 мин. при 1500 об/мин, добиваясь полного лизиса эритроцитов. Гемолизированный супернатант полностью удаляли отсасыванием, а клеточный осадок, содержащий МНК и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ) ресуспендировали в ростовой среде DMEM (ПанЭко), с добавлением 25мМ HEPES, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Через 3-5 суток неприкрепившиеся клетки отбирали, а к оставшимся пластикадгезивным клеткам в ростовую среду добавляли основной фактор

роста фибробластов (bFGF) (Sigma, USA) 20 нг/мл. Культивировали ММСК КМ для наращивания клеточной массы в течение 14 суток с постоянной заменой ростовой среды через каждые 3 дня. Через 2 недели клеточный материал, представлявший собой прикрепившиеся к пластику распластанные фибробластоподобные клетки (стромальные стволовые клетки), был готов для трансплантации (рис. 1).

Методы идентификации специфичности клеток в культуре ММСК КМ (фибробластоподобных клеток)

Использовали иммуногистохимический метод выявления коллагена I типа [Лейси А., 1992].

Иммуногистохимическое определение коллагена I типа, проводили в ММСК КМ (фибробластоподобные клетки).

Для этого плашку с культурой клеток отмывали PBS, после чего клетки фиксировали 100% метанолом при 20°C в течение 20 минут.

А, Б – 7 суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров мышей B10.GFP: А. – Увел. X200, фазовый контраст; Б. – Увел. X200; люминесцентная микроскопия; В, Г – 14 суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров мышей B10.GFP для аллотрансплантации: В. – Увел. X100, фазовый контраст; Г. – Увел. X600; люминесцентная микроскопия; Д – 14 суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров гетерозиготных мышей db/+ для изотрансплантации; Увел. X200, фазовый контраст.

Эндогенную пероксидазную активность неспецифическое окрашивание блокировали последовательной обработ-

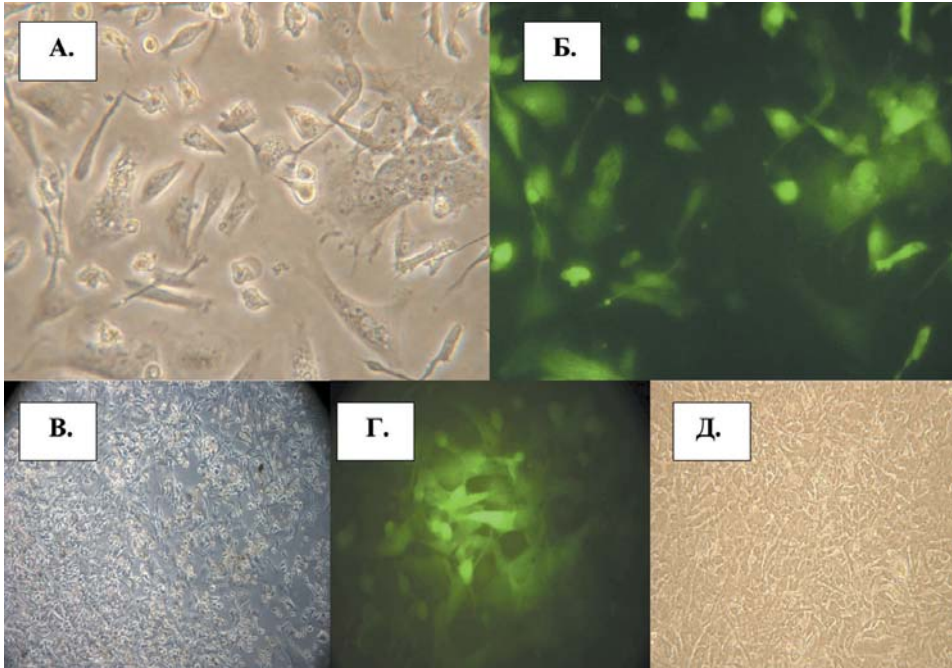


Рис. 1. Культура мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у мышей разных линий и на разных сроках культивирования.

кой свежеприготовленными растворами: 3% перекиси водорода (10 мин), 2,28% periodic acid (5 мин), и 0,02% боргидрата натрия [borhydride] (5 мин). Затем клетки инкубировали в 3% растворе нормальной лошадиной сыворотки (в 0,005M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH=7.6) в течение 30 мин и далее инкубировали 36-48 часов при 4°C с первичной антисывороткой. Эту антисыворотку готовили рутинным способом в концентрации 1:10.000. Козью антисыворотку разбавляли до нужной концентрации 1%-м раствором нормальной лошадиной сыворотки в Tris-буфере. После инкубации с первичной антисывороткой, препараты инкубировали при комнатной температуре 30 мин с кроличьими антикозьими γ -глобулинами (1:100), затем с кролик-пероксидаза-антипероксидаза (1:50) 30 мин. Обе антисыворотки были разбавлены в 1%-м растворе нормальной козьей сыворотки в Tris-буфере. Полученные срезы тканей далее проявляли обработкой 0,05% -м раствором diaminobenzidine-4HCl в 0,1M PBS при pH=5,8 в течение 5 мин. Коричневое окрашивание клеток на коллаген I типа (рис.2) наблюдали в световом микроскопе и фотографировали с помощью цифровой фотокамеры фирмы «OLYMPUS» (Япония) на компьютере с программным обеспечением. При окрашивании на остеопонтин и кальцитонин специфического окрашивания не наблюдали, что свидетельствовало об отсутствии остеобластной дифференцировки.

Применив иммуногистохимический метод идентификации мезенхимальных клеток по соответствующему маркеру белка - коллаген I типа, мы установили, в культуре ММСК КМ (фибробластоподобных) коллаген I типа выявляется у 100% адгезированных клеток. Этот



Рис. 2. Идентификация мезенхимальных стволовых клеток мыши в культуре маркером на коллаген I типа. 7-е сутки культивирования ММСК КМ; Окраска на коллаген I типа. Увел. x 400.

факт доказывает однородность культуры адгезированных мезенхимальных стромальных клеток и пригодность метода для их выделения и последующего применения с лечебными целями.

Необходимость предифференцировки МСК перед трансплантацией диктовалась еще и тем, что стволовым клеткам КМ присущ эффект хоминга (homing) и поэтому для удержания МСК КМ в очаге повреждения (в зоне трансплантации) эти клетки должны иметь свойства клеток соответствующего органа (ткани) фенотипа. Основываясь на представлениях о необходимости направленной фенотипической индукции процессов регенерации в поврежденном органе для восстановления его функции нами была проведена работа по отработке режимов предифференцировки МСК в фибробластоподобные клетки.

Фибробластоподобные клетки из МСК образуются постоянно, как фидерные клетки – сопутствующие клетки, вне зависимости от состава среды. Однако, их процентное содержание зависит от присутствия факторов роста и субстратспецифических добавок.

Подготовка клеточного материала для трансплантации.

Подготовка ММСК КМ. Через 2 недели культивирования клеточный материал использовали для трансплантации. Культуру адгезированных на пластике ММСК КМ дважды отмывали от среды с сывороткой с помощью раствора Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} . Затем для снятия клеток с пластика в культуру вносили раствор Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} , содержащий 0,25% раствор трипсина и инкубировали 3-5 мин. при $37^{\circ}C$ в условиях медленного перемешивания. После пипетирования клетки ресуспендировали в растворе Хэнкса при $4^{\circ}C$, содержащем 10% фетальную бычью сыворотку, центрифугировали при 1500 об/мин 5 мин. и снова ресуспендировали в растворе Хэнкса; производили подсчет полученных клеток в камере Горяева. Подготовленные для трансплантации клетки ресуспендировали в 500-1000 мкл. раствора Хэнкса при $4^{\circ}C$. В контрольной серии животным вводили такой же объем физиологического раствора без ККМ.

Все выше изложенное позволяет прийти к заключению, что процедура культивирования клеток КМ важна не только для клонирования клеток и наращивания

клеточной массы, не только важна для предифференцировки мезенхимальных (стромальных) стволовых ККМ (путем подбора состава культуральных сред и условий культивирования) и подготовки их к выполнению регионарных прогениторных функций после трансплантации.

Наши исследования показали, что состав культуральной среды и необходимость его обновления в процессе культивирования играют определяющую роль в индукции направления дифференцировки МСК.

Выводы

Отработанная технология отдельного выделения из костного мозга и культивирования мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток является адекватной (подтверждена методами фенотипического и иммуногистохимического исследования), воспроизводимой и пригодной для применения в культуральной – исследовательской работе.

Предифференцировка мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток костного мозга в фибробластоподобные клетки наступает в условиях постоянного присутствия инсулина, и основного фактора роста фибробластов.

Cultivation as way of identification and realization of biological and therapeutic effects stromal fractions of stem and progenitor cells of marrow

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

Worked out a method derived from bone marrow (stromal fraction) of stem and progenitor cells by culturing them in a growth medium for proxy authentication specificity of cells in culture of pluripotent mesenchymal stem cells from bone marrow.

Key words: stem cells, hematopoietic and progenitor cells, stromal fraction, identification.

Исследование погрешностей данных фотоплетизмограммы для анализа вариабельности сердечного ритма

М.И. Стригина^{1,2}, Д.Б. Чайванов^{1,2}, Ю.А. Чудина^{1,2}

¹ – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

² – ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России», Московская обл.

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

В настоящей работе исследована возможность применения данных фотоплетизмограммы для анализа вариабельности сердечного ритма. Экспериментально определены значения рассогласования вариабельности кардиоинтервалов по данным фотоплетизмограммы и электрокардиограммы в зависимости от места наложения датчиков, функционального состояния нервной системы и психофизиологических особенностей испытуемых.

Ключевые слова: вариабельность сердечного ритма, фотоплетизмография, электрокардиография, функциональное состояние нервной системы, психофизиологические особенности.

Анализ вариабельности сердечного ритма зарекомендовал себя как высококачественный метод оценки адаптивных возможностей, состояния регуляторных систем, общей оценки состояния организма. На данный момент анализ вариабельности сердечного ритма осуществляется преимущественно по данным электрокардиограммы (ЭКГ). Это связано с тем, что метод ЭКГ удобен, достаточно прост в использовании, не требует особой подготовки для проведения диагностики. Необходимость анализа вариабельности сердечного ритма по данным фотоплетизмограммы (ФПГ) обусловлена тем, что в условиях проведения ряда физиотерапевтических процедур снятие ЭКГ не представляется возмож-

ным, поскольку помехи, наводимые во время процедур стимуляционными воздействиями, существенно превышают амплитуду полезного сигнала в его спектральной области. Существуют приборы, в которых для оценки вариабельности сердечного ритма применяются данные ФПГ [2]. В исследовании Е.Л. Малиновского было показано, что использование методики фотоплетизмографии в качестве метода оценки состояния пациента во время выполнения физиотерапевтических процедур позволяет повысить качество лечебного воздействия, значительно снижая количество отрицательных реакций на основе подбора индивидуальных параметров воздействия физиотерапевтических процедур [3]. Однако анализ

возможности адекватной и полноценной замены данных ЭКГ, полученных при анализе вариабельности, данными ФПГ в полной мере не проведен. В данной работе положено начало подобного анализа, что определило цель и задачи настоящего исследования.

Целью исследования является изучение возможности применения данных ФПГ для анализа вариабельности сердечного ритма. Учитывая, что анализ вариабельности сердечного ритма по данным ЭКГ основывается на измерении длительности сердечного цикла (RR-интервал), можно предположить, что анализ вариабельности сердечного ритма по данным ФПГ должен основываться на измерении длительности пульсовой волны (ДПВ). В стационарных состояниях, при неизменных характеристиках свойств сосудов величины ДПВ и RR должны в точности совпадать. Наличие некоторой задержки в получении данных по ФПГ связано с тем, что в норме кровь очередного ударного объема достигает пальцевого датчика через 3-5 с, а ушного – через 2-3 с после сердечного сокращения [7]. При изменении свойств сосудов такая задержка может увеличиваться или уменьшаться. Если в течение одного кардиоцикла происходят существенные изменения свойств кровеносных сосудов, величины ДПВ и RR могут отличаться. Очевидно, что свойства сосудов даже в норме существенно зависят от индивидуальных морфологических и функциональных особенностей, в т.ч. от характеристик работы регуляторных систем в ответ на различные внешние воздействия. Необходимость выявления внешних и внутренних факторов определила круг задач настоящего исследования.

Основной задачей исследования стало выявление случаев, в которых длительность кардиоцикла по ЭКГ и ФПГ будет различаться, а также поиск причин этих различий. Во-первых, необходимо было выяснить, при каком положении датчиков такое отличие будет минимальным. Во-вторых, важно было понять, какие свойства здоровых испытуемых-добровольцев влияют на величину отличия. В связи с этим, исследовали степень рассогласования длительности кардиоцикла по ЭКГ и ФПГ в зависимости от следующих факторов:

- места наложения датчика ФПГ;
- уровня возбуждения нервной системы и фокуса внимания первой сигнальной системы испытуемого;
- соотношения вклада симпатического и парасимпатического отделов в регуляцию функций организма (типа вегетативного реагирования);
- психофизиологических особенностей испытуемых.

Материалы и методы

Испытуемые. В исследовании принимали участие 34 добровольца в возрасте 18-57 лет. Все испытуемые были здоровы и не имели патологий сердечно-сосудистой и нервной систем.

Фиксация и обработка данных. Запись показателей производили отдельно для каждого испытуемого, во время которой он находился в сидячем положении, руки располагались на подлокотниках кресла. Запись ФПГ и ЭКГ осуществлялась одновременно. Для записи ФПГ и ЭКГ использовался психофизиологический телеметрический программно-аппаратный комплекс «РЕ-

АКОР». Обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы Microsoft Excel, пакетов SPSS и STATISTICA.

Запись ЭКГ осуществлялась в стандартном отведении, для этого электроды позиционировались на запястьях. Обработка записей ЭКГ производилась автоматически, путем оценки геометрических и статистических параметров [1]. Для анализа variability сердечного ритма по данным ЭКГ использовали спектральный анализ и метод вариационной пульсографии. В ходе спектрального анализа выявляли следующие показатели: показатель активности симпатического отдела вегетативной нервной системы (LF), связанный с расходом ресурсов организма, и индекс активации подкорковых центров (ИАП), на основе которого определяют степень включенности высших вегетативных центров в регуляцию автономных процессов. С помощью метода вариационной пульсографии вычисляли индекс напряжения (ИН), отражающий уровень напряжения регуляторных процессов организма.

Данные ФПГ одновременно фиксировали от 3-х участков поверхности тела: концевая фаланга указательного пальца левой руки, мочка левого уха, участок шеи с левой стороны. Это было необходимым условием выбора наилучшего отведения при записи ДПВ, который рассматривался нами в качестве аналога длительности RR-интервалов ЭКГ (рис. 1). Степень рассогласования между данными ФПГ и ЭКГ определяли как среднеквадратичное отклонение разности между значениями RR и ДПВ (SKORR-ДПВ, SKO).

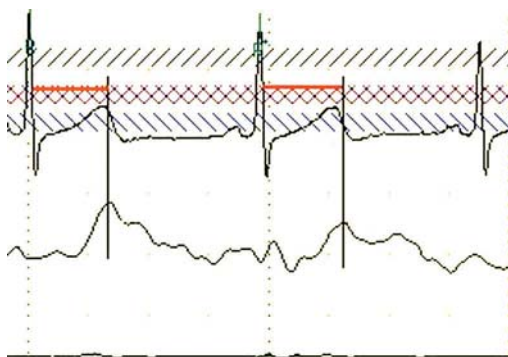


Рис. 1. Длительность RR интервала (вверху) и ДПВ (внизу). Красным цветом обозначена разница кардиоинтервалов по ЭКГ и ФПГ.

Ход эксперимента. С целью выявления степени рассогласования данных, полученных с помощью ФПГ и ЭКГ, в зависимости от уровня возбуждения ЦНС, запись ЭКГ и ФПГ осуществлялась в 4 этапа, среди которых был 1 предварительный и 3 основных. Предварительный этап записи данных проводился с целью стабилизации состояния испытуемого, в ходе которого предъявляли изображения природных ландшафтов и просили испытуемых расслабиться. В дальнейшем обрабатывали данные, полученные только в ходе основных этапов. Запись данных на каждом этапе продолжалась в течение 2 мин. Интервал между этапами, составляющий 10 с, использовали для предъявления инструкции.

На первом основном этапе осуществлялся базовый замер показателей ФПГ и ЭКГ. Для этого испытуемому давалась инструкция сидеть спокойно, не двигаться, а в это время в наушниках играла спокойная музыка. На втором основном этапе в наушники подавались неприятные звуки высокой интенсивности (крики людей, звук сирены, неприятные

шумы), которые создавали у испытуемого активацию и даже некомфортное состояние напряжения. На последнем этапе испытуемых просили расслабиться, для создания состояния релаксации на мониторе демонстрировали видеоряд с горными пейзажами, при этом в наушники подавалась спокойная музыка.

Таким образом, на 1-м и 3-м основных этапах поддерживали низкий уровень возбуждения нервной системы, сочетающийся с переориентацией фокуса внимания первой сигнальной системы внутрь [6]. Напротив, на втором этапе уровень возбуждения нервной системы повышался путем применения стимуляции и происходило направление фокуса внимания на внешние процессы.

Для выявления возможных психофизиологических особенностей испытуемых, связанных со СКО RR-ДПВ, использовали опросник структуры темперамента В.М. Русалова (ОСТ) и опросник выявления способов совладающего поведения Р.Лазаруса и С.Фолкмана (ССП). Опросник ОСТ, разработанный на основе авторской концепции темперамента, служит для диагностики темпераментальных особенностей человека, состоит из 105 вопросов [4]. Опросник СПП, используемый для определения способов преодоления трудностей (копинг-стратегий), включает 50 утверждений, каждое из которых отражает определенный способ поведения в трудной или проблемной ситуации. По результатам опросника определяется, насколько часто испытуемый использует ту или иную копинг-стратегию для преодоления сложных и проблемных ситуаций [8]. Эти опросники были выбраны на

основе данных о том, что показатели их шкал имеют значимые корреляции с показателями вегетативного реагирования [5].

Полученные данные анализировали с помощью корреляционного анализа, для расчета корреляций использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r), значимыми считали корреляции, для которых $p < 0,05$. Различия определяли с помощью парного критерия Вилкоксона (W) и Манна-Уитни (U), значимыми считали различия, для которых $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На основе зафиксированных данных СКО RR-ДПВ были вычислены по всем испытуемым, отдельно для каждого из трех отведений (палец, ухо и шея) и по каждому из трех основных этапов (табл. 1).

Таблица 1
Значения среднеквадратичных отклонений разности RR и ДПВ (мс) и их стандартных отклонений для всех испытуемых в разных отведениях и для разных этапов

Номер этапа	Отведение		
	Ухо	Палец	Артерия
1	23,3±25,7	105±38,3	109 ±40,1
2	20,1±17,0	110 ±33,6	114 ±35,8
3	17,9±16,0	105 ±34,3	111 ±36,8

Из табл. 1 видно, что по всем испытуемым наименьшим является СКО на ушном датчике, это характерно для всех этапов исследования. Этот факт свидетельствует о том, что из всех отведений ушной датчик фиксирует данные, имеющие минимальное расхождение с данными ЭКГ. То есть запись данных с этого датчика меньше всего подвержена

влиянию внешних факторов. Это можно связать со следующими физиологическими особенностями:

- в отличие от пальца, на ухе мускулатура редуцирована;
- на мочке уха отсутствует хрящевая ткань;
- пульсовая волна до ушного датчика доходит быстрее, чем до пальцевого, что обусловлено близостью к сердцу;
- шейный датчик дает большое количество артефактов, связанных с глотанием, дыханием, также при съеме показателей человеку приходится молчать, что обеспечивается только в экспериментальных условиях.

Кроме того, именно в отведении «ухо» наблюдается постепенное снижение значений СКО на протяжении основных этапов исследования, для которых характерен разный уровень активации и напряжения. Также из табл. 1 видно, что на этапе напряжения СКО по ушному датчику не является максимальным. По другим отведениям наибольшее увеличение СКО является характерным для второго этапа, на котором общее напряжением увеличивалось. Эти особенности говорят в пользу того, что СКО по ушному отведению не соответствует динамике уровня напряжения, а СКО по другим отведениям – прямо зависит от этих изменений. Однако в данном случае мы можем говорить только о тенденции, характерной для всех испытуемых, т.к. значимых различий между СКО разных этапов обнаружено не было.

Из табл. 1 видно, что стандартное отклонение СКО на ушном датчике вне зависимости от этапа является практи-

чески равным самому значению СКО, что указывает на неравномерность распределения значений СКО в данной выборке испытуемых. Для иллюстрации данного предположения была построена гистограмма значений СКО для ушного датчика (рис. 2). Из рис. 2 видно, что значения СКО распределены неравномерно и имеют выбросы, характерные для некоторых испытуемых и проявляющиеся на всех этапах исследования.

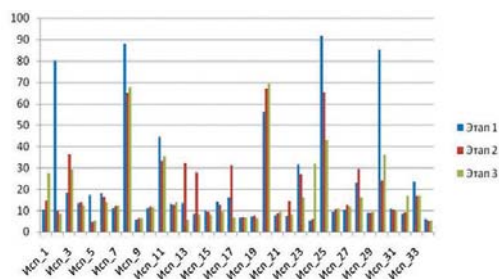


Рис. 2. Гистограмма значений СКО (RR-ДПВ) на ушном датчике для всех испытуемых. По горизонтали – порядковый номер испытуемого, по вертикали – величина СКО.

Исходя из того, что количество выбросов значений СКО и их величина не позволяют отнести их к погрешностям или ошибкам измерения, необходимо провести анализ и выяснить причины их возникновения. Данный вопрос представляет интерес в связи с тем, что на артериальном и пальцевом датчиках подобных выбросов в таком количестве и аналогичной амплитуды выявлено не было.

Для выявления возможных связей был проведен корреляционный анализ между значениями СКО на ушном электроде и показателями вегетативной динамики по данным ЭКГ, а также между значениями СКО в отведении «ухо» и значениями по шкалам опросников ОСТ

и ССП. В результате были выявлены следующие значимые корреляции:

- между СКО и шкалой «самоконтроль» опросника ССП на первом ($r=0,405$), втором ($r=0,411$) и третьем ($r=0,359$) этапе исследования. Это указывает на то, что рассогласование RR и ДПВ связано со склонностью испытуемых к целенаправленному поведению, которое состоит в подавлении активности, сдерживании своих эмоций и в стремлении к самообладанию;

- между СКО и LF на первом этапе исследования ($r=0,457$). Эта положительная связь указывает на то, что на первом этапе рассогласование RR и ДПВ определяется вкладом симпатического отдела вегетативной нервной системы;

- между СКО и ИАП на втором ($r=-0,458$) и третьем ($r=-0,369$) этапах. Это указывает на то, что рассогласование RR и ДПВ детерминируется отключением влияния высших вегетативных центров при регуляции автономных процессов на этапе напряжения и последующего расслабления;

- между СКО и ИН ($r=-0,427$) на первом этапе исследования. На этапе спокойного бодрствования рассогласование RR и ДПВ определяется отсутствием напряжения регуляторных процессов организма.

Наличие рассмотренных значимых положительных и отрицательных связей между СКО и показателями работы регуляторных механизмов позволяет говорить об интегративном характере СКО и его неоднородности для разных функциональных состояний. Кроме того, намечается определенная зависимость степени рассогласования RR и ДПВ с этапами исследования. На первом этапе СКО детерминируется вкладом симпа-

тического отдела при отсутствии напряжения регуляторных процессов. На втором и третьем этапе СКО определяется отключением высших вегетативных центров и участием произвольной регуляции и самоконтроля.

Для анализа выбросов значений (рис. 2) выборка была разделена на группы по тем показателям, с которыми были обнаружены значимые связи. Это было сделано с целью выяснения закономерностей изменения значений СКО в зависимости от динамики показателей физиологических и психофизиологических процессов. Деление на группы осуществлялось в зависимости от степени выраженности следующих показателей: склонности к произвольной регуляции поведения, вклада симпатической системы, напряжения регуляторных систем, активации подкорковых центров. Таким образом, по каждому показателю выборку делили на разные группы.

Для выявления связи между вариабельностью значений СКО RR-ДПВ и выраженностью склонности к использованию произвольных регуляторных процессов, определяемой по шкале «самоконтроль», всех испытуемых разделили на 2 группы (табл. 2). В первую группу вошли 15 испытуемых с высокой выраженностью склонностей к целенаправленной саморегуляции (13-18 баллов), во вторую – 19 испытуемых с низкой выраженностью данного свойства (5-12 баллов).

Из табл. 2 видно, что СКО RR-ДПВ на ушном датчике на всех этапах в первой группе выше, чем во второй. Это говорит о том, что люди с высоким уровнем сознательного контроля отличаются от испытуемых с низким уровнем самоконтроля большими значениями рассогласования RR-ДПВ.

Таблица 2

Значения среднеквадратичных отклонений разности RR и ДПВ(мс) в отведении «ухо» и их стандартных отклонений для двух групп испытуемых с разной выраженностью по шкале «самоконтроль» для разных этапов исследования

Номер этапа	Группа	
	1	2
1	30,3±31,2	14,3±12,6
2	22,6±18,0	16,7±15,8
3	19±16,3	16,2±16,6

Группы также отличаются особенностями динамики СКО в зависимости от этапа исследования. Для испытуемых первой группы характерно постепенное снижение рассогласования в процессе последовательного перехода от одного этапа к другому. Представители второй группы демонстрируют другую картину: у них наблюдается низкий уровень СКО на начальном этапе, его дальнейшее увеличение в период напряжения и незначительное снижение при переходе к спокойному состоянию. Это позволяет предположить, что психофизиологические особенности, связанные со способностью

к произвольной регуляции, увеличивают степень рассогласования RR-ДПВ. Однако требуются дополнительные исследования на большей выборке, т.к. значимых различий (W) между показателями СКО в группах с разным уровнем склонности к самоконтролю обнаружено не было.

Для анализа связей СКО RR-ДПВ со степенью таких показателей физиологических процессов как вклад симпатического компонента вегетативной регуляции (LF), уровень напряжения регуляторных систем (ИН) и уровень активации подкорковых центров (ИАП) всех испытуемых разделили на группы по степени выраженности определенного показателя. В первую группу вошли добровольцы с высокими значениями по всем трем показателям, во вторую группу – испытуемые со средними значениями и в третью – испытуемые с низкими значениями данных показателей (табл. 3).

Степень выраженности вклада симпатического компонента вегетативной регуляции определяли на основе значений показателя LF: высокая степень выраженности симпатического влияния считалась для LF более 1500, средняя

Таблица 3

Номер этапа	Группа	Показатели		
		LF	ИН	ИАП
1	1	34,6±30,1	13,6±16,1	25,3±30,6
	2	22,3±26,8	22,3±25,3	16,5±15,8
	3	17,4±21,8	30,3±30,1	26±27,8
2	1	24,3±18,4	18±19,6	11,7±5,7
	2	22±18,4	21,3±18,1	20,5±20
	3	16,4±15,8	20,2±15,7	25,2±18,9
3	1	22,3±19,4	21,3±20,1	14,8±10,7
	2	14,2±11,5	13,7±12,9	16,2±20,3
	3	17,2±16,9	18,7±16,3	20,7±17,1

выраженность – для LF в пределах от 500 до 1500 и низкая степень выраженности – для LF менее 500. Разделение на группы испытуемых с разной степенью выраженности вклада симпатической системы представлено в третьем столбце табл. 3.

Значения среднеквадратичных отклонений разности RR и ДПВ (мс) в отведении «ухо» и их стандартных отклонений для групп испытуемых с разной выраженностью вклада симпатической системы (LF), напряжения регуляторных систем (ИН), активации подкорковых центров (ИАП) для разных этапов исследования.

Анализ показателей СКО, представленных в третьем столбце табл. 3, показал, что на каждом этапе в группе с высоким симпатическим тонусом обнаруживаются более высокие значения СКО, чем в двух других группах. Однако значимых различий (U) между группами обнаружено не было в виду малой численности испытуемых.

Кроме того, замечено, что у испытуемых с разным уровнем симпатического влияния наблюдается разная динамика СКО при переходе от одного этапа исследования к другому. Так, для группы с высоким уровнем симпатического влияния наблюдается постепенное снижение СКО при смене функционального состояния. Для испытуемых со средним уровнем симпатического вклада характерны одинаковые значения СКО на первом и втором этапе и их снижение на третьем этапе. Испытуемые с низкими значениями вклада симпатической системы характеризуются практически одинаковыми значениями СКО на всех этапах исследования.

Уровень напряжения регуляторных систем организма (ИН) связан с СКО

RR-ДПВ отрицательной связью. Для выявления вклада данной связи в вариабельность рассогласования длительности кардиоинтервалов по данным ЭКГ и ФПГ выборка была разделена на группы по степени выраженности уровня напряжения, которую определяли на основе значений показателя ИН (четвертый столбец табл. 3). В первую группу вошли испытуемые с высоким уровнем напряжения регуляторных систем, значения ИН которых составили более 200, вторая группа была сформирована испытуемыми со средним уровнем напряжения (значение ИН – от 100 до 200) и третья группа состояла из испытуемых с низким уровнем напряжения, для которых характерными были значения ИН менее 100.

Уровень напряжения регуляторных систем характеризуется разной динамикой в каждой из трех выделенных групп. Для группы с высоким уровнем напряжения наблюдается постепенное снижение значений СКО на протяжении трех этапов, что говорит о независимости степени рассогласования от функционального состояния. Испытуемые второй и третьей группы демонстрируют постепенное снижение ИН по мере перехода от одного этапа к другому. Разница между второй и третьей группой состоит в величине снижения. Для второй группы характерно большее снижение значения ИН при переходе из состояния напряжения к состоянию покоя, а для третьей группы – более значительным является переход от покоя к напряжению.

Группы формировали на основе разного уровня активации подкорковых центров, который определяли по показателю ИАП. В группу с высоким уровнем вошли испытуемые, у которых значение показателя ИАП было больше 1; во вто-

рую группу со средним уровнем активации вошли испытуемые со значением ИАП от 1 до 0,5; а третья группа было сформированна испытуемыми с низким уровнем активации подкорковых структур, для них ИАП составило менее 0,5. Данные динамики СКО для ИАП показаны в пятом столбце табл. 3.

В трех группах, выделенных по показателю ИАП, наблюдается различная динамика СКО в зависимости от этапа исследования. Испытуемые первой группы демонстрируют резкое снижение рассогласования (более чем в 2 раза) при переходе из спокойного состояния в состояние напряжения, и далее наблюдается небольшое увеличение СКО RR-ДПВ. Вторая группа характеризуется увеличением СКО в состоянии напряжения, а для состояния покоя до и после напряжения характерен одинаковый уровень рассогласования. Испытуемые третьей группы демонстрируют постепенное снижение СКО при последовательном переходе от стадии к стадии.

На основе проведенного анализа отдельно по каждому из показателей физиологических процессов можно говорить о том, что динамика СКО RR-ДПВ зависит от особенностей вегетативной регуляции. Тенденция увеличения СКО в группе с высоким симпатическим вкладом указывает на то, что высокий симпатический тонус связан с преимущественной регуляцией сердечной активности, но не сосудистой. Следовательно, больший вклад симпатической системы в общую регуляцию является фактором увеличения рассогласования RR-ДПВ. В то же время, низкое напряжение между симпатической и парасимпатической системами, которое обеспечивается низким напряжением подкорковых систем,

также приводит к большему рассогласованию между RR и ДПВ. Следовательно, снижение СКО RR-ДПВ может обеспечиваться высоким напряжением подкорковых центров вегетативной регуляции на фоне среднего или низкого влияния симпатической системы.

Можно также говорить о том, что уменьшение рассогласования между RR и ДПВ не зависит от функционального состояния, а, скорее, от общего времени пребывания в экспериментальной ситуации: чем дольше пребывания, тем ниже СКО RR-ДПВ. Значения рассогласования длительности кардиоинтервалов уменьшаются или увеличиваются независимо от динамики функционального состояния. И только для показателя напряжения подкорковых систем были обнаружены закономерные изменения СКО в зависимости от функционального состояния. При высоком напряжении подкорковых систем наблюдается снижение СКО в состоянии напряжения, а при среднем напряжении подкорки – увеличение рассогласования между RR и ДПВ по сравнению с состоянием покоя и до, и после напряжения.

Выводы

1. Наименьшие значения рассогласования между данными ЭКГ и ФПГ по всем испытуемым были обнаружены для ушного отведения. Наилучший результат фиксации данных ФПГ от ушного датчика связан с тем, что по сравнению с пальцевым датчиком он находится ближе к сердцу, на мочке уха отсутствует выраженная хрящевая ткань. В отличие от артериального датчика, на «ухе» не наблюдается выраженных артефактов, связанных с глотанием, дыханием и речевой деятельностью.

2. В работе были рассмотрены факторы, влияющие на расхождение в длительности кардиоинтервалов по ЭКГ и ФПГ. Однозначного критерия для выделения групп с высокими показателями расхождения выявить не удалось. Однако на уровне тенденции было показано, что рассогласование между данными ЭКГ и ФПГ увеличивается в зависимости от следующих факторов: высокого уровня произвольного самоконтроля, высокого вклада симпатической системы, низкого уровня напряжения симпатической и парасимпатической системы, низкого уровня напряжения подкорковых вегетативных центров.

3. В целом, по всем испытуемым было выявлено, что величина рассогласования данных ЭКГ и ФПГ уменьшается в зависимости от этапа исследования и не зависит от функционального состояния.

Список литературы

1. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем: метод. рекомендации / Р. М. Баевский [и др.]. - М., 2002.
2. *Малиновский Е.Л.* Оптимизация режимов физиотерапевтических процедур с использованием методики пальцевой фотоплетизмографии (http://www.tokranmed.ru/litra/optiphtherapy_1.htm).
3. *Малиновский Е.Л.* Учебно-методическое пособие по использованию пальцевой фотоплетизмографии (<http://www.tokranmed.ru/metod/fpg.htm>).
4. *Русалов В.М.* Опросник структуры темперамента. - М.: Наука, 1990.
5. *Усенко А.Б., Кузьмина К.А.* Вегетативный баланс как природная предпосылка процессов психической саморегуляции [Электронный ресурс] // Психологические исследования: электрон. науч. журн. – 2011. – № 3(17).
6. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Трехмерная векторная модель функционального состояния нервной системы как теоретическая основа для диагностики состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной нейростимуляции // Биомедицина. – 2013. – № 3. – С. 18-25.
7. *Шурыгин И.А.* Мониторинг дыхания: пульсоксиметрия, капнография, оксиметрия. – М.: БИНОМ, 2000.
8. *Lazarus R.S., Folkman S.* Stress, appraisal and coping. – New York: Springer, 1984.

The study of errors photoplethysmogram data for the analysis of heart rate variability by the method of R.M. Baevsky

M.I. Strigina, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina

This article focuses on the applicability of photoplethysmogram for analysis of heart rate variability. Differences in cardiocycles variability on EEG and PPG were determined experimentally. There is dependence of heart rate variability on the functional status and psychological characteristics of subjects.

Key words: heart rate variability, photoplethysmographic, electrocardiography, state of the nervous system, psychophysiological characteristics.

Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств

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

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

Контактная информация: Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Представлены статистические характеристики биологической модели острой гипобарической гипоксии на мелких лабораторных животных. Показано, что время жизни животных на критической высоте не подчиняется закономерностям нормального распределения и не может в полной мере отражать потребности фармакологии для оценки нейропротекторной и антигипоксической активности лекарственных средств. Высотный порог и бальная оценка индивидуальной устойчивости к гипоксии являются более адекватными (по статистическим характеристикам) маркерами устойчивости к гипоксии у биомоделей.

Ключевые слова: гипоксия, биологическое моделирование, антигипоксическая активность, статистические характеристики распределения.

Гипоксия как типовой патогенетический процесс, присущий основной массе заболеваний и патологических состояний человека, издавна является объектом научного изучения. Нейропротекторная и антигипоксическая активность лекарственных средств являются базовыми свойствами для широкой группы лекарственных средств (ноотропов, антигипоксантов, антиоксидантов, блокаторов кальциевых каналов, цитопротекторов, актопротекторов, транквилизаторов, регуляторных пептидов и многих других). В связи с этим важное значение приобретает возможность корректной экстраполяции результатов различных

серий экспериментальных исследований на лабораторных животных, их популяционный перенос, возможность прямого сопоставления друг с другом, прогнозирование активности лекарственных средств с антигипоксическим действием у человека [1]. Статистически корректно это можно сделать, если анализируемые параметры состояния животных подчиняются закономерностям нормального распределения и исследуемая выборка может быть соотнесена с генеральной совокупностью животных (популяционный перенос). В то же время, сама по себе экстремальная гипоксия является тем дополнительно действующим

фактором, влияние которого отклоняет статистические характеристики маркерных функциональных показателей от нормального статистического распределения. Возникающий при этом методологический конфликт для своего устранения требует разработки специализированных биологических моделей для исследования экстремальной гипоксии и приводимых к нормальному статистическому распределению параметров оценки устойчивости животных к этому экстремальному фактору.

В публикуемой в этом номере журнала статье «Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии» [4] нами было показано, что при создании биологических моделей экстремальной гипоксии у лабораторных животных необходимо формирование как минимум моделей двух типов:

- биологической модели с пониженной резистентностью нервной ткани к энергодефициту, не компенсируемому напряжением кислородтранспортной системы организма.
- биологической модели с проявлениями исходного напряжения и истощения регуляторных и энергопродуцирующих механизмов внецентральной локализации (нарушения функции печени, легких, сердца, кровеносных тканей, иммунитета).

Создание биологических моделей первого типа возможно путем направленной селекции низко устойчивой к

гипоксии части популяции мелких лабораторных животных (выведение и поддержание специальных линий). Исходно сниженная резистентность нервной ткани к энергодефициту у животных специальных линий делает их интересными моделями не только для испытания классических антигипоксантов, но и фармакомоделирования процессов восстановления после черепно-мозговых травм, острых или хронических нарушений мозгового кровообращения, нейроинфекций и нейроинтоксикаций, оперативных вмешательств на ЦНС, критической гипертермии (тепловые и солнечные удары).

В фармакологических исследованиях на низко устойчивых к гипоксии линиях животных должны изучаться препараты с антигипоксическим, антиоксидантным, ноотропным, противоастеническим, нейропротекторным действием, а также средства повышения физической работоспособности.

Второй подход, связанный со снижением резистентности к гипоксии при избыточном напряжении и истощении регуляторных и энергопродуцирующих механизмов, может быть использован для подтверждения адекватности биологического моделирования патологических процессов (например, бронхообструктивных заболеваний, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, гепатитов, аутоиммунных поражений, радиационных поражений, поражений экотоксикантами). Проведение тестирования биологических моделей на индивидуальную устойчивость к гипоксическому воздействию до и после применения средств лечебно-профилактического или реабилитационного действия позволит объективизировать динамику патогене-

за (или саногенеза) и более качественно оценить эффективность новых лекарственных средств или новых медицинских технологий (включая клеточные технологии). В исследованиях, проводимых в рамках этого направления, целесообразно использовать линии лабораторных животных с высокой резистентностью к гипоксии, чтобы исключить влияние фактора низкой индивидуальной гипоксической устойчивости на результат последующего тестирования.

В исследованиях на 10 линиях инбредных мышей коллекционного фонда НЦБМТ[3] было показано, что по генетически детерминированной устойчивости к гипоксическому воздействию линии мышей могут быть разделены на три группы: с низкой (IOR/HabY, CC57WY, CBA/LacY, 101/HY), средней (C3HAY, CBA/JY) и высокой (A/SnY, B10CWY, C57BL/6Y, DBA/2Y) устойчивостью к гипоксии. Однако исследуемый признак (устойчивость к гипоксии по критерию времени жизни на критической высоте) обладает высокой вариабельностью как между животными разных линий, так и между особями внутри каждой линии (коэффициент вариации от 20 до 50%).

Для оценки антигипоксической активности лекарственных средств традиционно используется два подхода: оценка влияния препарата на среднегрупповые показатели индивидуальной гипоксической устойчивости, а также сдвиг в популяционной структуре устойчивости (изменение долей низко- средне- и высокоустойчивых животных). Как правило, первый подход используется для оценки однократного применения препарата, второй – курсового применения лекарственных средств.

Достаточно проблемным видится и выбор адекватного показателя гипоксической устойчивости животных. В высотной физиологии таких показателей несколько: высотный порог, время жизни (для человека аналогом является резервное время пребывания на высоте до потери сознания), время поддержания позы (для человека аналогом является времясохранения деятельности). Дополнительным критерием устойчивости к гипоксии является стойкость гипоксических изменений в постгипоксическом периоде, которые отражаются таким показателем, как время восстановления позы животного при спуске с высоты.

Целью настоящего исследования было изучение закономерностей статистического распределения различных показателей гипоксической устойчивости лабораторных животных – крыс различных линий, в том числе – при использовании лекарственных средств с нейропротекторным и антигипоксическим действием.

При исследовании высотного порога лабораторные животные (крысы) поднимались в барокамере со скоростью 165 м/с до начальной площадки 9000 м (пороговая величина устойчивости для животных с наличием заболеваний или постоперационных состояний), пребывали на этой высоте 5 минут (300 секунд), и вновь поднимались со скоростью 165 м/с до следующей площадки на 1000 м выше, и так далее до фиксации у животного агонального дыхания. Высота, на площадке которой было зафиксировано агональное дыхание, и является индивидуальным высотным порогом для данного животного. Однако, полученные таким образом данные являются дискретными, степень повы-

шения порога – 1000 м, они не учитывают фактическое время жизни животных на пороговой высоте. Для перевода дискретной шкалы в непрерывную могут быть использованы 2 подхода: присвоение каждому временному промежутку (например, 100 секунд) пребывания на высоте балла (табл. 1) или использование дробной высотной шкалы, при которой целая часть равна высоте площадки в километрах, а дробная часть равна отношению длительности жизни на этой высоте в секундах к длительности площадки.

Таблица 1
Балльная оценка устойчивости к гипоксии по критерию высотного порога для крыс

Высота	Время жизни, секунды		
	100	200	300
9000	1	2	3
10000	4	5	6
11000	7	8	9
12000	10	11	12
13000	13	14	15
14000	16	17	18
15000	19	20	21

Например, крыса прожила на площадке 13000 м 120 секунд при длительность площадки 300 секунд. Тогда высотный порог животного будет равен 13,4 км, а его устойчивость к гипоксии по высотному порогу будет равна 14 баллам. По граничному времени площадки на соответствующей высоте может быть оценена выживаемость животных как показатель популяционной устойчивости к гипоксии данного уровня (рис. 1).

Проведенный дисперсионный анализ показал, что на значения высотного порога не оказывают существенного влияния факторы линейности животных

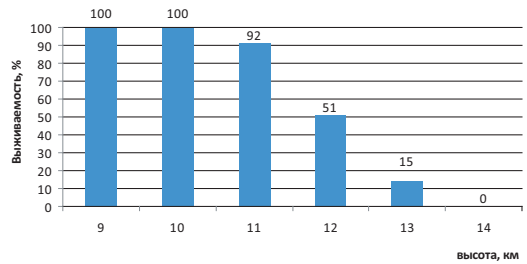


Рис. 1. Выживаемость крыс (площадка 300 секунд) на различных высотах.

(нелинейные, линии WAG, Wistar, коэффициент детерминации модели $D=0,03$, $r=0,33$) и их пола (самки, самцы, коэффициент детерминации модели $D=0,06$, $r=0,29$).

Статистические характеристики высотного порога для крыс представлены в табл. 2. Обращает на себя внимание, что статистические характеристики высотного порога для животных соответствуют основным требованиям нормального распределения (среднее значение, мода и медиана распределения близки друг другу, параметры эксцесса и асимметрии в пределах нормативных значений). Представленная на рис. 2 частотная кривая распределения значений показателя высотного порога подтверждает соответствие этого параметра нормальному статистическому распределению. Следовательно, результаты, полученные при исследовании гипоксической устойчивости крыс по критерию высотного порога, могут быть соотнесены с генеральной совокупностью животных, для них возможно прямое соотнесение результатов различных серий исследований, в том числе при исследованиях антигипоксической активности лекарственных средств. Статистическая обработка этого показателя любыми методами, в том числе – пара-

метрическими, является корректной. Для высотного порога характерна низкая вариативность показателя (коэффициент вариации 5%), что отражает популяционную стабильность показателя.

Таблица 2
**Статистические параметры
распределения значений высотного
порога для крыс**

Статистический параметр	Значение
Среднее, км	12,78718
Стандартная ошибка, км	0,076846
Медиана, км	13
Мода, км	13
Стандартное отклонение, км	0,678685
Дисперсия выборки, км	0,460613
Эксцесс	-0,62224
Асимметричность	-0,01619
Интервал, км	2,9
Минимум, км	11,3
Максимум, км	14,2
Коэффициент вариации	0,053075
Счет	78

Исходя из критериев S-образного шкалирования, границами диапазонов устойчивости к гипоксии являются точки перегиба кумулятивной кривой. Следовательно, животные, высотный порог которых менее 12 км, будут относиться к низко устойчивым к гипоксии, от 12 до 13,5 км – к среднеустойчивым, более 13,5 км – высоко устойчивым животным. Для популяции здоровых крыс структура высотной устойчивости будет иметь следующий вид: до 10% крыс будут иметь низкую устойчивость, около 15% - высокую, остальные 75% - среднюю устойчивость к гипоксии.

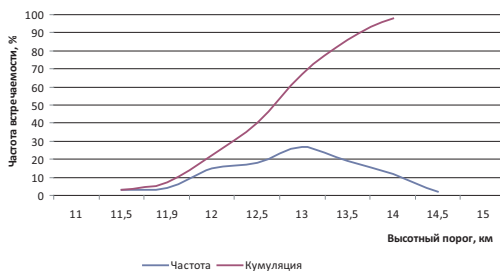


Рис. 2. Частотные кривые распределения значений высотного порога.

При исследовании антигипоксической активности лекарственных средств в случае высокой антигипоксической активности должно отмечаться повышение высотного порога и увеличение доли высокоустойчивых животных при снижении доли низко устойчивых. При умеренной антигипоксической активности могут или умеренно повышаться среднегрупповые значения высотного порога, или незначительно меняться соотношения между подгруппами животных по уровню устойчивости к гипоксии.

Для проверки этого предположения была выполнена оценка влияния на крыс внутрибрюшинного введения ноотропного препарата пираретама в дозе 120 мг/кг, для которого антигипоксическая активность давно известна и прямо вытекает из молекулярных механизмов его действия [2]. Полученные результаты выявили у пираретама в исследованной дозе умеренную антигипоксическую активность, которая проявилась в повышении среднегруппового значения высотного порога с 12,8 до 13,2 км (103% от контроля), повышении доли высокоустойчивых животных с 14 до 29% при практически не измененной доле низкоустойчивых животных (изменение с 7 до 5%, не достоверно). Бальная оценка высотной устойчивости живот-

ных изменилась с 12,22 до 13,65 баллов (112%). Таким образом, умеренное антигипоксическое действие парацетама проявляется на среднеустойчивой к гипоксии группе и ведет к перераспределению 15% животных из среднеустойчивых в высокоустойчивую группу. Более низкая доза парацетама (100 мг/кг) при однократном введении не оказали влияния на высотный порог у крыс.

Второй подход к оценке индивидуальной устойчивости животных к экстремальной гипоксии связан с комплексным учетом основных показателей: время жизни (ВЖ), время поддержания позы (ВПП), время восстановления позы (ВВП), фиксируемых при барокамерном подъеме животных на критическую высоту (для крыс – 11500 м).

Контрольная группа характеризовалась следующими значениями показателей (табл. 3). Особенности статистического распределения показателей (частотный анализ) представлены на рис. 3.

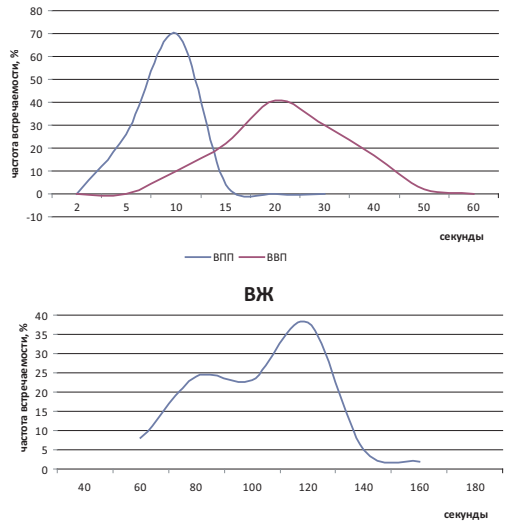


Рис. 3. Кривые частотного распределения значений показателей индивидуальной устойчивости животных к гипоксии.

Анализ рис. 3 показывает, что применяемое гипоксическое воздействие является экстремальным. Об этом свидетельствуют резкий обрыв значений времени первого падения и времени

Таблица 3

Статистические характеристики чувствительности к гипоксии животных контрольной группы

Статистический параметр	ВПП	ВЖ	ВВП
Среднее	8,90625	95,55208	23,17708
Стандартная ошибка	0,258656	2,64056	0,919214
Медиана	10	95	20
Мода	10	110	20
Стандартное отклонение	2,534304	25,8721	9,006424
Дисперсия выборки	6,422697	669,3657	81,11568
Эксцесс	0,010361	3,047795	-0,3459
Асимметричность	-0,32845	0,734026	0,244251
Интервал	10	170	45
Минимум	5	40	0
Максимум	15	210	45
Коэффициент вариации	0,284553	0,270764	0,388592
Счет	96	96	96

жизни животных в области более высоких значений, характеризующих устойчивость животных, дополнительный локальный максимум на кривой времени жизни в области низких значений. Асимметрия распределения времени восстановления позы в сторону более высоких значений, также отражающая низкую гипоксическую устойчивость.

Так как кривые распределения этих показателей (ВПП, ВЖ, ВВП) далеки от кривой нормального распределения, обычные статистические методы обработки результатов (оценка достоверности различий, корреляционный, регрессионный и мультифакторный анализы) к этим показателям не могут быть применены. В связи с этим для статистической обработки результатов исследований в условиях гипоксического воздействия нами были использованы методы дисперсионного факторного анализа и ранговой корреляции по Спирмену, не зависящие от вида статистического распределения анализируемых показателей. Матрица корреляционных связей между этими показателями у контрольных животных в условиях гипоксии представлена в табл. 4.

Таблица 4

Матрица корреляционных связей показателей устойчивости к гипоксическому воздействию

N=96	ВПП	ВЖ	ВВП
ВПП	1		
ВЖ	-0,07337	1	
ВВП	0,027022	0,090422	1

Корреляционный анализ показывает, что параметры устойчивости животных к гипоксическому воздействию (ВПП, ВЖ, ВВП) являются не зависимыми

друг от друга. Для оценки индивидуального уровня гипоксической устойчивости может быть использован балльный метод шкалирования, основанный на характеристиках кривых распределения анализируемых параметров (табл. 5). С учетом того, что традиционно значимость времени жизни оценивается исследователями выше (а многие вообще не учитывают остальные показатели), для этого показателя вводится весовой коэффициент 2. Оценка индивидуальной устойчивости животных к гипоксии проводится путем присвоения баллов экспериментально полученным данным с учетом весовых коэффициентов и их суммирования.

Частотная кривая распределения интегрального показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии (ИУГ) представлена на рис. 4.

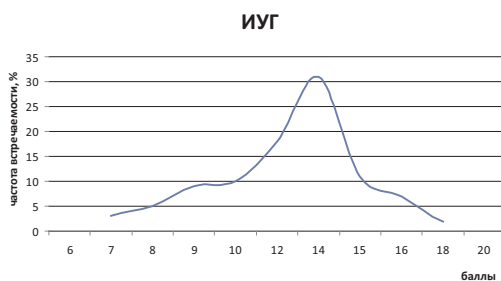


Рис. 4. Частотное распределение значений показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии животных без применения средств фармакологической коррекции.

Анализ рис. 4 показывает, что частотная кривая распределения значений показателя ИУГ близка к кривой нормального распределения, и, следовательно, этот показатель может быть использован как интегральный показатель устойчивости лабораторных животных к гипобарической гипоксии. При этом точки перегиба частотной кривой позволяют статисти-

Таблица 5
Балльные шкалы оценки показателей индивидуальной гипоксической устойчивости лабораторных животных

Показатель	Баллы					Весовой коэффициент
	1	2	3	4	5	
ВПП, с	До 5	6-9	10	11-14	15 и более	1
ВЖ, с	До 60	61-80	81-100	101-120	121 и более	2
ВВП, с	41 и более	31-40	21-30	11-20	10 и менее	1

чески корректно произвести распределение животных на подгруппы по уровню устойчивости к гипоксии: до 9 баллов включительно – низкая устойчивость к гипоксии (17% наблюдений), от 10 до 14 баллов включительно – средняя устойчивость к гипоксии (63% наблюдений), 15 и более баллов – повышенная устойчивость к гипоксии (20% наблюдений).

В условиях фармакологической коррекции значения показателей ВПП и ВВП в основном не выходят за пределы диапазонов, указанных в таблице 5. В отдельных случаях ВПП может превышать 60 секунд, а ВВП практически быть равным нулю. В таких случаях показатели получают оценку в 10 баллов. Показатель времени жизни на высоте 11500 мв условиях фармакологической коррекции увеличивается до 500 и более секунд (рис.5).

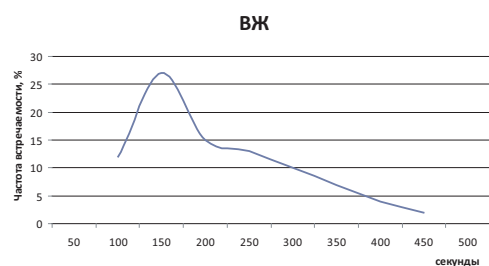


Рис. 5. Частотная кривая распределения показателя «Время жизни на высоте» для лабораторных животных в условиях фармакологической коррекции гипоксии.

Анализ рисунка показывает, что левые (начальные и центральные участки кривой, до 160 с) соответствуют закономерностям нормального распределения, а правые участки (более 160 с) представляют собой отрезок монотонного равномерного снижения. Для этого участка необходимо предусмотреть дополнительную балльную шкалу оценки времени жизни на высоте в условиях фармакологической коррекции:

От 161 до 200 секунд – 6 баллов, от 201 до 300 секунд – 7 баллов, от 301 до 350 секунд – 8 баллов, от 351 до 400 секунд – 9 баллов, более 400 с – 10 баллов.

Таблица 6
Влияние пирацетама на показатели индивидуальной устойчивости животных к гипоксии

Показатель	Контроль	Пирацетам
Время поддержания позы, с	8,9 ± 0,3	12,7 ± 0,8
Время жизни на высоте, с	96 ± 3	252 ± 34 (263% от контроля)
Время восстановления позы, с	23 ± 1	21 ± 10
Индивидуальная устойчивость к гипоксии, баллы	12,2 ± 0,3	24,9 ± 2,1 (204% от контроля)

В соответствии с разработанными шкалами балльных оценок были обработаны значения, полученные при тестировании индивидуальной устойчивости к гипоксии крыс при внутрибрюшинном введении парацетама в дозе 120 мг/кг (табл. 6).

Заключение

Статистический анализ показателей, отражающих различные подходы к оценке индивидуальной чувствительности лабораторных животных к острой гипобарической гипоксии, показал, что оценка высотного порога переносимости гипоксии и комплексная оценка индивидуальной устойчивости к гипоксии с нормированием по предложенным балльным шкалам приближаются по параметрам к нормальному распределению и являются предпочтительными (по сравнению с временем жизни животных на критической высоте) в исследованиях с применением фармакологических средств с нейропротекторным и антигипоксическим действием.

Список литературы

1. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д. Лукьяновой. М. 1990. 18 с.
2. *Новиков В.В., Шустов Е.Б., Горанчук В.В.* Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. СПб: Наука. 1998. 544 с.
3. *Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Казакова Л.Х., Бескова Т.Б., Лушниковая З.С., Егорова И.Ю., Матвеев Е.Л.* Межлинейные различия в чувствительности к острой гипобарической гипоксии у инбредных мышей коллекционного фонда // Биомедицина. 2013. №1. С. 78-82.
4. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Гананольский В.П., Ржепецкая М.К.* Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии // Биомедицина. 2013. №4.

Analysis of individual tolerance parameters of laboratory animals to hypoxia in biological modeling neuroprotective and antihypoxant action of medicines

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

Presents the statistical characteristics of the biological model of acute hypobaric hypoxia in small laboratory animals. It is shown that the lifetime of the animals at a critical height does not obey the laws of the normal distribution and do not fully reflect the needs of pharmacology for the evaluation of the neuroprotective and antihypoxant activity of medicines. High-altitude threshold and a points-based assessment of individual resistance to hypoxia are more adequate (according to the statistical characteristics) markers of resistance to hypoxia of biomodels.

Key words: hypoxia, biological modeling, antihypoxant activity, statistical characteristics of the distribution.



Создание лабораторных животных СПФ-статуса как основа экспериментальной медицины

Л.А. Болотских, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов,
Н.В. Касинская, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, Е.Л. Матвеевко

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

*Контактная информация: к.с.-х.н. Болотских Любовь Александровна,
тел.: 8(495) 561-52-57*

Отработанная технология получения и выращивания лабораторных животных может быть рекомендована питомникам и вивариям научных учреждений для производства качественных, здоровых животных, свободных от патогенной микрофлоры, т.е. животных СПФ-статуса.

Ключевые слова: СПФ-животные, изоляторная система, гнотобиологические методы.

Качество лабораторных животных, технология их производства и организация биомедицинского эксперимента на всей территории Российской Федерации существенно отстает от мирового уровня. Основная причина отставания заключается в степени приоритета науки о лабораторных животных в создании широкой научной общественности нашей страны. Поэтому основная наша задача – это консолидация усилий, направленных на создание современной технологии воспроизводства стандартных лабораторных животных и организация на них биомедицинских экспериментов на уровне мировых требований [1].

Получение надежных и воспроизводимых результатов медико-биоло-

гического эксперимента достигается лишь на лабораторных животных, свободных от патогенной микрофлоры, т.е. на животных СПФ-категории. В соответствии с международным опытом стандартизация лабораторных животных обеспечивается современной технологией, в основе которой лежит гнотобиотехнология [2, 3]. Создание СПФ-животных была и остаётся одной из задач нашего научного центра [4, 5, 6]. Работа проводилась в комплексе как с отечественными, так и зарубежными предприятиями.

Цель работы: перевод конвенциональных лабораторных животных в СПФ-статус с использованием гнотобиологических методов.

Материалы и методы

Работа проводилась с конвенционными мышами коллекционного фонда ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Очистка мышей коллекционного фонда от патогенной микрофлоры проводилась усовершенствованным методом гистерэктомии. Животные получали стерильный гранулированный корм и белково-витаминную добавку. В работе использовали новое зарубежное и отечественное оборудование: изоляторная система «RAIR Isosistem», английский гнотобиологический изолятор «TCOL»; ламинар – С-1, 2; стерилизатор воздушный ГП-640-ПЗ; паровой стерилизатор ЛАС-6065sp и т.д. Зарубежное оборудование было закуплено в 2008-2010 гг. специально для воспроизводства СПФ-животных.

В создании коллекционного фонда мышей СПФ-статуса строго соблюдали гнотобиологическую технологию, которая включает и комплекс методологических приемов, направленных на получение и поддержание СПФ-категорий животных. Основной гнотобиологической аппаратуры в данном случае была приобретённая зарубежная изоляторная система «RAIR Isosistem», состоящая из 144 микроизоляторов.

Данная изоляторная система содержания лабораторных животных обеспечивает защиту не только самих лабораторных животных, но и обслуживающего их персонала. Специальные воздушные клапаны создают комфортную температуру и влажность для животных, снижают контакт обслуживающего персонала с животными, очищают воздух помещений от аллергенных частиц кожи и шерсти животных, существенно снижают запах в помещении,

что улучшает условия работы персонала. В течение часа воздух в клетке обменивается до 50 раз, при этом система обеспечивает его подачу в клетку без сквозняков. При полном отключении микроизолятора от системы воздухоподдачи СПФ-статус животных сохраняется до 4 часов за счет специального фильтра, размещаемого в крышке изолятора, что позволяет не только переносить клетки в пределах одного учреждения, но и перевозить их на значительное расстояние. Специальные датчики постоянно следят за состоянием микроизолятора, отображая его условия на табло, что существенно упрощает процесс. Обслуживание микроизоляторов производится по стандартным операционным процедурам, как правило, не вызывающим существенных затруднений в работе.

Установка и подготовка изоляторной системы к работе. Для установки изоляторной системы не требуется специального помещения. В данном случае был отремонтирован модуль для лабораторных животных, где были размещены две зоны: «грязная» и «чистая». В «грязной» зоне установили стерилизующее оборудование: автоклав, воздушные стерилизаторы и т.д. (рис.1), в «чистой» зоне в комнатах разместили изоляторные системы (рис.2, 3).

Монтаж и первичная подготовка изоляторной системы к работе была произведена фирмой изготовителем. Также фирма-изготовитель обеспечила обучение обслуживающего персонала основным навыкам работы. После первичного подключения работа обслуживающего персонала должна быть направлена на подготовку каждой клетки к работе, как обычного гнотобиологического изолятора. Клетки, после тщатель-



Рис. 1. «Грязная» зона.



Рис. 2. «Чистая» зона.



Рис. 4. Микроизолятор.



Рис. 3. Изоляторные системы «RAIR Isosistem».



Рис. 5. Операционная.



Рис. 6. операция гистерэктомии.



Рис. 7. Основные племенные ядра мышей СПФ-статуса.

ной мойки в дезрастворе, стерилизуют в воздушном стерилизаторе. В стерильные клетки микроизоляторы проводят всё необходимое для жизнеобеспечения животных: стерильные опилки, корм, воду и т.д. Всю работу с данной клеткой проводят в ламинаре. Заселение животными также производят при стерильном потоке воздуха в ламинаре.

Методы стерилизации. Стерилизацию проводили в автоклаве и воздушном стерилизаторе ГП-640-ПЗ. Для новых микроизоляторов были разработаны оптимальные режимы стерилизации. Клетки стерилизуют в воздушном стерилизаторе при 120°C в течение 5-7 минут. Подстилочный материал стерилизуют дважды. Сначала опилки стерилизовали в специальной ёмкости, а затем вторично с клеткой в воздушном стерилизаторе.

Корм и воду стерилизуют в автоклаве. Корм расфасовывают в хлопчатобумажные мешочки и автоклавируют с вакуумом при 1,2 атм. в течение 20 минут. Воду автоклавируют в стеклянной посуде при 2 атм. в течение 1 часа. Следует отметить, что гранулированный корм

можно стерилизовать и в воздушном стерилизаторе при соответствующих режимах стерилизации.

Апробирован и другой способ стерилизации гранулированного корма гамма-лучами. Этот вид стерилизации считается наиболее щадящим по отношению к питательным веществам и, в первую очередь, к витаминам. Гранулированный корм расфасовывают в полиэтиленовые мешочки, устойчивые к химическим дезинфектантам и обладающим определенной механической прочностью. Мешочки берут несколько большего размера и запаивают их на машине для герметичности. Упакованный в двойные мешочки корм подвергают облучению в дозе 2,5 Мрад на кобальтовом облучателе. Однако это вид стерилизации требует больших материальных затрат.

Выращивание СПФ-животных в изоляторной системе.

Изоляторная система «RAIR Isosistem» используется нами для перевода конвенциональных племенных ядер мышей коллекционного фонда в СПФ-статус. В одной такой изоляторной

системе можно содержать 16 линий мышей коллекционного фонда. Как было отмечено, данная система работает в комплексе с ламинаром. Смена клеток, раздача корма, воды и т.д. производится только в стерильных условиях. Установлено, что во избежание случайной контаминации, работу, по обслуживанию животных в микроизоляторах в ламинарах, надежнее проводить двум сотрудникам. Обслуживающий персонал работает с микроизоляторами в масках и стерильных перчатках. Успех в работе во многом зависит от подготовки специалистов и их добросовестности. Следует отметить, что в работе с изоляторной системой особое значение имеют обеспечение санитарного режима и профилактика контаминации СПФ животных. Поэтому малейшее отступление от правила, влекущее нарушение стерильности, сводит на нет усилия всего коллектива в выполнении поставленных задач.

Гнотобиологические методы получения стерильного потомства животных (гистерэктомия). Освобождение конвенциональных животных от патогенной микрофлоры проводили усовершенствованным методом гистерэктомии. Главное требование успешного получения стерильного потомства – абсолютная асептика. При гистерэктомии это достигается соблюдением стерильных условий операции ампутирования матки, извлечения ее из брюшной полости, погружением на несколько секунд в теплый раствор антисептика, а также освобождение плодов и осушивание (рис.5, 6).

Современное оборудование позволило усовершенствовать методические приемы получения стерильного потомства лабораторных животных. Вместо обычных гнотобиологических изоля-

торов, на подготовку которых уходило много времени (стерилизация изолятора, продувка, проведение стерильного корма, воды, опилок, клеток, крышек и т.д.), мы брали стерильную клетку микроизолятора. В микроизолятор помещали самку-кормилицу и ставили в ламинар, где проводили операцию гистерэктомии. После соответствующей обработки, извлеченное стерильное потомство подсаживали к самкам-кормилицам и клетку микро-изолятора возвращали на свое место в изоляторной системе.

Микробиологический контроль. Для микробиологического контроля гнотобиотов разработан комплекс методических приемов, направленных на выявление контаминации. Принципиальная схема такого контроля описана Вагнером (1959). Общепринятые методы контроля с использованием различных питательных сред и условий культивирования обеспечивают надежное выявление контаминации гнотобиотов и идентификацию выделенных микроорганизмов. Вместе с тем, существующие методы контроля обладают одним существенным недостатком, что позволяет судить о микробиологическом статусе животных лишь ретроспективно, т.е. по их состоянию 2-3 недели назад, так как именно этот срок требуется для окончательного суждения о контаминации системы. В ряде лабораторий производится и вирусологический контроль гнотобиотических животных, но из практических соображений этот вопрос на сегодняшний день, как правило, опускается из-за сложности такого контроля. В то же время считается, что от экзогенных вирусов гнотобиологическая изоляция представляет такой же надежный барьер, как и для других микроорганизмов. Основные

трудности в отношении вирусной контаминации зависят от трансплацентарной передачи вирусов. Этот вопрос требует своего дальнейшего углубленного изучения и поисков путей селекции животных свободных от носительства вирусов, передающихся вертикально. По результатам контроля животные в изоляторной системе поддерживаются в СПФ-статусе.

Результаты и их обсуждение

В 2013 году от патогенной микрофлоры освобождены и переведены в СПФ-статус ещё три линии мышей коллекционного фонда СЗН/А1, СС57W, СЗН/Sp. В настоящее время получены основные 15 линий мышей СПФ-категории, которые пользуются наибольшим спросом в медико-биологических исследованиях (рис.7). Отработанная технология содержания лабораторных животных СПФ-статуса в изоляторной системе может быть рекомендована для питомников и экспериментально-биологических клиник. Переход на изолированную систему содержания лабораторных животных позволит иметь качественных, здоровых животных, свободных от патогенной микрофлоры, т.е. животных СПФ-статуса, которые крайне необходимы как основа экспериментальной медицины.

Список литературы

1. *Абдрашитова Э.Х., Зайцев Т.И. и др.* Стандартизация лабораторных животных по состоянию здоровья // Ланималогия. 1993. М. 7 с.
2. *Болотских Л.А., Подопривога Г.И.* Разработка и использование гнотобиологических методов в лабораторном животноводстве // В сб.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медицины-биологических исследований. М. 1987. 23 С.
3. *Болотских Л.А., Каркищенко Н.Н., Егорова И.Ю.* Внедрение гнотобиотехнологии для создания лабораторных животных СПФ-статуса // Биомедицина. 2011. № 3. С. 53-56.
4. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – М.: Межакадемическое издательство ВПК. 2004. 607 с.
5. *Подопривога Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А.* Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс, морских свинок // Вестник АМН. 1981. № 2. С. 54-58.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль 2С. 2010. С. 88-101.

Breeding of SPF-status laboratory animals as basis of experimental medicine

L.A. Bolotskikh, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, N.V. Kasinskaya, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, E.L. Matveenko

The fulfilled technology of receiving and cultivation of laboratory animals can be recommended to nurseries and vivarium of scientific institutions for production of qualitative, healthy animals, specific pathogen free, i.e. animals of the SPF-status.

Key words: SPF-animals, insulator system, gnotobiotics methods.

Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели

Д.Б. Чайванов¹, Н.В. Станкова²

¹ – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

² – ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России», Московская обл.

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

В статье анализируются возможности моделирования на животных результатов физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы. Анализ проводится на основе двухмерной векторной модели функционального состояния нервной системы животных. Данная модель является аналогом трехмерной векторной модели функционального состояния нервной системы человека, в которой исключена координата фокуса внимания второй сигнальной системы в силу отсутствия ее у животных.

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

Двухмерная векторная модель функционального состояния нервной системы животных

Существенным и, вероятно, наиболее значимым отличием функциональной организации центральной нервной системы млекопитающих от таковой человека является практически полное отсутствие у животных второй сигнальной системы. Это отличие создает необходимость предложить соответствующую модель функционального состояния нервной системы животных. В отличие от предложенной нами ранее трехмерной векторной модели функционального состояния нервной системы человека [3], такая модель не будет содержать координаты фокуса внимания второй сиг-

нальной системы. Также как и у человека, каждое функциональное состояние нервной системы мы будем представлять точкой пространства, но, в отличие от человека, у прочих млекопитающих такое пространство будет двухмерным. В качестве координат пространства используются следующие характеристики:

- 1) уровень возбуждения центральной нервной системы;

- 2) ориентация фокуса внимания первой сигнальной системы на внешние или на внутренние процессы.

По аналогии с человеком [3], в качестве примера рассмотрим положение некоторых функциональных состояний нервной системы в такой системе координат.

При бодрствовании фокус внимания первой сигнальной системы ориентирован преимущественно вовне, уровень возбуждения может меняться в широких пределах – от расслабленного состояния к активному бодрствованию и перевозбуждению.

В состоянии сна первая сигнальная система ориентирована преимущественно внутрь, уровень возбуждения меняется, нарастая от четвертой к третьей, второй и, наконец, первой стадии сна, достигая максимума при быстром сне.

Состояния размышлений с внутренним диалогом и гипнотического транса, в котором речь гипнотизера редуцируется в воспроизводимые гипнотизируемым образы и чувства, вероятно, несвойственны животным.

Для большей наглядности представим области двух основных базовых

состояний животных в координатах двухмерного векторного пространства (рис. 1).

В полной аналогии с человеком у животных имеется связь между ориентацией фокуса внимания первой сигнальной системы и уровнем возбуждения [3]. Ориентация фокуса внимания первой сигнальной системы вовне ведет к увеличению уровня возбуждения, ориентация фокуса внимания внутрь – к уменьшению уровня возбуждения. Так же и ориентация фокуса внимания вовне ведет к росту уровня возбуждения, а ориентация фокуса внимания внутрь – к уменьшению уровня возбуждения. Основным исключением из данной закономерности у животных является быстрый сон, в котором высокий уровень возбуждения нервной системы сочетается с ориентацией фокуса внимания внутрь.

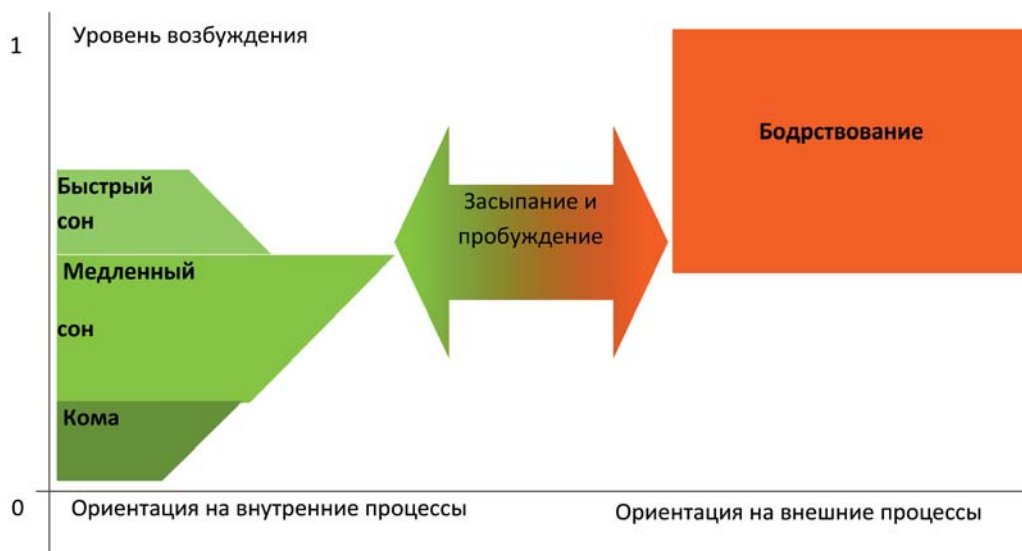


Рис. 1. Области основных базовых состояний на плоскости двухмерного векторного пространства. Ориентации сигнальных систем полностью на внутренние процессы соответствует нулевое значение, ориентации на внешние процессы – единица.

Ограничения моделирования на животных физических методов модулирования функционального состояния нервной системы человека

Самыми важными ограничениями при моделировании на млекопитающих физических методов модуляции функционального состояния человека является отсутствие у животных анатомических структур второй сигнальной системы и связанная с этим межполушарная асимметрия.

Другим важным ограничением является то, что при микрополяризации отношение размеров пятна стимуляции к размеру корковых структур мозга существенно больше, чем у человека. Это вызвано:

1) меньшей в целом по отношению к массе мозга массой коры [1];

2) большей по отношению к размерам мозга толщиной черепа и скальпа [1] и, следовательно [2], худшей локализацией стимуляции.

Это приводит к практической невозможности избирательно модулировать корковые структуры животных за счет транскраниальной микрополяризации. Впрочем, остается возможность моделировать неинвазивную стимуляцию структур первой сигнальной системы мозга человека при инвазивной стимуляции мозга животного.

Вряд ли стоит ожидать высокой степени локализации при транскраниальной магнитной стимуляции головного мозга животного с использованием оборудования, разработанного для человека. Поскольку мозг животного существенно меньше, чем человека, относительный размер стимуляционного пятна очень велик. Так, при стимуляции

крыс и мышей он сопоставим с размером организма, при стимуляции макак и мини-свиней удастся стимулировать весь мозг в целом (опыты проводились на имеющемся у нас приборе «Нейро-МС/Д») и с применением койла ИДУ-02-100-0). Некоторого уменьшения размера стимуляционного пятна можно, вероятно, достичь, разработав специальное оборудование, предназначенное для магнитной стимуляции животных.

Особенности моделирования на животных физических методов диагностики функционального состояния нервной системы человека

Отсутствие у животных второй сигнальной системы и обусловленная этим двухмерность векторного пространства функционального состояния нервной системы является основной особенностью моделирования на животных физических методов диагностики функционального состояния нервной системы человека.

По аналогии с человеком [3], наиболее прямым и оптимальным методом диагностики уровня возбуждения будет являться РЭГ.

Как и у человека, у млекопитающих имеется связь между фокусом внимания первой сигнальной системы и уровнем возбуждения, а также их физиологическими проявлениями. Также как и у человека, возникает необходимость разработки методов, позволяющих дифференцированно определять уровень возбуждения и фокусы внимания сигнальных систем. Для этой цели можно использовать полученную нами ранее формулу расчета фокуса внимания первой сигнальной системы [3]:

$$ФВ = A / УВ,$$

где А – нормированная на единицу к максимальной, безразмерная амплитуда реакции; УВ – нормированный на единицу к максимальному, безразмерный уровень возбуждения; ФВ – фокус внимания первой сигнальной системы.

Представляется, что определение функционального состояния нервной системы млекопитающих на основании методов анализа вариабельности сердечного ритма и частоты дыхания будет в большой степени аналогично определению состояния нервной системы человека на основании тех же методов, поскольку подкорковые структуры человека и млекопитающих имеют много общего. В силу отсутствия у животных высших психических функций, тесно связанных с речью и влияющих на функциональное состояние нервной системы, можно ожидать более простых закономерностей и меньшей в сравнении с человеком индивидуальной вариативности особи.

Выбор биологической модели-животного

Из проведенного выше анализа ограничений моделирования на животных физических методов диагностики функционального состояния нервной системы человека следует, что на животных можно моделировать методы диагностики фокуса внимания первой сигнальной системы и уровня возбуждения. Из проведенного выше рассмотрения ограничений моделирования на животных физических методов модуляции функционального состояния нервной системы человека следует, что на животных можно моделировать только методы модуляции уровня возбуждения. С учетом

этого, к животному-модели предъявляются следующие требования:

1. Строение физиологического субстрата первой сигнальной системы и структур мозга животных, отвечающих за уровень возбуждения, должно быть сходно с таковыми у человека.

2. Размеры тела животного должны быть близки к размерам тела человека, что позволит использовать оборудование, разработанное для человека

3. Животное при свободном содержании не должно «сбрасывать» с себя стимулирующие электроды и датчики в ходе эксперимента, поскольку фиксация животного вызывает сильный стресс, при котором проведение исследования невозможно.

С целью выбора животного-модели нами были проведены тестовые экспериментальные проверки крыс, кроликов, кошек, макак и светлогорских мини-свиней, имеющих строение субстрата первой сигнальной системы и структур, отвечающих за уровень возбуждения, сходное с человеком. Размер тела крыс не позволял установить на них электроды и датчики, предназначенные для человека, что сделало проверку невозможной. Кошки и макаки «срывали» с себя датчики. Кроме того, поведение макак было весьма агрессивным, что делало эксперимент опасным для исследователя. Наиболее удобными животными в итоге оказались светлогорские мини-свиньи и кролики. Они позволяли надеть на себя стимулирующие электроды и датчики, не сбрасывали их в ходе эксперимента, не проявляли агрессивного поведения по отношению к исследователю, после привыкания к работе практически не испытывали стресса, осложняющего эксперимент, засыпали

при процедуре электросна (см. рис. 2). Это позволяет признать светлогорских мини-свиней и кроликов наилучшими из рассмотренных нами животными-моделями.



Рис. 2. Электрическая стимуляция головного мозга светлогорской мини-свиньи, совмещенная с функциональной диагностикой.

Список литературы

1. *Климов А.Ф., Акаевский А.И.* Анатомия домашних животных. – “Лань”, СПб., 2007.

2. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 6-11.

3. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Трехмерная векторная модель функционального состояния нервной системы как теоретическая основа для диагностики состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной нейростимуляции // Биомедицина. – 2013. – № 3. – С. 18-25.

Analysis of restrictions of physical modeling in animals modulation techniques and diagnostics of the functional state of a person nervous system with a view to choice an animal model

D.B. Chayvanov, N.V. Stankova

In article analyzes the possibility of modeling in animals results of physical methods of modulation and diagnosis of the functional state of the nervous system. The analysis is based on a two-dimensional vector model of the functional state of the nervous system of animals. This model is analogous to a three-dimensional vector model of the functional state of the human nervous system, which excluded coordinate the focus of attention of the second signal system because of its lack of an animal.

Key words: physical methods of psychodiagnostics, diagnostics of the functional state of the nervous system, transcranial neurostimulation.



Экспериментальное обоснование возможности регуляции активности P450 3A4 таурином с целью оптимизации фармакотерапии антибиотиками-макролидами

Е.В. Ших¹, А.А. Махова²

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

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

Контактная информация: Ших Евгения Валерьевна, chih@mail.ru

Показана возможность витаминов и таурина выступать в качестве средств регуляции биотрансформации лекарственных веществ путем изменения активности системы цитохрома P450 3A4. Для исследования каталитической активности цитохромов P450 могут быть применены электрохимические системы. Перспективным является изучение в эксперименте возможности нивелирования антиоксидантами (в том числе таурином) блокирующего эффекта макролидов (кларитромцина) на активность цитохромов P450.

Ключевые слова: таурин, цитохром P450 3A4, макролиды, электрохимические исследования, индукция, антиоксиданты.

Введение

Важнейшей задачей современной медицины является повышение эффективности и безопасности лекарственной терапии, которая может быть решена не только путем поиска новых лекарственных веществ, но также благодаря более рациональному использованию уже существующих лекарственных средств, а также поиску индукторов и ингибиторов биотрансформации лекарственных веществ. Для целенаправленной регуляции биотрансформации лекарственных веществ, путем изменения активности

системы цитохрома P450, наиболее пригодны природные регуляторы – витамины и витаминоподобные вещества, которые являются естественными компонентами внутренней среды, отличаются безвредностью и физиологичностью действия [1, 4, 5].

Цитохромы P450 играют огромную роль в метаболизме лекарственных препаратов, при этом, образуящиеся в организме активные формы кислорода (АФК) могут взаимодействовать с цитохромом P450, вызывая инактивацию фермента. Антиоксиданты снижают

уровень АФК, повышая активность цитохрома P450. Направленная регуляция каталитического цикла цитохрома P450 может приводить как к снижению скорости метаболизма лекарственных препаратов, так и к активации ферментативного гидроксилирования субстратов. Это особенно важно в случае выявления пониженной экспрессии определенной формы цитохрома P450 [5, 6].

В наших экспериментальных электрохимических исследованиях мы показали, что витамины-антиоксиданты (витамин А, Е, аскорбиновая кислота), коэнзим Q10, таурин модулируют активность цитохрома P450 3A4, что может приводить к улучшению его работы и повышению эффективности метаболизма препаратов-субстратов цитохрома P450 3A4 [6, 7].

1.1. Роль таурина в организме человека.

Важным метаболитом, определяющим состояние клеточного иммунитета, уровень антиоксидантной защиты, детоксикационных возможностей организма, является серосодержащая аминокислота - таурин. Таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) является наиболее распространенной из свободных аминокислот в организме человека и играет важную роль в таких биологических процессах как конъюгация желчных кислот, поддержание гомеостаза кальция, осморегуляция и стабилизация мембран. У людей, таурин образуется в гепатоцитах в результате обмена веществ из метионина и цистеина через гипотаурин. Таурин в высокой концентрации содержится в сердечной мышце, центральной нервной системе, лейкоцитах, скелетной мускулатуре. Другие клетки (например, нейтрофилы)

содержат очень высокие концентрации таурина, посредством захвата вещества непосредственно из крови, куда таурин поступает как из эндогенных источников, так и из пищи. Биосинтетические способности человека производить таурин ограничены у новорожденных, а также снижаются с возрастом и при некоторых патологических процессах (травмы, сепсис). В таких ситуациях, поступление таурина является важным источником этой аминокислоты [2, 8]. Органические осмолиты, такие как таурин, имеют уникальные биофизические и биохимические свойства. Эти вещества накапливаются в клетках без изменения ее гомеостаза, структуры и функции в отличие от электролитов и мочевины, которые могут повреждать клетку, когда накапливаются в ней в больших количествах или когда возникают выраженные колебания их концентрации [2, 9].

Таурин широко применяется в медицине: в неврологии для лечения эпилепсии и мышечных дистрофий, в комплексной терапии осложнений СД, лечении атеросклероза. В офтальмологии: таурин выполняет регенеративную функцию, поддерживает осмотическое равновесие в хрусталике, обеспечивая его прозрачность (недостаток таурина приводит к развитию катаракты), обладает рядом защитных свойств (антиоксидантная защита сетчатки, снятие спазма аккомодации) при воздействии на организм человека неблагоприятных факторов [2]. Таурин способен осуществлять детоксикацию вредных соединений, что объясняет его защитные эффекты при отравлении некоторыми лекарственными препаратами и ядами. Под действием таурина улучшается печеночный кровоток и уменьшаются про-

явления цитолитического синдрома. Таурин снижает образование гипохлорной кислоты и гидроксильных радикалов, практически не воздействуя на генерацию супероксид-радикалов [10, 11].

Для исследования каталитической активности цитохромов P450 могут быть применены электрохимические системы [9, 10, 19]. Ранее электрохимическими методами подтверждено влияние витаминов группы В (тиамина - витамин В1, рибофлавина - витамин В2, пиридоксина - витамин В6) на монооксигеназную активность цитохромов P450 [6, 7, 9].

Электрохимические подходы перспективны для исследования фермент-субстратных взаимодействий вследствие высокой чувствительности. Особенностью электрохимических сенсоров на основе цитохромов P450 является использование наноструктурированных электродов для повышения чувствительности анализа.

Активные формы кислорода (АФК) могут взаимодействовать с цитохромом P450, вызывая инактивацию фермента. Направленная регуляция каталитического цикла цитохрома P450 может приводить как к снижению скорости метаболизма лекарственных препаратов, так и к активации ферментативного гидроксирования субстратов. Это особенно важно в случае выявления пониженной экспрессии определенной формы цитохрома P450. Антиоксиданты снижают уровень АФК, так как являются ловушками кислородных радикалов.

Нами исследовано влияние витаминов-антиоксидантов С, А, и Е и таурина на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 электрохимическими методами. Показано концентрационно-зависимое стимулирующее влияние ан-

тиоксидантов на электрокатализ цитохрома P450 3A4 [12].

В клинической практике активность CYP3A4 может быть оценена по соотношению концентраций 6 β -гидрокортизола (образуется из кортизола исключительно под действием CYP3A4) и кортизола (6 β -гидрокортизол/кортизол), концентрации которых в утренней порции мочи определяются методом хромато-масс-спектрометрического анализа на ВЭЖХ. Низкие значения отношения 6 β -гидрокортизол/кортизол соответствуют низкой активности CYP3A4, а высокие – высокой [5].

Электрохимический анализ каталитической активности цитохрома P450 3A4 показал, что коэнзим Q10 [7] и таурин [5] влияют на восстановление цитохрома P450 3A4 за счет антиоксидантного действия. Эти данные позволяют предположить возможность влияния коэнзима Q10 и таурина на метаболизм лекарственных препаратов, в том числе повышать эффективность назначаемых препаратов-субстратов изоформы P450 3A4, при использовании в комплексной терапии путем модулирования активности цитохрома P450 3A4.

Одним из примеров практического назначения индукторов цитохромов P450 3A4, которыми являются таурин, может стать пример совместного назначения таурина и препарата из группы макролидов, поскольку известно, что ингибиторами изофермента цитохрома P-450 3A4 являются макролидные антибиотики. Однако макролиды отличаются по способности ингибировать данный изофермент. По классификации предложенной Periti P. (1992), макролиды делятся по способности ингибировать изофермент цитохрома

P-450 3A4 на 3 группы: сильные ингибиторы (1 группа) - эритромицин и тролетандомицин; умеренные ингибиторы (2 группа)- кларитромицин; макролиды не ингибирующие данный изофермент (3 группа)- азитромицин и диритромицин [3]. Таким образом, совместное применение с субстратами изофермента цитохрома P-450 3A4 макролидов 1 и 2 группы может приводить к нежелательным лекарственным реакциям. Однако, назначение индукторов системы P450, таких как таурин, возможно, приведет к нивелированию блокирующего эффекта макролидов и повышению эффективности и безопасности терапии.

Заключение

Таким образом, дополнительное назначение таурина повышает эффективность терапии антибиотиков. Однако механизм положительного действия данного витаминopodobного вещества связан, по-видимому, не только с его мощным антиоксидантным тканевым действием, но и со стабилизацией работы цитохромов системы P450. Природная система антиоксидантов, представленная как витаминами-антиоксидантами, так и такими веществами как таурин и Коэнзим Q10, которые вследствие своей доступности, распространенности в природе, лучшей изученности и сродству к организму человека наиболее часто включаются в состав комплексной терапии целого ряда заболеваний. Необходимы как экспериментальные, так и клинические исследования, для более полного понимания роли таурина в модуляции активности цитохромов системы P450-человека, что может найти широкое применение в различных областях медицины.

Список литературы

1. *Бойко С.С., Бобков Ю.Г.* Роль фармакокинетики в реализации эффекта антигипоксантов // Экспериментальная и клиническая фармакокинетика. М.: Медицина. 1988. С. 60-68.
2. *Сабадаш Е.В.* Экспериментальное обоснование применения таурина в терапии туберкулеза // Диссертации к.м.н., М., 2006г
3. *Кукес В.Г.* Клиническая фармакология. Учебник // М.: «ГЭОТАР-МЕД». 2004. 930 с.
4. *Махова А.А., Шумянцева В.В., Ших Е.В., Булко Т.В., Кукес В.Г., Сизова О.С. Раменская Г.В. Арчаков А.И.* Влияние витаминов группы В на монооксигеназную активность цитохрома CYP3A4: электроанализ каталитических свойств // Биомедицина. 2010. №3. С.99-100.
5. *Сизова О.С.* Клинико-фармакологическое исследование возможности фармакологической регуляции активности цитохрома P450 3A4 у больных онхомикозом // Автореф. дис.к.м.н. 2011.
6. *Шумянцева В.В., Ших Е.В., Махова А.А., Булко Т.В., Кукес В.Г., Сизова О.С., Раменская Г.В., Усанов С.А., Арчаков А.И.* // Влияние витаминов группы В на монооксигеназную активность цитохрома P450 3A4: фармакокинетические исследования и электроанализ каталитических свойств. Биомедицинская химия. 2011. т. 57. вып. 3. С. 343-354.
7. *Шумянцева В., Ших Е., Махова А., Булко Т., Супрун Е.* Влияние Кудесана на цитохром P450 3A4: исследование электрохимическими методами // Врач. 2013. №4. С. 40-44.

8. *Harris Ripps, Wen Shen.* Review: Taurine: A “very essential” amino acid. *Mol Vis.* 2012; 18: 2673-2686.
9. *Huxtable R.J.* Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 1992;72:101-63.
10. *Jong C.J., Azuma J., Schaffer S.* Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids.* 2012;42:2223-32.
11. *Marcinkiewicz J., Wojas-Pelc A., Walczewska M., Lipko-Godlewska S., Jachowicz R., Maciejewska A., Bialecka A., Kasprowicz A.* Topical taurine bromamine, a new candidate in the treatment of moderate inflammatory acne vulgaris: a pilot study. *Eur J Dermatol.* 2008 Jul-Aug;18(4):433-9
12. *Shumyantseva V.V., Makhova A.A., Bulko T.V., Shich E.V., Kukes V.G., Usanovc S.A., Archakov A.I.* The Effect of Antioxidants on Electrocatalytic Activity of Cytochrome P450 3A4. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2013. Vol. 7. No. 2. P. 160-164.

Experimental justification of P450 3A4 activity regulation possibility by a taurine for the purpose of pharmacotherapy optimization by antibiotics macrolides

E.V. Shikh, A.A. Makhova

Previously explored vitamins and vitamin-like substances act as a means of regulating the biotransformation and pharmacological actions of drugs by altering the activity of the cytochrome P-450 3A4. To investigate the catalytic activity of the cytochromes P450 can be applied to the electrochemical system. Appointment of P450 inducers, which are antioxidants (including taurine), possibly leading to a leveling blocking effect of macrolides (Clarithromycin) and improve the efficiency and safety of care, which requires further research.

Key words: taurine, cytochrome P450 3A4, macrolides, electrochemical studies, antioxidants,

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Приглашаем Вас принять участие в ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», которая будет проводиться во второй половине мая 2014 года в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу: 143442, Московская область, Красногорский район, поселок Светлые горы, владение 1.

Тел.(495) 561-52-64, факс (495) 561-52-73

e-mail: scbmt@yandex.ru

Предполагаемые темы для формирования программы конференции:

1. Лабораторные животные (модели животных в биомедицинских исследованиях, биоэтические нормы и принципы в экспериментальной работе, новые методы оценки функциональных состояний лабораторных животных, лабораторные животные в современных фармакологических и токсикологических исследованиях, животные-модели и модели животных в сравнительных биологических исследованиях, новые технологии содержания, требования GLP).
2. Альтернативное и биологическое моделирование в биомедицинских исследованиях (биологические и клеточные, математические, физико-химические модели, новые животные-модели).
3. Биомедицинская безопасность (безопасность нанобиотехнологических средств, клеточных технологий, иммунобиологических препаратов, лекарственная токсикология и безопасность фармакологических средств и фармацевтических субстанций).
4. Новые биомедицинские технологии.
5. Методы биомедицинских исследований.
6. Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.
7. Биомоделирование в интересах клинической фармакологии.

Оргкомитет конференции.

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным **комбикормом для лабораторных животных**: научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень;
- ✓ Премиксы.



НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам

Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 9 (Виварий)
ООО "Лабораторкорм"

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 648-42-39;

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

www.laboratorkorm.ru, e-mail: info@laboratorkorm.ru

на правах рекламы



БИОМЕДИЦИНА



Филиал «Клиническая фармакология» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России работает в составе научного центра с 2005 года. Научное руководство филиалом осуществляет академик РАМН Кукес В.Г. Клинической базой филиала является ГКБ №23 им. Медсантруд.

Основными научными направлениями деятельности филиала являются:

- *фармакогенетическое тестирование для повышения эффективности и безопасности применения лекарственных средств у пациентов с заболеваниями внутренних органов (по CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, VKORC1, CYP4F2, GG CX):*
 - для персонализации дозирования непрямых антикоагулянтов (варфарин, аценокумарол, фениндион) у пациентов с высоким тромботическим риском;
 - для персонализации выбора целевой дозы липофильных бета-адреноблокаторов у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, артериальной гипертензией, ИБС;
 - для персонализации выбора антиагрегантов- блокаторов P2Y₁₂ рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом или после стентирования коронарных сосудов,
 - для персонализации дозирования ингибиторов протонного насоса в составе схем антихеликобактерной терапии у пациентов с кислот-зависимыми заболеваниями;
 - для выявления генетической предрасположенности к развитию желудочно-кишечных кровотечений при применении НПВС.
- *поиск природных модуляторов (включая фитопрепараты и витамины) активности изоферментов цитохрома P-450 для повышения безопасности фармакотерапии препаратами- субстратами данной системы.*

Филиал «Клиническая фармакология» предлагает сотрудничество по разработке новых лекарственных препаратов, формированию регистрационного досье, клиническим исследованиям лекарственных препаратов (включая исследование биоэквивалентности на здоровых добровольцах), фармакогенетическому тестированию и консультированию пациентов в области персонализации фармакотерапии.