

2015

БИОМЕДИЦИНА

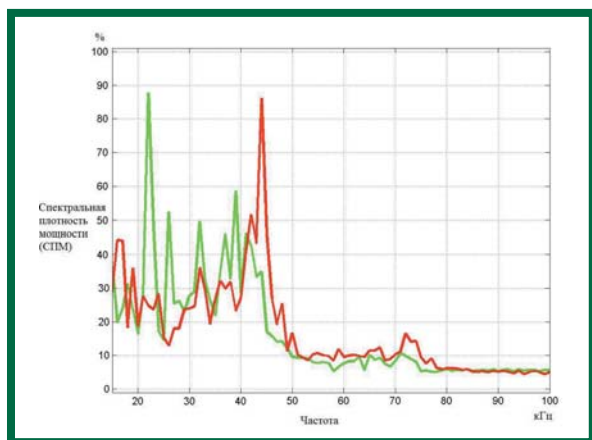
MEDICINE
ISSN 2074-5982

2015

1

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», которая будет проводиться 20-21 мая 2015 г. в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:

143442, Московская обл., Красногорский р-н,
пос. Светлые горы, владение 1,
тел. (495) 561-52-64, факс (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 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, 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.*

Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин, на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов. Просьба к участникам выслать материалы докладов с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения, названия доклада, а также информации о необходимости бронирования места в гостинице до 1 мая 2015 года.

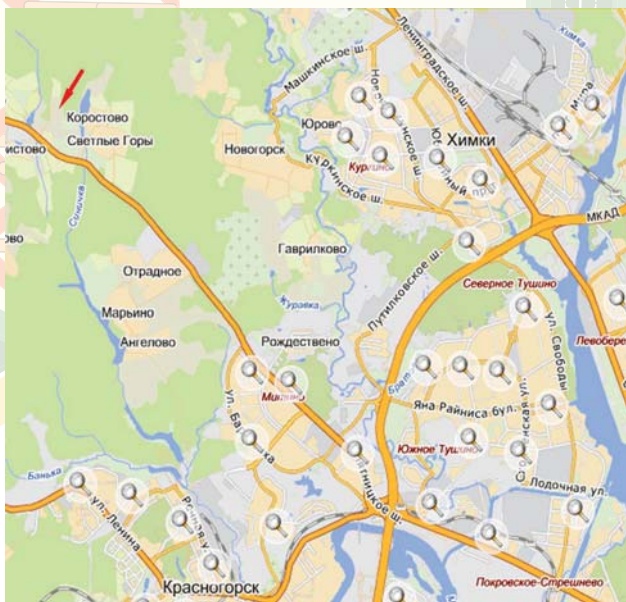
СХЕМА ПРОЕЗДА:

Адрес: 143442, Московская область,
Красногорский район,
пос. Светлые горы, владение 1.

Проезд по Пятницкому шоссе от станции метро «Тушинская» на автобусе 575 или маршрутном такси 460 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

От станции метро Митино или Пятницкое шоссе на автобусе 575, маршрутном такси 575, 460, 707 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

На автомобиле: по Пятницкому шоссе (6 км от Кольцевой автодороги) до поворота на Светлые горы, мимо пруда, до магазина, после него поворот по указателю налево между двух прудов, по дамбе прямо до Центра.



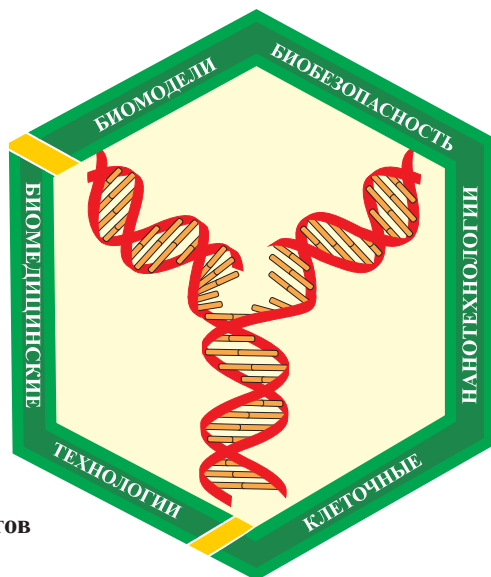
Научный журнал.

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

Гл. редактор академик **Н.Н. Каркищенко**

Зам. гл. редактора **В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов**

Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

Г.Д. Капаназде, Светлые горы МО, **С.Л. Люблинский**, Обнинск Калужская область,
Е.Л. Матвеев, Светлые горы МО, **А.Н. Мурашёв**, Пушкино МО,
С.Ю. Пчелинцев, Любучаны МО, **Г.В. Раменская**, Москва, **А.О. Ревякин**, Светлые горы МО,
В.П. Рябых, Боровск МО, **Х.Х. Семенов**, Светлые горы МО, **Д.А. Сычев**, Москва,
Ю.В. Фокин, Светлые горы МО, **Д.Б. Чайванов**, Москва, **Е.В. Ших**, Москва

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

К.В. Анохин, Москва, **Е.Е. Ачкасов**, Москва, **В.М. Баранов**, Москва,
А.Т. Быков, Сочи, **Е.Ю. Бонитенко**, Санкт-Петербург, **Витан Влахов**, София, Болгария,
М.И. Воевода, Новосибирск, **А.М. Дыгай**, Томск, **А.Л. Зефилов**, Казань,
Р.С. Кузденбаева, Алматы, Казахстан, **В.Г. Кукес**, Москва,
Ю.С. Макляков, Ростов-на-Дону, **А.И. Мирошников**, Пушкино МО,
В.Б. Назаров, Москва, **В.Р. Рембовский**, Санкт-Петербург, **В.П. Фисенко**, Москва,
Д.Ф. Хритинин, Москва, **Б.Д. Цыганков**, Москва, **В.И. Цысь**, Смоленск

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 27.03.2015
Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

А.Е. Емельянова, А.А. Емельянов, Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина, Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе Моделирование на животных физиотерапевтических способов купирования гиперактивации нервной системы после физической и психической нагрузки, в том числе на фоне действия стимулирующих веществ	4
К.М. Пац, Е.В. Федорова, М.С. Johnson, Xiang-Guo Li Компьютерный дизайн ингибиторов протеинкиназы MST1 – прямого регулятора апоптоза β-клеток	11

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семёнов, С.В. Оковитый, В.Ц. Болотова, В.Н. Юсоев Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием	18
О.М. Куделина, В.Б. Назаров, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, В.Г. Заика Экспериментально-клинический анализ сравнительного влияния Вальдоксана и Флуоксетина на параметры фармако-ЭЭГ	24
А.В. Сафроненко, В.Б. Назаров, Ю.С. Макляков, В.А. Сафроненко, А.А. Демидова Генетические и иммунологические аспекты нарушения метаболической устойчивости эндотелия сосудов у больных рефрактерной артериальной гипертензией	36

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ю.В. Фокин, А.Г. Берзина, В.Н. Каркищенко, О.В. Алимкина, Н.Б. Гамалея Влияние разных доз этанола на ультразвуковую вокализацию крыс	45
Ю.М. Мясоедов, В.М. Безгин, В.Е. Козлов Подбор условий и критериев оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий	54

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей	60
В.Ц. Болотова, В.А. Крауз, Е.Б. Шустов Биологическая модель экспериментального невроза у лабораторных животных	66
Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.О. Ревякин, О.И. Степанова, Н.В. Петрова Влияние стволовых клеток на репродуктивную функцию речных раков	81
Г.И. Пронина, А.О. Ревякин, Н.Ю. Корягина, Г.Д. Капанадзе, О.И. Степанова, Н.В. Петрова, Ж.О. Курищенко Регенерация патологически измененной печени карпа после межвидовой трансплантации стволовых клеток	85

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

A.E. Emel'yanova, A.A. Emel'yanov, N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina, E.B. Shustov, G.D. Kapanadze

Modeling in laboratory animals of physiotherapeutic methods of reduction nervous system hyperactivation after physical activity and psychological stress including on the background of the chemical stimulant action4

K.M. Pats, E.V. Fedorova, M.S. Johnson, Li Xiang-Guo

Computer design og inhibitors of proteinkinase MST1 – the key regulator of apoptosis of β -cells11

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, S.V. Okovityi, V.Ts. Bolotova, V.N. Yuskovets

Search of regularities, determining antihypoxic activity of the compounds with nootropic and neurotropic action.....18

O.M. Kudelina, V.B. Nazarov, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, V.G. Zaika

Experimental and clinical analysis of comparative Valdoxan and Fluoxetine influence on pharmaco-EEG parameters24

A.V. Safronenko, V.B. Nazarov, Yu.S. Maklyakov, V.A. Safronenko

Genetic and immunological aspects of metabolic stability of vascular endothelium in patients with persistent hypertension.....36

BIOMEDICAL METHODS

Yu.V. Fokin, A.G. Berzina, V.N. Karkischenko, O.V. Alimkina, N.B. Gamaleya

Influence of different doses of ethanol on ultrasonic vocalization of rats45

Yu.M. Myasoedov, V.M. Bezgin, V.E. Kozlov

Selection of conditions and criteria of an estimation of biological activity and specificity of Purified Allergen of atypical mycobacterium54

LABORATORY ANIMALS

V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko

Influence of a sharp hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice60

V.Ts. Bolotova, V.A. Krauz, E.B. Shustov

Biological model of experimental neurosis in laboratory animals66

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova, N.V. Petrova

Influence of stem cells on reproductive function of crawfishes81

G.I. Pronina, A.O. Revyakin, N.Yu. Koryagina, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, N.V. Petrova, Zh.O. Kurischenko

Regeneration of pathologically changed liver of the carp after interspecific transplantation of stem cells85



Моделирование на животных физиотерапевтических способов купирования гиперактивации нервной системы после физической и психической нагрузки, в том числе на фоне действия стимулирующих веществ

А.Е. Емельянова^{1,2}, А.А. Емельянов¹, Н.Н. Каркищенко²,
Д.Б. Чайванов^{1,2}, Ю.А. Чудина¹, Е.Б. Шустов², Г.Д. Капанадзе²

¹ – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

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

Контактная информация: д.м.н. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru ;
к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, chavvanov@yandex.ru

В практике медицины катастроф и экстремальных воздействий одним из ключевых методов поддержания высокого уровня работоспособности человека является применение фармакологических средств психостимулирующего действия. При этом, с учетом специфики экстремальных воздействий, высока вероятность избыточности стимулирующего действия, гиперактивации нервной системы. В настоящей работе на модели гиперактивации нервной системы кроликов показана возможность купирования гиперактивации нервной системы после физической и психической нагрузки методами ритмического транскраниального электроцеребрального воздействия, как на фоне действия стимулирующих веществ, так и без них. Показана эффективность диагностики тормозного эффекта низкочастотной ритмической электростимуляции мозга на основные физиологические системы организма по показателям дыхательной и сердечной деятельности. Показатель частоты дыхания является более чувствительным к изменению функционального состояния животного по сравнению с частотой сердечных сокращений. При гиперактивации нервной системы продолжительность электроцеребральных воздействий, по сравнению с обычным функциональным состоянием, должна быть увеличена минимум на 5 минут.

Ключевые слова: электросон, ритмическая стимуляция подкорковых структур головного мозга, низкочастотная ритмическая электростимуляция, лабораторные животные.

Введение

На сегодняшний день существует широкий спектр стимулирующих препаратов, позволяющих повысить эффективность действия человека в экстремальной ситуации. Такие препараты позволяют, с одной стороны, уменьшить вероятность

негативных последствий (заболевания, ранения или гибели) экстремального воздействия, а с другой стороны – увеличить надежность и эффективность выполнения поставленных задач. К сожалению, применение стимулирующих препаратов при экстремальных воздействиях

вызывает гиперактивацию нервной системы, которая усугубляется физической и психической перегрузкой. Скорейшее восстановление организма после такой гиперактивации является необходимым условием сохранения здоровья, а также, в случае необходимости, повышения эффективности дальнейшего функционирования в экстремальной ситуации. Применение для этих целей фармакологических препаратов в ряде случаев нежелательно, поскольку, с одной стороны, их продолжительное действие затрудняет эффективное функционирование в экстремальной ситуации, а, с другой стороны, эффект совместного действия препаратов, обладающих стимулирующим и седативным действием, плохо изучен и может приводить к нежелательным побочным эффектам. Наилучшей альтернативой приему лекарственных средств в такой ситуации может стать физиотерапевтическая процедура – ритмическое транскраниальное электроцеребральное воздействие. В целях разработки такой процедуры в настоявшейся работе нами было исследовано влияние ритмической стимуляции подкорковых структур головного мозга кролика на динамику его функционального состояния после физической и психологической перегрузки, как на фоне действия кофеина, так и без него.

Обоснование выбора животного-модели. Особенности двухмерной модели функционального состояния нервной системы животных, обусловленные анатомическими и функциональными различиями головного мозга животных и человека, необходимо учитывать при выборе физических методов инициации переходов между устойчивыми функциональными состояниями нервной систе-

мы, которые могут быть смоделированы на животных [6]. Среди физических методов, предложенных в качестве инструментов модулирования функционального состояния человека (электросон [1, 2, 5], микрополяризация [3, 4, 7], магнитная стимуляция [2, 5]), только метод воздействия на подкорковые структуры (электросон) может быть адекватно смоделирован на млекопитающих, имеющих подкорковые структуры, анатомически и функционально сходные с человеком.

При выборе животного-модели в целях получения наиболее ярко выраженных эффектов необходимо стремиться к получению как можно больших плотностей токов в подкорковых структурах головного мозга. Известно, что максимальное значение тока, допустимое к применению, лимитируется максимальной допустимой плотностью тока, втекающего через глаза животного (отсутствии болевого эффекта [1, 2, 5]):

$$I_{\text{макс.}} = S_{\text{глаз}} * J_{\text{макс.}}$$

где $I_{\text{макс.}}$ – максимальный допустимый ток, $S_{\text{глаз}}$ – площадь поперечного сечения глаз животного нормального к вектору втекающих токов, $J_{\text{макс.}}$ – максимальная допустимая плотность втекающего тока.

Плотность токов в подкорковых структурах головного мозга может быть вычислена по формуле:

$$J_{\text{пк}} = I_{\text{макс.}} / S_{\text{пкн}}$$

где $I_{\text{макс.}}$ – максимальный допустимый ток, $J_{\text{пк}}$ – плотность тока в подкорковых структурах, $S_{\text{пкн}}$ – площадь поперечного сечения подкорковых структур головного мозга кролика, нормальная к направлению стимулирующих токов.

После тривиальных преобразований получим:

$$J_{пк} = J_{макс} * (S_{глаз} / S_{пкн}).$$

В приближении равной чувствительности к плотности тока у разных животных наилучшей моделью будет животное с наибольшим соотношением $S_{глаз} / S_{пкн}$ (животное с большими глазами и маленьким мозгом). Из имеющихся в нашем распоряжении животных (кошки, собаки, кролики, макаки) именно кролики в наибольшей степени отвечали этому требованию.

Материалы и методы

Для демонстрации возможностей изменения функционального состояния животного с помощью инструментальных методов воздействия провели экспериментальное исследование динамики показателей физиологических процессов у кролика под воздействием метода электросна. Процедуру воздействия электросна предшествовала двигательная и психическая нагрузка, при этом показатели были зафиксированы у двух групп кроликов. Экспериментальной группе животных за 40 мин до нагрузки давали стимулирующее вещество – кофеин в дозе эквивалентной 300 мг кофеина для человека, а контрольной группе не давали это вещество. Каждая группа животных состояла из 5 кроликов. Животные испытывали стресс, обусловленный перемещением их в незнакомое помещение (что обычно сопряжено с проведением болезненных исследований, в которых животные ранее участвовали).

Динамику физиологических показателей у животных во время экс-

перимента фиксировали с помощью дыхательных датчиков, электродов сердечной деятельности в составе аппаратно-программного комплекса «РЕ-АКОР» (производство Медиком МТД). В течение эксперимента у животных фиксировали частоту сердечных сокращений (ЧСС) и частоту дыхания (ЧД). Фиксация показателей продолжалась в течение 25 мин, которая была разбита на этапы по 5 мин. Первый этап соответствовал состоянию покоя, когда кролики отдыхали после нагрузки. Второй (ЭС 1), третий (ЭС 2) и четвертый (ЭС 3) пятиминутные этапы соответствовали воздействию электросна, когда кролики засыпали. Пятый этап соответствовал пробуждению, связанному с прекращением электросна. Процедура электросна проводилась с помощью бытового прибора «Электросон – ЭГСАФ-01», низкочастотное (6 Гц) ритмическое воздействие осуществлялось глазнично-затылочным способом импульсами прямоугольной формы.

Результаты и их обсуждение

В эксперименте была исследована динамика показателей сердечной и дыхательной деятельности кроликов до, в течение и после процедуры электросна. Для наглядности полученных данных они были представлены в виде сравнительных диаграмм экспериментальной и контрольной группы.

На рис. 1 представлены изменения частоты дыхания в зависимости от этапов эксперимента в двух группах. В экспериментальной группе ЧД под первоначальным воздействием низкочастотной ритмической электростимуляции снижается по сравнению с



Рис. 1. Сравнительная диаграмма частоты дыхания в экспериментальной и контрольной группах животных до, после и при действии электросна.

состоянием покоя. При продолжении ритмической стимуляции на третьем и четвертом этапе эксперимента ЧД увеличивается, и ее значение превосходит таковое в состоянии покоя. При отключении воздействия, при пробуждении ЧД снижается относительно четвертого этапа и устанавливается на уровне значений третьего этапа.

Воздействие стимулирующего вещества проявляется в большей выраженности значений ЧД в состоянии покоя и в иной динамике этого показателя по сравнению с контрольной группой животных. Воздействие электросна на животных экспериментальной группы приводит к снижению ЧД в начале воздействия, далее следует увеличение ЧД и дальнейшее ее снижение. При пробуждении наблюдается новое увеличение значения показателя ЧД.

Интересен тот факт, что у обеих групп кроликов четыре этапа (первый, второй, третий и пятый) характеризуются сходной динамикой ЧД, а на четвертом этапе (заключительное воз-

действие электросна – ЭС 3) наблюдаются противоположные изменения. Это может быть связано с кумулятивным эффектом от воздействия вещества и низкочастотной ритмической электростимуляции, проявляющимся в большей выраженности снижения ЧД. Снижение ЧД при переходе от бодрствования ко сну в двух группах, очевидно, объясняется действием электросна. Дальнейшее увеличение ЧД при переходе от ЭС 1 к ЭС 2 может быть связано с углублением сна. Наконец, переход от ЭС 2 к ЭС 3 в контрольной группе может указывать на эффективность процедуры электросна и на то, что физиологические функции животных уже успели восстановиться. Снижение ЧД при переходе от ЭС 2 к ЭС 3 в экспериментальной группе объясняется действием стимулирующего вещества, которое увеличивает длительность восстановительных процессов.

Динамика ЧСС в двух группах животных отличается от динамики ЧД (рис. 2). Так, в контрольной группе

ЧСС на этапе покоя и первичного действия электросна отличается мало, но видна тенденция к уменьшению значений этого показателя. Дальнейшее продолжение процедуры ритмической стимуляции приводит к хорошо различимому снижению ЧСС, показатели которой остаются постоянными в течение всех остальных этапов эксперимента – и во время электросна, и во время пробуждения. Следовательно, по данным ЧСС, в контрольной группе кроликов воздействие электросна обнаруживается более явно на третьем этапе эксперимента, когда воздействие электросна продолжается более 5 мин.

В экспериментальной группе животных также наблюдается уменьшение значений ЧСС при переходе от состояния покоя к состоянию, вызванному воздействием электросна. Затем, при продолжении стимуляции, значение ЧСС увеличивается и остается практически неизменным на всех последующих этапах. Сходным в двух группах является стабильность значений ЧСС

на трех последних этапах эксперимента: ЭС 2, ЭС 3 и во время пробуждения. Электросон вызывает постепенное, вначале плохо различимое, уменьшение значений ЧСС в контрольной группе и очевидное снижение ЧСС при переходе от состояния покоя к ЭС 1 в экспериментальной группе (рис. 2). Различная динамика ЧСС на первых этапах эксперимента и в целом более низкие значения ЧСС в контрольной группе могут являться следствием стимулирующего действия кофеина.

Комплексный анализ ЧД и ЧСС не выявил схожих тенденций в динамике этих показателей, при этом наблюдаются различные тенденции их совместного изменения у животных разных групп. В контрольной группе кроликов при переходе из состояния покоя к ЭС 1 оба показателя снижаются, продолжение воздействия электросна (переход от этапа ЭС 2 к ЭС 3) снижает значения ЧСС при увеличении ЧД. Далее наблюдается схожая динамика на последних трех этапах



Рис. 2. Сравнительная диаграмма частоты сердечных сокращений в экспериментальной и контрольной группах животных до, после и при действии электросна.

эксперимента: увеличение с последующим снижением обоих показателей. В экспериментальной группе кроликов при переходе от первого этапа ко второму наблюдается снижение обоих показателей с их дальнейшим увеличением при переходе к третьему этапу (ЭС 2) и еще большее увеличение на этапе ЭС 3. Переход от третьего к четвертому и пятому экспериментальным этапам характеризуется противоположными тенденциями в изменениях этих показателей. ЧСС сначала увеличивается, затем уменьшается, а ЧД – снижается, а затем увеличивается.

Так, разнонаправленные изменения ЧСС и ЧД в контрольной группе наблюдаются при переходе от ЭС 2 к ЭС 3, в экспериментальной группе противоположные тенденции в динамике ЧСС и ЧД наблюдаются при переходе от этапа ЭС 2 к ЭС3 и к пробуждению. Это может указывать на различия в регуляторных процессах состояния животных, находящихся или нет под дополнительным стимулирующим действием кофеина. Предположительно, рассогласование дыхательной и сердечной деятельности может указывать на включение компенсаторных механизмов. У животных контрольной группы активация этих механизмов наблюдается после действия электросна в течение 5 мин. Компенсаторные механизмы животных экспериментальной группы включаются после действия электросна в течение 10 мин. Такие различия, скорее всего, связаны со стимулирующим действием кофеина, вызывающим необходимость более длительного воздействия низкочастотной ритмической электростимуляции стимуляции для достижения сопоставимого тормозного эффекта.

Выводы

В работе была продемонстрирована возможность инициации состояния сна у животных, находящихся в состоянии активации и гиперактивации, на примере кроликов, с помощью процедуры электросна. Это указывает на то, что электросон является эффективным средством купирования гиперактивации и восстановления ресурсов организма после перегрузок.

Длительность воздействия низкочастотной ритмической электростимуляции следует увеличить на 5 мин для достижения тормозного эффекта на основные физиологические системы организма в состоянии гиперактивации по сравнению с состоянием активации. Сон у кролика в состоянии активации под действием физической нагрузки возникает не раньше, чем через 5 мин после начала воздействия низкочастотной ритмической электрической стимуляции. У животных, находящихся под действием физической нагрузки и стимулирующего фармакологического вещества (состояние гиперактивации), тормозный эффект от воздействия электросна наблюдается только через 10 мин после начала электрической стимуляции.

Показана эффективность диагностики тормозного эффекта низкочастотной ритмической электростимуляции мозга на основные физиологические системы организма по показателям дыхательной и сердечной деятельности. Изменения функционального состояния животных было диагностировано с помощью показателей дыхательной (ЧД) и сердечной (ЧСС) деятельности. Оказалось, что показатель ЧД является более чувствительным к изменению функционального состояния животного по сравнению с ЧСС.

Список литературы

1. *Гиляровский В.А., Ливенцев Н.М., Сегаль Ю.Е., Кириллова З.А.* Электросон. - М.: Медгиз. 1958. 172 с.
2. *Гурленя А.М., Бабель Г.Е., Смычек В.Б.* Физиотерапия в неврологии. - М.: Медицинская литература. 2008. 296 с.
3. *Пинчук Д.Ю.* Транскраниальные микрополяризации головного мозга. - СПб.: Человек. 2007. 496 с.
4. *Пономаренко Г.Н.* Физические методы лечения. - СПб. 2002. 344 с.
5. *Ушаков А.А.* Практическая физиотерапия. - М.: Медицинское информационное агентство. 2009. 608 с.
6. *Чайванов Д.Б., Станкова Н.В.* Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели // Биомедицина. 2013. № 4. С. 164-168.
7. *Шелякин А.М., Пономаренко Г.Н.* Микрополяризация мозга. - СПб.: Балтика. 2006.

Modeling in laboratory animals of physiotherapeutic methods of reduction nervous system hyperactivation after physical activity and psychological stress including on the background of the chemical stimulant action

A.E. Emeliyanova, A.A. Emeliyanov, N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina, E.B. Shustov, G.D. Kapanadze

The main method of support of high level human efficiency in extreme condition was using pharmacological psychostimulating agents in practice of emergency and disaster medicine. As a result of high level stress effect as known probability of superfluous stimulatory action had lead to nervous system hyperactivation. Possibilities of reduction nervous system hyperactivation after physical activity and mental stress by transcranial electrocerebral rhythmical stimulation methods on the background of the stimulant action or without it modeling in laboratory rabbits discussed in this article. We had been shown on basis of heart and respiratory activity indices effectiveness of diagnostics of inhibitory effect on physiological system by the low-frequency rhythmical electrical subcortical brain stimulation. Respiration rate was more sensible to changes of animal functional status then heart rate. Duration of electrocerebral stimulation should increase by 5 min minimally subject to nervous system hyperactivation as compared with normal condition.

Key words: electrical sleep, rhythmical stimulation of subcortical brain structures, the low-frequency rhythmical electrical stimulation, laboratory animals.

Компьютерный дизайн ингибиторов протеинкиназы MST1 – прямого регулятора апоптоза β -клеток

К.М. Пац¹, Е.В. Федорова¹, M.S. Johnson², Xiang-Guo Li³

¹ – ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

² – Aboakademi university, Turku, Finland

³ – University of Turku and Turku PET Centre, Turku, Finland

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

С целью поиска активных соединений, способных оказывать ингибирующее действие на протеинкиназу MST1 (Mammaliansterile 20-like kinase 1), мы провели компьютерный дизайн, применяя методы, основанные на структуре макромолекулы-мишени (Target-Based Drug Design), и методы, основанные на структуре лигандов (Ligand-Based Drug Design). Для оценки нежелательных эффектов использовали программу PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), для построения количественных зависимостей «структура-активность» QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) и оценки ингибирующей активности – компьютерную программу GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships). В результате эксперимента было отобрано 6 потенциальных ингибиторов MST1, относящихся к различным классам органических соединений.

Ключевые слова: сахарный диабет, ингибиторы MST1, insilico, QSAR, PASS, GUSAR.

Введение

В настоящее время сахарный диабет 1 типа (СД1) рассматривается как полигенное, мультифакторное заболевание, при котором генетическая предрасположенность в сочетании с триггерами окружающей среды запускает активацию специфических аутоиммунных процессов, приводящих к гибели β -клеток. Ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунного поражения β -клеток поджелудочной железы являются дисрегуляция иммунитета и программированная гибель клеток. Основными в развитии заболевания становятся нарушения процессов инициации и реализации апоптоза [2, 6, 7]. Лечение, направленное на подавление инициации процесса апоптоза, является

перспективным. Белок MST1 (рис. 1) недавно был идентифицирован как ключевой медиатор клеточного апоптоза, а последние исследования показали, что он может служить в качестве мишени для разработки новых препаратов для лечения диабета. MST1 активируется в бета-клетках мышей и человека, индуцируя митохондриально-зависимый путь развития апоптоза. MST1 фосфорилирует транскрипционный фактор PDX1, необходимый для созревания β -клеток и развития поджелудочной железы, тем самым вызывая его деградацию и нарушение секреции инсулина (PDX1 активирует несколько генов, связанных с метаболизмом глюкозы, в т.ч. инсулина, и PDX1 мутации связаны с развитием диабета в детском возрасте).

При дефиците MST1 полностью восстанавливается нормогликемия, функция бета-клеток и их выживаемость в пробирке и в естественных условиях [5].



Рис. 1. Структура Mammalian Sterile 20-like kinase 1 (MST1).

Среди различных свойств химических соединений биологическая активность занимает особое место, поскольку ее наличие может стать основанием для применения веществ в медицине. С другой стороны, проявление соединением побочных и токсических эффектов является препятствием для использования химических соединений в практике. Таким образом, крайне важно оценить на ранних стадиях исследования возможное наличие у химических соединений как полезных фармакологических свойств, так и токсических эффектов. Компьютерные методы дизайна лекарств позволяют во многих случаях ограничить пространство исследования сравнительно небольшим числом мишеней (видов биологической активности). Компьютерное выявление активных структур органических молекул в отношении протеинкиназы MST1 про-

дили, используя методы, основанные на структуре макромолекулы-мишени TBDD (Target-Based Drug Design), и методы, основанные на структуре лигандов LBDD (Ligand-Based Drug Design).

Материалы и методы

Исследование *in silico*. Прогнозирование профиля биологической активности и оценка нежелательных эффектов 4337 химических соединений (находящихся в свободном доступе и зарегистрированных в международном регистре CAS) проводились с помощью компьютерной программы PASS (Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PASS № 2006613275 от 15 сентября 2006 г., Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам). Использование PASS позволяет получить оценки наиболее вероятных видов биологической активности химических соединений уже на стадии планирования их синтеза. В обучающей выборке PASS версии содержится около 250 тыс. БАВ, и с ее помощью возможен прогноз около 4000 фармакологических эффектов, механизмов действия, мутагенности, канцерогенности и т.д. со средней точностью около 95% (скользящий контроль с исключением по одному). Детальное описание методики компьютерного прогнозирования спектров биологической активности представлено в работах [8, 10]. Полученный спектр биологической активности отражает результат взаимодействия химического соединения с различными биологическими объектами. Результаты предсказания основаны на информации о структуре хи-

Параметры QSAR моделей

	N	R2	F	SD	Q2	V
Модель 1 (lgIC50)	24	0,917	9,045	0,542	0,814	5
Модель 2 (% ингибирования)	185	0,684	11,138	13,788	0,613	18

Примечания: N – количество соединений в обучающей выборке; R2 – коэффициент детерминации; F – критерий Фишера; SD – стандартное отклонение; Q2 – коэффициент корреляции; V – число переменных в конечном регрессионном уравнении.

мического соединения, описываемой в виде MNA-дескрипторов (Multilevel Neighborhoods of Atoms – множественные атомные окрестности), и прогнозируемых для него видах биологической активности с оценками вероятности проявления активности: P_a – соединение активно; P_i – неактивно. Соединения отбрасывали при наличии в спектре нежелательных эффектов (мутагенность, тератогенность, канцерогенность, раздражающее действие).

Количественный прогноз ингибирующей активности на мишень MST1 был выполнен в программе GUSAR, в которой, помимо MNA-дескрипторов, вводятся QNA-дескрипторы (Quantitative Neighborhoods of Atoms – количественные атомные окрестности). Для построения QSAR-моделей с приемлемыми статистическими характеристиками ($R^2 > 0,6$, $Q^2 > 0,5$) [9] можно использовать консенсусные модели, объединяющие QSAR-модели, построенные как на одном определенном типе, так и на обоих типах дескрипторов (QNA или MNA). Для построения QNA и MNA моделей нами использовались тестовые выборки соединений с уже известными количественными

характеристиками, находящиеся в свободном доступе информационной системы BRENDA. Окончательная предсказательная оценка строилась с учетом средневзвешенных предсказанных значений от каждой полученной QSAR модели. Таким образом, было создано две консенсусные модели (табл. 1), экспериментальные данные в которых были представлены значениями IC50 (мМ) (обучающая выборка – 24 структуры, значения были переведены в логарифмы) и % ингибирования MST1 (обучающая выборка – 185 структур). Для прогноза использовали только модели, отвечающие указанным выше статистическим характеристикам.

В качестве референтного соединения был выбран стауроспорин (рис. 2), не обладающий выраженной селективностью по отношению к какому-либо соединению семейства неспецифических серин-треониновых киназ [4]. Стауроспорин был отобран обеими моделями как потенциальный ингибитор MST1. Значение логарифма IC50 для него составило $2,5 \times 10^{-6}$, а значение процента ингибирования – 40% (модель 2), что совпадает с уже известными данными [3].

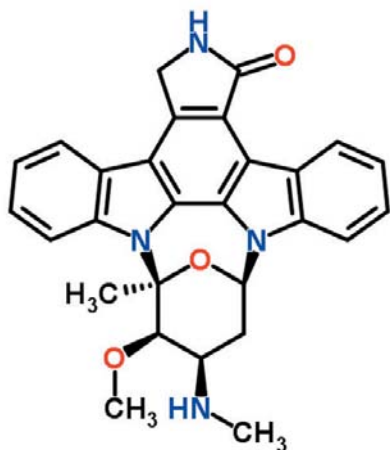


Рис. 2. Структурная формула стауроспорина.

На рис. 3 представлен пример оценки органических соединений с помощью программы GUSAR: слева изображена структура прогнозируе-

мого исследуемого вещества; справа – консенсусная модель, построенная на соединениях из обучающей выборки; справа сверху указаны параметры модели; слева сверху – предсказанная активность для исследуемого соединения (в нашем примере 45% ингибирования).

С целью оценки селективности отобранных соединений на родственные киназы (PAK1, PAK4, PIM1, GSK3-beta) нами был осуществлен молекулярный докинг отобранных органических соединений в активный центр белка-мишени. Молекулярный докинг проводили, используя программу предсказания белок-лигандных взаимодействий AutoDockVina. Критерием оценки взаимодействия между иссле-

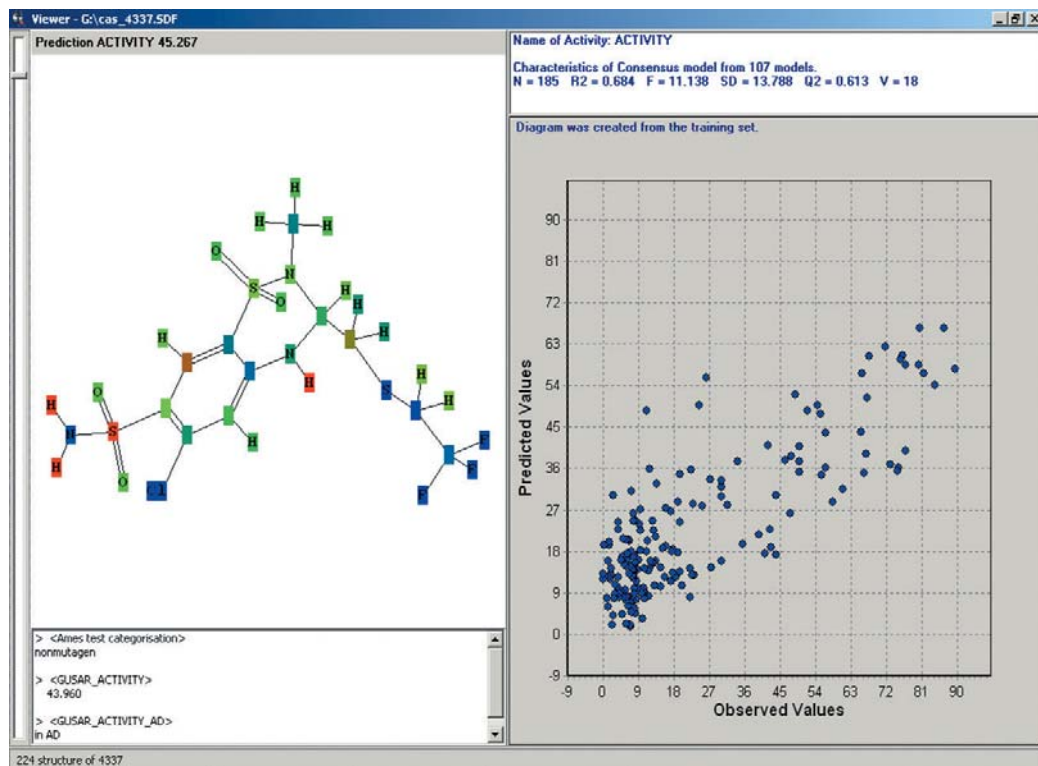


Рис. 3. Пример предсказания активности с помощью GUSAR (модель 2).

двумя соединениями и мишенью служила величина оценочной функции (скоринг-функция), выраженная в ккал/моль и определяемая как энергия взаимодействия лиганда с ферментом. Также учитывали пространственный характер связывания вещества с мишенью посредством образования связей с ключевыми аминокислотами в сравнении с известными референтными ингибиторами.

Результаты и их обсуждение

Методами QSAR, используя модели 1 и 2, из 4337 CAS структур было отобрано 55 органических соединений, которые показали высокую ингибирующую активность. Среди 55 структур,

отобранных двумя моделями, 9 совпали по химическому строению. Таким образом, для дальнейшего рассмотрения были отобраны 9 соединений, маркированные следующими номерами в базе данных CAS: **#163**, **#224**, **#497**, **#935**, **#1091**, **#1187**, **#1220**, **#1224**, **#3446**. Темным шрифтом выделены соединения, для которых программой PASS прогнозировались нежелательные эффекты, которые также были исключены из дальнейшего рассмотрения. Структурные формулы шести оставшихся в рассмотрении соединений, которые по нашим оценкам должны проявлять ингибирующую активность, приведены на рис. 4.

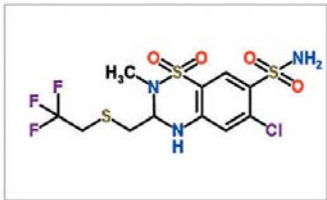
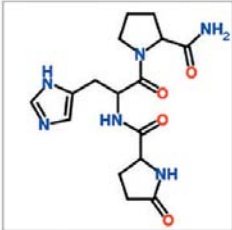
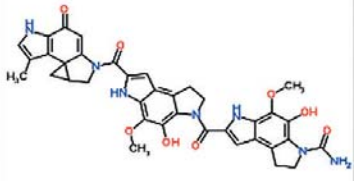
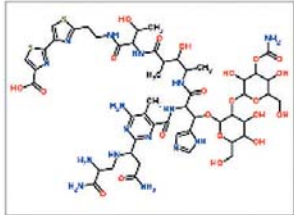
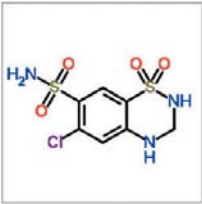
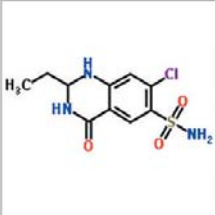
		
#224	#497	#1091
		
#1187	#1220	#1224

Рис. 4. Структуры соединений из базы CAS.

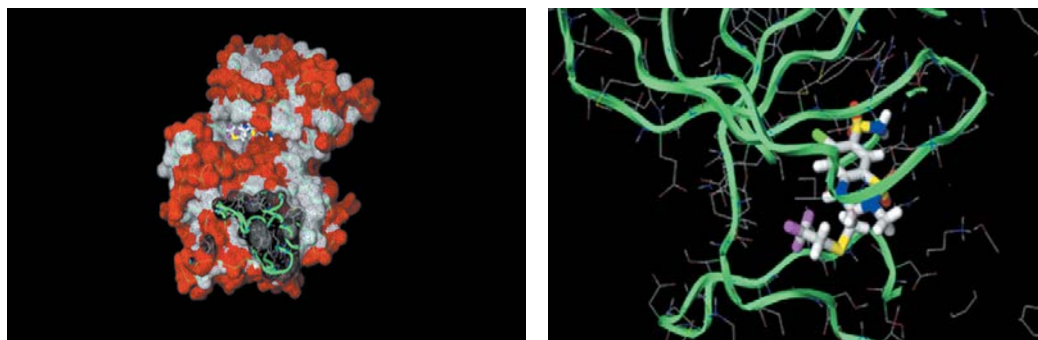


Рис. 5. Пример оценки селективности отобранных соединений с помощью молекулярного докинга (соединение #224, мишень – PAK1). Слева изображена поверхность белка-мишени, справа – связывание лиганда с мишенью крупным планом.

Согласно данным молекулярного докинга (рис. 5), отобранные соединения, как и референтное, не проявляют селективного действия в отношении родственных киназ. Величины скоринг-функции оказались практически одинаковыми для всех лигандов в отношении всех мишеней (PAK1, PAK4, PIM1, GSK3-beta).

Выводы

С помощью компьютерных методов, применяющихся для дизайна биологически активных соединений и лекарственных средств, нам удалось осуществить поиск потенциальных ингибиторов протеинкиназы MST1, являющейся ключевым медиатором клеточного апоптоза. На базе программ PASS и GUSAR были отобраны шесть активных структур, способных, по нашим прогнозам, эффективно ингибировать MST1, не проявляя при этом нежелательных эффектов. Для данных веществ прогнозируется достаточно высокая активность по сравнению с референтными соединениями, поэтому можно сделать вывод о целесообразности их синтеза и *in vitro* скрининга. Ранее такой комбинированный подход, основанный на сочетании

in silico и *in vitro* методов, показал эффективность при поиске потенциальных ингибиторов сериновых протеаз [1].

Список литературы

1. Баранова Н.И., Алексеева П.А., Чистяков К.С., Юсковец В.Н., Оковитый С.В., Бурякина А.В., Федорова Е.В. Поиск синтетических антикоагулянтов – ингибиторов сериновых протеаз: сочетание *in silico* и *in vitro* методов // Биомедицина. 2014. № 2. С. 17-24.
2. Пекарева Е.В., Никонова Т.В., Смирнова О.М. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа // Сахарный диабет. 2010. № 1. С. 45-49.
3. Akita S., Umezawa N., Kato N., Higuchi T. Array-based fluorescence assay for serine/threonine kinases using specific chemical reaction // Bioorg Med Chem. 2008. V16. № 16. P. 7788-94.
4. Anand R., Maksimoska J., Pagano N., Wong E.Y., Gimotty P.A., Diamond S.L., Meggers E., Marmorstein R. Toward the Development of a Potent and Selective Organoruthenium Mammalian Sterile 20 Kinase Inhibitor // J. Med. Chem. 2009. № 52. P. 1602-1611.
5. Ardestani A., Paroni F., Azizi Z., Kaur S., Khobragade V., Yuan T., Frogne T., Tao W., Oberholzer J., Pattou F., Kerr J. Conte & Kathrin Maedler Nature Medicine. 2014. № 20. P. 385-397.
6. Fedorova E., Buryakina A., Zakharov A., Filimonov D., Lagunin A., Poroikov V. Design Synthesis and Pharmacological Evaluation of

- Novel Vanadium-Containing Complexes as Antidiabetic Agents // PloS one. 2014. DOI10.1371 / Journal. pone. 0100386.
7. *Fedorova E.V., Buryakina A.V., Vorobieva N.M., Baranova N.I.* The vanadium compounds: Chemistry, synthesis, insulinomimetic properties // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013. V. 7 (4). P. 259-270.
 8. *Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V.* Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource // Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2014. № 50 (3). P. 444-457.
 9. *Filimonov D.A., Zakharov A.V., Lagunin A.A., Poroikov V.V.* QNA based 'Star Track' QSAR approach // SAR QSAR Environ. Res. 2009. № 20. P.679-709.
 10. *Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V.* QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction // Mol. Informatics. 2011. № 30 (2-3). P. 241-250.

Computer design of inhibitors of protein kinase MST1 – the key regulator of apoptosis of β-cells

K.M. Pats, E.V. Fedorova, M.S. Johnson, Li Xiang-Guo

At present time, diabetes is regarded as polygenic, multifactorial disease: genetic predisposition in combination with environmental triggers activates specific autoimmune processes, which lead to the death of β-cells. Therefore, violations in the processes of initiation and implementation of apoptosis are fundamental in the development of the disease. Preservation or restoration of pancreatic β-cells in diabetic patients is an ultimate therapy for diabetes, but is an unmet medical challenge. Protein kinase MST1 has been recently identified as a key mediator of cell apoptosis, and recent studies have shown that it could serve as a target for developing new drugs to treat diabetes. In order to find active compounds capable to inhibit MST1 (Mammalian sterile 20-like kinase 1), we carried out a computer-aided design, using methods based on the structure of macromolecule-target (Target-Based Drug Design) and methods based on the structure of ligands (Ligand-Based Drug Design). To assess the undesirable effects we used the computer program PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances); for construction of quantitative relationships «structure-activity» (Quantitative Structure-Activity Relationship) and evaluation of inhibitory activity computer program GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships) was used. As a result of experiment, 6 potential inhibitors of MST1 were selected. These compounds do not exhibit mutagenic or toxic properties but have high level of activity in comparison with already known inhibitors. This fact makes it possible to suppose, that our compounds are suitable for future synthesis and *in vitro* screening.

Key words: diabetes mellitus, inhibitors of MST1, *in silico*, QSAR, PASS, GUSAR.



Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием

Е.Б. Шустов¹, В.Н. Каркищенко¹, Х.Х. Семёнов¹, С.В. Оковитый²,
В.Ц. Болотова², В.Н. Юсковец²

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

² – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава РФ, Санкт-Петербург

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

Выполнен статистический анализ закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений, являющихся солями энергодающих кислот цикла Кребса. По уровню антигипоксической активности исследуемые соединения сопоставимы с Пирацетамом и Предукталом. Показано, что выбор аниона существенно влияет на эффективность антигипоксического действия таких солей. Наиболее активными соединениями были сукцинат и L-малат. Антигипоксическая активность L-малата в 1,5 раза превосходит активность соответствующей рацемической соли.

Ключевые слова: антигипоксическая активность, ноотропы, антигипоксанты, кислоты цикла Кребса.

Введение

По данным ВОЗ, количество астений и астеноподобных состояний за последние 65 лет выросло в 24 раза, а в США достигло 25 млн человек. В роли провоцирующих факторов, вызывающих заболевание или способствующих его обострению, выступают стрессовые ситуации, воздействие избыточного информационного потока, рассогласование циркадианных ритмов, влияние неблагоприятных климатических факторов, вибрация, воздействия высокочастотных электромагнитных полей, острые

вирусные респираторные или очаговые инфекции, хронические интоксикации (в т.ч. – алкогольные), последствия черепно-мозговых травм и нейроинфекций, эндокринный дисбаланс в периоды возрастной гормональной перестройки. Отдельной актуальной медицинской проблемой стал «синдром хронической усталости», частота встречаемости которого в мире достигает 30% всего взрослого населения.

Основной группой препаратов, используемых для лечения астенических состояний любого генеза, являются но-

отропные средства. Несмотря на достаточно большую историю этой группы лекарственных препаратов (более 50 лет), их арсенал является явно недостаточным. Основными представителями группы являются производные Пирролидона (Пирацетам, Анироцетам, Оксипирацетам, Прамирацетам), а также нейропептиды и их аналоги (Семакс, Тиролиберин, Церебролизин, Кортексин, Ноопепт). Их существенными недостатками являются необходимость длительного (часто – многомесячного) приема до начала отчетливых проявлений ноотропного и антиастенического действия, неуниверсальность и нестабильность эффекта при различных причинах и механизмах формирования астенических состояний. В связи с этим, задача разработки новых более эффективных ноотропных и антиастенических средств является актуальной не только для отечественного, но и для мирового здравоохранения.

Для многих нейротропных лекарственных средств, являющихся производными аминокислот (Пантогам, Фенибут, Аминалон, Фенотропил, Деанола Ацеглумат), и предшественников холина (Деанол, Панклар, Центрофеноксин, Тонибрал, Глиагилин, Нооклер) характерны эффекты ноотропных препаратов. Частичные свойства ноотропов проявляют препараты, улучшающие энергетические возможности нейронов (цереброваскулярные препараты, антиоксиданты, антигипоксанты, производные янтарной кислоты, энергодающие субстраты, предшественники нуклеотидов).

При анализе химической структуры препаратов с отчетливыми ноотропными и антиастеническими свойствами

можно выделить наличие фармакофорной группировки предшественника холина в эфирной связи с аминокислотами. Новые производные эфиров предшественников холина могут стать основой для формирования широкого ряда нейротропных лекарственных средств с ноотропным и антиастеническим действием, существенной стороной которого будет повышение устойчивости организма к гипоксическому воздействию. По аналогии с известными антигипоксантами и антиоксидантами (Амтизола сукцинат, Мексидол, Реамберин), соль такого основания с интермедиатами цикла Кребса должна оказывать более выраженное действие, чем исходное основание.

Цель работы – изучить закономерности, характеризующие влияние анионов-остатков энергодающих кислот цикла Кребса на антигипоксическую активность солей этих кислот, основанием в которых выступает эфирное производное предшественника холина.

Материалы и методы

Исследуемые соединения (эфирное производное предшественника холина в качестве основания, и его сукцинатная, малатная и кетоглутаровая соли) были синтезированы на кафедре органической химии Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии (заведующий кафедрой – профессор Яковлев И.П.). В качестве препаратов сравнения использовались аптечные препараты Пирацетам (производства ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА») и Триметазидин (Продуктал МВ, производства ООО «Сердикс» – аффилированной компании Servier).

Объектами исследования послужили белые лабораторные крысы Wistar массой 200-220 г. Опытные группы животных содержали по 5 особей обоего пола, контрольная группа – по 15 особей обоего пола. Животные были получены из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание животных осуществлялось в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и с Руководством [3].

Гипоксическое воздействие создавалось подъемом лабораторных животных в барокамере проточного типа на «высоту» 11500 м при скорости подъема 165 м/с. В ходе пребывания животных на «высоте» регистрировались индивидуальные показатели гипоксической устойчивости (время жизни, время сохранения и восстановления позы) с расчетом бального комплексного показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии, характеризуемого нормальным статистическим распределением [1, 2].

Исследуемые препараты и препараты сравнения вводились животным после растворения в воде для инъек-

ций, внутривенно с помощью зонда, в объеме 0,2 мл, за 1 ч до начала барокамерного исследования. Контрольные животные получали эквивалентное количество физиологического раствора. Исследуемые препараты вводились в дозе 25 мг/кг, препараты сравнения – в дозах, эквивалентных среднему терапевтическому для человека (Пирацетам – 120 мг/кг, Предуктал – 0,5 мг/кг).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методом дисперсионного факторного анализа (пакет анализа для табличного процессора Microsoft Excel).

Результаты и их обсуждение

Профилактическое введение (за 1 ч до барокамерного воздействия) исследуемых препаратов и препаратов сравнения обеспечивало выраженную защиту мозга животных от гипоксического воздействия (табл. 1, рис. 1).

Анализ табл. 1 показывает, что соли эфирного производного предшественника холина и энергодающих кислот цикла Кребса проявляют антигипоксическую

Таблица 1
Влияние профилактического введения препаратов на время жизни животных на критической высоте

Препарат	Время жизни, сек	% от контроля	Коэффициент вариации (КВ)	Степень влияния (D)	Достоверность различий (p)
Контроль	231±34	100	0,81	-	-
Пирацетам	1416±256	612	0,57	0,60	4*10 ⁻⁹
Предуктал	1039±142	450	0,43	0,64	8*10 ⁻¹⁰
R-основание	432±101	187	0,74	0,135	0,02
R-сукцинат	1475±249	638	0,53	0,64	7*10 ⁻¹⁰
R-кетоглутарат	681±49	295	0,23	0,55	5*10 ⁻⁸
R-DL-малат	629±201	272	1,01	0,20	0,004
R-L-малат	926±182	401	0,62	0,48	9*10 ⁻⁷

активность, сопоставимую с антигипоксической активностью референс-препаратов Пирацетам и Предуктала. Однако обращает на себя внимание высокая степень индивидуальной вариативности эффекта (высокие значения коэффициента вариации). Следовательно, для части животных антигипоксическая активность может оказаться недостаточной, несмотря на высокий, в целом, уровень влияния препарата на показатель времени жизни. Это может быть связано с тем, что сам показатель времени жизни на высоте не является оптимальным, так как параметры его статистического распределения далеки от параметров нормального распределения и отражают вариативность экстремальности воздействия на отдельных животных.

Как было показано ранее [2], статистически более надежную картину, позволяющую проводить сопоставление разных серий исследования и популяционную экстраполяцию полученных результатов, дает показатель «индекс устойчивости гипоксии» (ИУГ), определяемый на основе нормализованных балльных оценок трех показателей, характеризующих устойчивость животных к гипоксии (время жизни на высоте,

время первого падения (период поддержания позы) и время восстановления позы после прекращения гипоксического воздействия).

Сопоставление результатов проведенных исследований по показателю ИУГ представлено на рис. При этом необходимо отметить, что коэффициент вариации для отдельных подгрупп животных находится в диапазоне 0,10-0,30, и только в контрольной группе достигает уровня 0,40.

Отличия от контроля были достоверны для всех препаратов, кроме R-основания. Наиболее активной из изученных солей эфирного производного предшественника холина в модели острой гипоксической гипоксии была янтарнокислая соль.

Наличие достаточно высокого разброса между средними значениями антигипоксической активности отдельных препаратов по показателю времени жизни на критической высоте (табл. 1) позволило выполнить факторный анализ значимости основания и анионного компонента солей в их суммарной антигипоксической активности. Результаты выполненного двухфакторного анализа представлены в табл. 2.

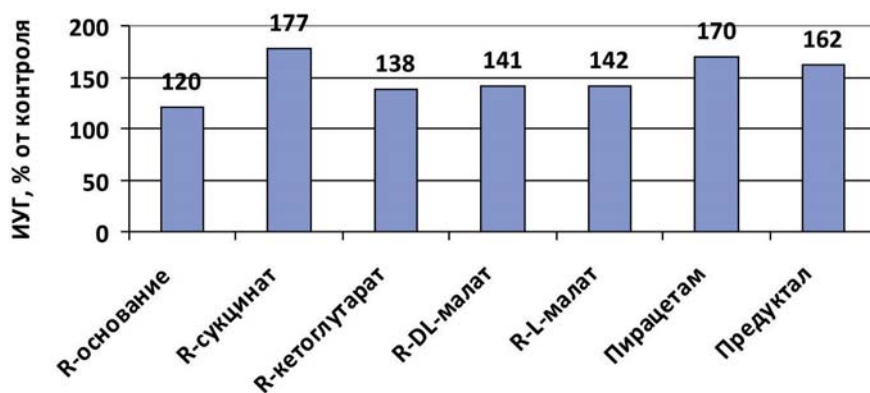


Рис. Антигипоксическая активность исследованных препаратов по показателю ИУГ.

Таблица 2

Результаты двухфакторного анализа антигипоксической активности энергодающих солей кислот цикла Кребса и диметиламиноэтанольного эфирного производного

Наименование фактора	Влияние фактора (D)	Достоверность модели (p)
Фактор А – основание	0,135	0,02
Фактор В – кислотный остаток	0,270	0,004
Взаимодействие факторов А*В	0,025	0,78
Итого контролируемые факторы	0,43	$6 \cdot 10^{-8}$
Неконтролируемые факторы	0,53	

Таким образом, состав изучаемых солей является значимым фактором, достоверно объясняющим 43% всей вариативности индивидуальных показателей времени жизни животных на критической высоте. Значимость кислотного остатка в антигипоксической активности изученных солей в 2 раза превышает значимость основания (0,270 и 0,135 соответственно). Однако превалирующее значение имеют неконтролируемые факторы (53% всей вариативности индивидуальных значений времени жизни животных на критической гипоксии).

К числу таких неконтролируемых факторов может относиться разный исходный уровень индивидуальной резистентности животных к гипоксии. Его нивелирование представляет значительные методические трудности (например, проведение предварительного барокамерного подъема на некритическую высоту и отсев животных с резко сниженной устойчивостью к гипоксии, использование специально выведенных линий животных с заданным уровнем устойчивости к гипоксии).

Возможно, некоторое значение может иметь и фактор дозы. Несмотря на то, что в эксперименте использовалась стандартная дозировка 25 мг/кг, с учетом разного молекулярного веса кис-

лотного аниона, в эффективное межмолекулярное взаимодействие у разных препаратов могло вступать разное число молекул соединения. Вероятно, в сериях исследований с применением различных фармакологически активных веществ более сопоставимые результаты могут быть получены при использовании молярного принципа дозирования, чем концентрационного.

К категории не учтенных в данном эксперименте факторов может быть отнесен и фактор изомерии анионов. Так, в работе изучались две яблочнокислые соли – рацемический DL-малат и изомерный L-малат. Установлено, что антигипоксическая активность L-малата в 1,5 раза выше рацемической соли. Дисперсионный факторный анализ, выполненный по этим двум подгруппам, показал, что фактор изомерии анионов определяет 6% общей вариации показателя времени жизни животных на критической высоте. Данное влияние не имело статистически достоверного характера ($p=0,29$). Однако при включении в исследование возможных изомерных анионов других солей, за счет увеличения числа наблюдения, уровень достоверности может выйти, как мы предполагаем, на статистически значимый уровень.

Выводы

1. Новые синтетические соединения – соли энергодающих кислот цикла Кребса и эфирного производного предшественника холина проявляют антигипоксическую активность, сопоставимую с Пирацетамом и Предукталом.

2. В реализации антигипоксической активности таких солей анион (кислотный остаток) играет существенную и достоверную роль. С ним связано, в среднем, 27% всей вариативности времени жизни животных на критической высоте.

3. Вклад в антигипоксическую активность солей основания – эфирного производного предшественника холина является статистически достоверным. Его степень влияния на вариативность времени жизни животных на критической высоте составляет 13,5%.

4. Янтарная соль эфирного производного диметиламиноэтанола проявляет более высокую, по сравнению с другими исследованными солями, антигипоксическую активность. Умеренная антигипоксическая активность, сопоставимая с референс-препаратами, также характерна для L-яблочнокислой соли.

5. В силу определенного параллелизма в антигипоксической и нейропротекторной активности, новые синтезированные соединения – соли энергодающих кислот цикла Кребса и эфирного производного предшественника холина могут быть перспективными объектами разработки лекарственных средств с ноотропной активностью, а также для изучения антигипоксической активности на иных моделях (например, ишемии миокарда, ишемии мозга, ишемии кожного лоскута и т.д.).

Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. 2013. № 1. С. 7-17.
2. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д. Лукьяновой. - М. 1990. 18 с.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
4. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семёнов Х.Х. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств // Биомедицина. 2013. № 4. С. 149-157.

Search of regularities, determining antihypoxic activity of the compounds with nootropic and neurotropic action

E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, S.V. Okovitiy,
V.Ts. Bolotova, V.N. Yuskovets

Statistical analysis of the laws that determine antihypoxic activity of the compounds, which salts energomash acids Krebs cycle was performed. The antihypoxic activity level of the studied compounds comparable with the level of Piracetam and Preductal. It was shown that the choice of anion substantially affects the efficiency of antihypoxic activity of such salts. The most active compounds were succinate and L-malate. L-malate antihypoxic activity in 1,5 times exceeds a corresponding activity of racemic salt.

Key words: antihypoxic activity, nootropics, antihypoxants, Krebs cycle acids.

Экспериментально-клинический анализ сравнительного влияния Вальдоксана и Флуоксетина на параметры фармако-ЭЭГ

О.М. Куделина, В.Б. Назаров, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, В.Г. Заика

ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контактная информация: Куделина Оксана Михайловна, kudelina@yahoo.com

Актуальность проблемы грамотной диагностики и лечения депрессий в медицинской практике не вызывает сомнений. Одним из достоверных методов оценки эффективности фармакотерапии этого заболевания является фармако-ЭЭГ. В эксперименте на крысах был проанализирован характер распределения ЭЭГ-ритмов головного мозга в условиях экспериментальной депрессии, в том числе на фоне введения антидепрессантов Вальдоксана и Флуоксетина. Установлено, что на фоне применения антидепрессантов увеличивается сопротивляемость животных, а также достоверно возрастает активность тета-ритма на ЭЭГ, который доминирует в норме. Произведен аналогичный анализ распределения ЭЭГ-ритмов у пациентов с депрессией, в том числе и на фоне фармакотерапии Вальдоксаном и Флуоксетином. При применении антидепрессантов отмечается значительное улучшение текущего состояния, а на ЭЭГ наблюдается правильное распределение альфа-ритма и уменьшение медленно-волновой активности головного мозга.

Ключевые слова: депрессия, ЭЭГ, Вальдоксан, Флуоксетин.

Введение

Депрессия – серьезное психоэмоциональное расстройство, как в развивающихся, так и в экономически развитых странах, от которого страдает до 21% населения в мире. Среди больных соматического профиля частота депрессий достигает, по разным данным, 22-33%, превосходя даже столь распространенное заболевание как артериальная гипертензия [5].

Наиболее востребованной для лечения депрессий, особенно в амбулаторных условиях, является, естественно, фармакотерапия, поскольку по сравнению с другими методами лечения, наряду с высокой эффективностью, обладает

наибольшей стойкостью отдаленных результатов [6]. Несмотря на огромный арсенал антидепрессантов (а на сегодняшний день их число на фармацевтическом рынке превышает уже сотню), проблема терапии депрессивных расстройств остается крайне актуальной [2].

В отличие от традиционных трициклических антидепрессантов, применение селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) с практической точки зрения имеет целый ряд преимуществ: безопасность, лучшую переносимость, возможность направленного действия. А с научно-

исследовательских позиций это важно для четкой идентификации биологического субстрата, лежащего в основе патогенеза психического расстройства [6]. Одним из наиболее известных представителей СИОЗС на сегодняшний день является Флуоксетин.

Еще одним примером появившихся за последние годы антидепрессантов является Агомелатин (Вальдоксан). Агонизм по отношению к мелатониновым MT_1 - и MT_2 -рецепторам у этого препарата сочетается с селективным антагонизмом к серотониновым $5-HT_{2C}$ -рецепторам. Согласно результатам экспериментальных исследований, подобное сочетание мелатонинергической активности и антагонизма к $5-HT_{2C}$ рецепторам потенциально синергично и является основой выраженного антидепрессивного эффекта Агомелатина [8, 16].

Учитывая, что анализ биоэлектрической активности головного мозга является одним из основных инструментов изучения нейробиологических основ нарушений психической деятельности при различных заболеваниях ЦНС [3], в качестве важного метода прогнозирования эффективности фармакотерапии депрессии может выступать количественная фармако-ЭЭГ, позволяющая неинвазивным путем получить информацию о действии того или иного лекарственного вещества [1, 7, 10, 11, 17]. Поэтому применение ЭЭГ для предикции эффективности планируемой фармакотерапии является ныне вполне обоснованным и рациональным.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на 90 белых нелинейных крысах-самцах в возрасте 3,5-4 мес., массой 150-200 г.

Животные содержались в условиях вивария при естественном режиме освещения, температуре воздуха $20 \pm 2^\circ C$ и влажности 55-60% в пластиковых клетках размером $55 \times 45 \times 15$ см, с подстилкой из древесных опилок. Крысы потребляли гранулированный комбикорм и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. По истечении 7 дней карантина экспериментальных животных забирала в эксперимент. Все эксперименты выполнялись в полном соответствии с рекомендациями по гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденными этическим комитетом РостГМУ.

По окончании карантина всех животных рассаживали в отдельные клетки и распределяли на 3 группы. Контрольную группу (группа К) составили 30 интактных животных. Оставшиеся 2 экспериментальные группы ($n=30$) в течение 4-х недель ежедневно подвергались воздействию стрессорных факторов. Далее им в область гиппокампа (ГК) и соматосенсорной коры (ССК) вживлялись микроэлектроды и начиналось введение лекарственных препаратов (ЛП). Ежедневно крысы группы Ф получали Флуоксетин ($0,3$ мг/кг *per os*), а группы В – Вальдоксан ($0,5$ мг/кг *per os*).

Моделирование депрессивного состояния у животных происходило в 3 этапа. На 1-ой неделе животных подвергали 2-часовой иммобилизации (ежедневно, однократно в сутки) в пластиковом контейнере. На 2-й неделе к ним применялся водно-иммерсионный холодовой стресс: крысы ежедневно на период 30 мин помещали в пластиковые контейнеры, которые затем вертикальном положении помещали в пустую емкость и медленно заполняли водой, температура которой

составляла 21°C, так чтобы тела животных были погружены в воду на 2/3. На 3–4-ой неделях использовалась комбинация обоих вышеупомянутых стрессоров (иммобилизации и водно-иммерсионного холодового стресса). Кроме того, на протяжении всех 4-х недель эксперимента животных подвергали также хронической световой экспозиции.

С целью верификации развития у животных депрессивного состояния проводили оценку поведенческой активности с помощью теста вынужденного плавания (по Porsolt R.D.).

В рамках проведения фармако-ЭЭГ анализа животным в область ССК и ГК симметрично с обеих сторон вживлялись микроэлектроды [15]. Операции проводились под эфирным наркозом при помощи стереотаксической установки СЭЖ-4 (производства Института физиологии им. А.А. Богомольца, Украина) и микроманипуляторов для погружения микроэлектродов; в лобной пазухе располагался референтный электрод. Фиксировали микроэлектроды с помощью стоматологической пластмассы холодной полимеризации «Протакрил». Электроэнцефалограмму (ЭЭГ) мозга у животных регистрировали с помощью энцефалографа-анализатора ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» (Россия). Спустя 3 суток после операции адаптированным животным начинали вводить изучаемые антидепрессанты. Регистрация ЭЭГ производилась 3-кратно: до, через 7 и 14 суток после приема ЛП. В контрольной группе К снятие ЭЭГ головного мозга производилось через 5 дней после операции.

Помимо экспериментальных, был проведен также набор клинических исследований, по итогам которых оценивалось действие вышеуказанных ЛП на

пациентов с депрессией средней степени тяжести. По результатам психиатрического скрининга в основное клинической исследование было включено 47 человек. После получения «информированного согласия» и постановки диагноза все пациенты были разделены на 2 клинические группы (по 15 в каждой), а также группу сравнения (n=17), которую составили здоровые добровольцы. По итогам первичной беседы производилась оценка текущего психического состояния пациентов при помощи шкалы общего клинического впечатления (CGI-I). Далее, на основании консультации психиатра, производилась постановка диагноза, снятие фоновой (до начала приема ЛП) ЭЭГ и включение больного в одну из клинических групп, определяющую назначение конкретного ЛП и режима его дозирования. В качестве критериев эффективности проводимой фармакотерапии учитывались данные шкалы CGI-I (до приема ЛП и 6 недель спустя) и результаты ЭЭГ, которую регистрировали у пациентов исходно, а также на 2-й и 6-й неделях лечения.

При экспериментальном и клиническом исследованиях анализировали показатели относительных значений спектральной мощности (ОЗМ) в % для Δ (дельта - 1-4 Гц), θ (тета - 5-7 Гц), α (альфа - 8-12 Гц) и β (бета - 13-30 Гц) частотных диапазонов ЭЭГ.

Для объективной оценки результатов использовался метод количественного анализа структуры ЭЭГ.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием общепринятых методов параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики при помощи пакета статистических программ Statistica 6.0 (Statsoft, USA).

Результаты исследований

В тесте вынужденного плавания продолжительность активного плавания составила $253,5 \pm 5,6$ с; пассивного плавания – $206,7 \pm 6,3$ с; длительность латентного периода была равна $122,6 \pm 5,9$ с; а периода иммобилизации (или «зависания») – $139,8 \pm 7,3$ с. По истечении 4-х недель воздействия на экспериментальных животных стрессорных факторов было отмечено достоверное изменение их поведенческой активности по сравнению с исходными значениями. Так, продолжительность активного плавания после воздействия стрессоров снизилась в 1,8 раза ($p < 0,01$) по сравнению с показателями нормы, продолжительность пассивного плавания – на 23,4% ($p < 0,01$), а латентный период – в 3,2 раза ($p < 0,01$); длительность иммобилизации животных, наоборот, значительно, в 2,2 раза ($p < 0,01$) возросла.

При сравнительном анализе на 7-е сутки применения изучаемых ЛП наименьшие проявления депрессивного поведения отмечались в группе крыс, получавших Вальдоксан (группа В). Продолжительность активного плавания в этой группе увеличилась в 1,5 раза ($p < 0,01$); в 2,9 раза ($p < 0,01$) возрос латентный период и продолжительность пассивного плавания, которая теперь составляла $180,5 \pm 9,4$ с. В свою очередь, длительность иммобилизации достоверно уменьшилась – до $200,2 \pm 7,8$ с ($p < 0,01$). В группе Ф, где крысы получали Флуоксетин, в этот же промежуток времени показатели данного теста тоже претерпели достоверные изменения, но по сравнению с группой В они были существенно меньше. Значения таких показателей как продолжительность активного ($168,3 \pm 8,2$ с) и пассивного ($201,2 \pm 9,1$ с) плавания были незначи-

тельно увеличены относительно аналогов при экспериментальной депрессии. Длительность латентного периода возросла всего в 1,7 раза, а периода иммобилизации – уменьшилась всего на 23% ($p < 0,01$) и составила $230,5 \pm 9,1$ с.

Анализируя результаты, полученные на 14-е сутки введения ЛП, мы наблюдали статистически достоверное увеличение продолжительности времени активного плавания и латентного периода практически во всех группах животных. Наиболее высокие показатели продолжительности активного плавания ($358,3 \pm 5,9$ с) были зафиксированы в группе В, которые даже превысили (на 41,3%; $p < 0,01$) значения нормы, аналогичным образом увеличилась и продолжительность латентного периода ($168,5 \pm 5,4$ с), которая превосходила соответствующие показатели в исходном состоянии в 1,4 раза ($p < 0,01$). Продолжительность пассивного плавания увеличилась незначительно – до $189,1 \pm 8,6$ с, а длительность иммобилизации достоверно сократилась в 2,6 раза – до $52,6 \pm 1,7$ с ($p < 0,01$).

У животных группы Ф в этот же промежуток времени было зафиксировано незначительное увеличение продолжительности активного плавания, которое практически сравнялось с исходными значениями. Длительность латентного периода соответствовала показателям контрольной группы, а пассивного плавания ($242,7 \pm 3,1$ с) – незначительно (на 17,5%), но превышала показатели нормы. В 1,5 раза ($p < 0,01$) уменьшилась относительно нормы и продолжительность периода иммобилизации ($89,8 \pm 2,5$ с).

Анализ ЭЭГ-показателей активности головного мозга крыс на фоне экспериментальной депрессии свидетельствовал о перераспределении ритмической

активности в пользу Δ-ритма, а при регистрации и анализе θ-ритма, наоборот, выявилось достоверное снижение его мощности (хотя в норме именно этот ритм является доминирующим в обеих зонах регистрации). α- и β-ритмы, в норме выраженные незначительно, при депрессии существенных изменений не претерпевали (табл. 1).

У крыс группы Ф на 7-е сутки регистрации ЭЭГ-ритмов изменения за-

ключались в достоверном уменьшении Δ- и незначительном возрастании θ-активности по отношению к показателям при депрессии. На 14-е сутки Δ-ритм прогрессивно снижался, а θ-ритм, наоборот, увеличивался, но оба они так и не достигли исходных данных. Также наблюдалось повышение β-активности, более выраженное в области ССК (в 3,3 раза; $p < 0,01$) по сравнению с ГК (в 2,6 раза; $p < 0,051$) (табл. 2).

Таблица 1

Сравнительная характеристика показателей ОЗМ (%) ЭЭГ-ритмов в зонах гиппокампа и соматосенсорной коры головного мозга крыс в исходном состоянии и при развитии депрессии

Локализация электродов	Ритмы ЭЭГ	Группа К	Депрессия
Гиппокамп	Δ	22,29±2,71	58,99±4,83**
	θ	60,95±4,06	29,27±3,65**
	α	7,00±0,38	5,61±0,26
	β	9,76±0,38	6,13±0,92
Соматосенсорная кора	Δ	27,43±2,34	52,80±3,02**
	θ	56,84±5,89	35,34±2,39**
	α	6,74±0,29	5,80±0,33
	β	8,99±0,34	6,24±0,36

Примечание:

* – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$);

** – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

Таблица 2

Сравнительный анализ показателей ОЗМ ЭЭГ-ритмов у крыс в группе Ф на 7-е и 14-е сутки введения Флуоксетина

Локализация электродов	Ритмы ЭЭГ	Группа К	Депрессия	7 сутки	14 сутки
Гиппокамп	Δ	22,29±2,71	58,99±4,83**	45,57±3,96**#	36,11±2,22***#
	θ	60,95±4,06	29,27±3,65**	38,05±3,14**	42,86±3,43***#
	α	7,00±0,38	5,61±0,26	7,56±0,64	6,51±0,55
	β	9,76±0,38	6,13±0,92	8,82±0,63	16,20±2,36***#
Соматосенсорная кора	Δ	27,43±2,34	52,80±3,02**	43,96±2,84***	34,80±2,00###
	θ	56,84±5,89	35,34±2,39**	40,54±3,50**	39,87±2,33**
	α	6,74±0,29	5,80±0,33	5,85±0,52	6,26±0,37
	β	8,99±0,34	6,24±0,36	8,65±0,42	20,79±2,51***

Примечание:

** – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе К ($p < 0,01$);

* – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе К ($p < 0,05$);

– статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе Д ($p < 0,01$);

– статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе Д ($p < 0,05$).

В группе В на 7-е сутки от начала введения Вальдоксана нами было зарегистрировано достоверное уменьшение Δ -ритма ($p < 0,05$), θ -ритм прогрессивно возрос, незначительные изменения в сторону увеличения претерпела β -активность (табл. 3). На 14-е сутки регистрации ЭЭГ головного мозга крыс в этой группе мы

отмечали, главным образом, доминирование θ -ритма и превышение его значений во всех регистрируемых отведениях (особенно в ГК). Δ -ритм практически достиг исходных значений, а β -ритм все также оставался увеличенным, преимущественно в отведении ССК (примерно в 1,6 раза; $p < 0,05$) (табл. 2).

Таблица 3

Сравнительная характеристика показателей ОЗМ ЭЭГ-ритмов у крыс в группе В на 7-е сутки и 14-е сутки введения Вальдоксана

Локализация электродов	Ритмы ЭЭГ	Группа К	Депрессия	7 сутки	14 сутки
Гиппокамп	Δ	22,29±2,71	58,99±4,83**	27,43±2,57##	14,43±3,57***
	θ	60,95±4,06	29,27±3,65**	44,28±3,65***	68,28±3,65##
	α	7,00±0,38	5,61±0,26	6,94±0,50	6,64±0,23
	β	9,76±0,38	6,13±0,92	10,45±0,69#	11,65±0,69#
Соматосенсорная кора	Δ	27,43±2,34	52,80±3,02**	23,90±1,82##	13,90±2,82***
	θ	56,84±5,89	35,34±2,39**	42,36±2,77*	63,46±3,71##
	α	6,74±0,29	5,80±0,33	6,99±0,45	5,69±0,68
	β	8,99±0,34	6,24±0,36	14,60±3,67***	16,95±3,67***

Примечание:

** – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе К ($p < 0,01$);

* – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе К ($p < 0,05$);

– статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе Д ($p < 0,01$);

– статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента по отношению к группе Д ($p < 0,05$).

Таблица 4

Сравнительная характеристика показателей ОЗМ (%) ЭЭГ-ритмов в разных отделах коры головного мозга у здоровых лиц и пациентов с депрессией

Локализация электродов	Ритмы ЭЭГ	Группа К	Депрессия
Затылочная область	Δ	9,28±2,94	41,11±5,69**
	θ	3,47±1,55	15,46±3,69**
	α	76,24±5,55	20,70±2,00**
	β	11,65±4,27	24,37±3,98*
Теменная область	Δ	7,36±2,53	37,61±4,68**
	θ	6,17±1,48	16,10±1,52**
	α	59,12±6,87	25,72±3,03**
	β	26,88±2,32	22,19±3,53
Центральная область	Δ	5,20±2,67	30,53±5,97**
	θ	4,54±1,60	8,49±1,78*
	α	33,06±5,38	46,26±6,09*
	β	57,88±7,49	14,80±3,15**
Фронтальная область	Δ	6,21±2,61	36,86±4,34**
	θ	4,09±1,47	7,29±1,81*
	α	25,28±3,85	47,68±6,61**
	β	64,90±7,90	8,17±2,08**

Примечание:

* – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$);

** – статистически достоверные различия по t-критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

В клинической части исследования при проведении сравнительного анализа результатов шкалы CGI-I стартовый суммарный балл до начала приема ЛП составил $3,5 \pm 0,5$ балла. Через 6 недель, на фоне проводимой фармакотерапии Флуоксетином, данный показатель у пациентов в группе Ф составил $2,1 \pm 0,6$ балла ($p < 0,05$) (интервал между 2 - «хорошее улучшение» и 3 - «минимальное улучшение»), что было на 40% ниже исходного. В группе В, получавшей Вальдоксан, суммарный балл был еще меньше – всего $1,4 \pm 0,4$ ($p < 0,01$) (интервал между 1 - «очень хорошее улучшение» и 2 - «хорошее улучшение»), то есть на 60% ниже.

Анализ данных ОЗМ ЭЭГ-ритмов у пациентов с депрессивным расстройством показал, что α -ритм, который у здорового человека доминирует в затылочной области, при депрессии угнетается и имеет неправильное распределение. Теперь его максимальная мощность наблюдалась во фронтальном отведении, а в области затылка его ОЗМ, наоборот, были минимальны. β -ритм при депрессии тоже имел аномальное распределение, поскольку в норме он превалирует во фронтальном отведении, а при депрессии доминировал в затылочной области. Для медленноволнового Δ -ритма было свойственно увеличение значений во всех регистрируемых отведениях, также наблюдалось повышение активности θ -ритма, особенно в затылочной и теменной областях.

На фоне фармакотерапии Флуоксетином у пациентов в группе Ф спустя 2 недели ОЗМ α -ритма изменялось незначительно. Все еще наблюдалось его неправильное распределение, а мак-

симальные значения мощности регистрировались во фронтальной области. Мощность β -ритма тоже оставалась достаточно низкой по отношению к исходным данным. Δ -ритм сохранял высокие значения ОЗМ, а θ -ритм приближался к нормальным показателям во всех отведениях. Через 6 недель приема Флуоксетина α -ритм распределялся правильно, но так и не достигал фоновых значений, так как его ОЗМ все еще было достоверно снижено. При анализе β -ритма отмечалась недостаточная активность его мощности во фронтальной и центральной областях. Δ -ритм достоверно снизилось, но так и не достигло исходных значений, как в группе К, и все еще превышало значение мощности во всех отведениях. Так, в теменной и фронтальной областях его значения ОЗМ достоверно снизились в 2,5-3 раза ($p < 0,01$), в затылочной – в 2,3 раза ($p < 0,01$), а в центральной – в 1,6 раза ($p < 0,05$). А θ -ритм так и оставался в пределах нормы, и никаких изменений его активности выявлено не было (табл. 5).

Уровень ОЗМ ЭЭГ-ритмов у пациентов в группе В, которые на протяжении 2-х недель получали Вальдоксан, имел отличия от таковых в группе Ф. α -ритм все еще распределялся неправильно. При этом его максимальная мощность регистрировалась в теменной и центральной областях, в то время как в затылочной и фронтальной она была достоверно снижена. Мощность β -ритма значимо возросла, но все еще оставалась достоверно низкой по сравнению с группой К. Значения Δ -ритма оставались достоверно высокими во всех регистрируемых отведениях. θ -ритм достиг значений нормы. На 42-е сутки приема Вальдоксана

Таблица 5

Сравнительные значения ОЗМ ЭЭГ-ритмов у пациентов в группе Ф на 2-ой и 6-ой неделе приема Флуоксетина

Локализация электродов	Ритмы ЭЭГ	Группа К	Депрессия	Группа Ф	
				2 недели	6 недель
Затылочная область	Δ	9,28±0,94	41,11±5,69**	40,66±4,62**	18,56±3,04***
	θ	3,47±0,55	15,46±3,69**	7,21±1,11*##	5,00±0,71##
	α	76,24±5,55	20,70±2,00**	33,74±4,56***	58,21±6,11***
	β	11,65±4,27	24,37±3,98*	12,39±1,60##	13,97±1,96#
Теменная область	Δ	7,36±0,53	37,61±4,68**	38,45±5,81**	15,86±2,29***
	θ	6,17±0,48	16,10±1,52**	8,08±0,95##	6,98±0,57##
	α	59,12±3,87	25,72±3,03**	34,45±7,63***	52,48±7,71##
	β	26,88±2,32	22,19±3,53	18,02±2,52*	18,00±2,33
Центральная область	Δ	5,20±0,67	30,53±5,97**	32,77±4,16**	19,83±3,14***
	θ	4,54±0,60	8,49±1,78*	6,68±1,11	5,43±1,44
	α	33,06±3,38	46,26±6,09*	43,92±5,10	35,53±5,07#
	β	57,88±1,49	14,80±3,15**	29,63±2,07***	41,21±5,05***
Фронтальная область	Δ	6,21±0,61	36,86±4,34**	32,45±5,58**	12,61±1,60***
	θ	4,09±0,47	7,29±1,81*	6,89±1,10	4,15±1,11
	α	25,28±3,85	47,68±6,61**	40,32±6,75**	26,31±3,28##
	β	64,90±2,90	8,17±2,08**	22,34±2,42***	55,97±8,18##

Примечание:

** – статистически достоверные различия групп Д и Ф к группе К по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$);

* – статистически достоверные различия групп Д и Ф к группе К по t-критерию Стьюдента ($p < 0,01$);

– статистически достоверные различия группы Ф к группе Д по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$);

– статистически достоверные различия группы Ф к группе Д по t-критерию Стьюдента ($p < 0,01$).

(через 6 недель) у пациентов в группе В ЭЭГ-ритмы головного мозга распределялись таким образом, что наблюдалось достоверное увеличение мощности α-ритма, который приблизился к исходным данным, а в затылочной области он превысил на 14,4% ($p < 0,05$)

ОЗМ в группе К. β-ритм соответствовал контрольным цифрам. При анализе Δ-ритма было зарегистрировано достоверное уменьшение его ОЗМ во всех отведениях. θ-ритм находился в пределах нормы, и изменений его активности не наблюдалось (табл. 6).

Сравнительные значения ОЗМ ЭЭГ-ритмов у пациентов в группе В на 2-ой и 6-ой неделе приема Вальдоксана

Локализация электродов	Ритмы ЭЭГ	Группа К	Депрессия	Группа В	
				2 недели	6 недель
Затылочная область	Δ	9,28±0,94	41,11±5,69**	36,16±5,36**	12,42±3,68##
	θ	3,47±0,55	15,46±3,69**	4,51±1,21##	4,38±0,52##
	α	76,24±5,55	20,70±2,00**	38,17±4,40***	90,29±4,56***
	β	11,65±4,27	24,37±3,98*	18,16±1,56#	10,38±3,38#
Теменная область	Δ	7,36±0,53	37,61±4,68**	24,52±3,83***	9,10±1,74##
	θ	6,17±0,48	16,10±1,52**	6,53±0,76##	5,64±0,44##
	α	59,12±3,87	25,72±3,03**	45,94±6,20#	64,61±5,77##
	β	26,88±2,32	22,19±3,53	22,59±2,29	24,65±2,13
Центральная область	Δ	5,20±0,67	30,53±5,97**	20,80±5,25***	7,49±1,60##
	θ	4,54±0,60	8,49±1,78*	4,35±0,87#	3,57±1,76#
	α	33,06±3,38	46,26±6,09*	39,73±6,75	32,03±5,61##
	β	57,88±1,49	14,80±3,15**	35,12±2,31***	56,76±6,77##
Фронтальная область	Δ	6,21±0,61	36,86±4,34**	31,30±2,47**	7,39±1,66##
	θ	4,09±0,47	7,29±1,81*	5,73±0,76	5,60±1,82
	α	25,28±3,85	47,68±6,61**	28,37±1,75##	23,07±3,98##
	β	64,90±2,90	8,17±2,08**	29,60±2,60***	58,46±5,59##

Примечание:

** – статистически достоверные различия групп Д и Ф к группе К по t-критерию Стьюдента (p<0,05);

* – статистически достоверные различия групп Д и Ф к группе К по t-критерию Стьюдента (p<0,01);

– статистически достоверные различия группы Ф к группе Д по t-критерию Стьюдента (p<0,05);

– статистически достоверные различия группы Ф к группе Д по t-критерию Стьюдента (p<0,01).

Обсуждение результатов

В результате проведенного эксперимента было показано, что у животных в тесте вынужденного плавания наблюдались характерные изменения поведенческой активности – как при экспериментальной депрессии, так и на фоне введения изучаемых ЛП. У крыс, которым вводили Флуоксетин, полученные результаты были обусловлены тем, что данный ЛП способен влиять на уровень дофамина, который оказывает влияние на двигательную активность животных.

Также немаловажным можно считать тот факт, что повышение концентрации серотонина на фоне Флуоксетина происходит постепенно, в связи с чем более значимые изменения двигательной активности мы наблюдали спустя 2 недели после начала введения этого ЛП, что вполне согласуется с данными литературы [9, 12].

Для крыс группы В, которым вводился Вальдоксан, было свойственно наиболее быстрое развитие антидепрессивного эффекта, что, по нашему мнению,

обусловлено присущими данному ЛП свойствами антагониста серотониновых 5-НТ_{2С}-рецепторов, а также, возможно, его прямым стимулирующим влиянием на мелатониновые рецепторы (МТ₁ и МТ₂) [8].

При экспериментальной депрессии распределение ЭЭГ-ритмов головного мозга у крыс изменялось существенным образом. Общеизвестно, что на фоне данной патологии происходит значительная модуляция активности в области коры головного мозга и гиппокампа, представляющих собой особо важные отделы кортиколимбической системы, участвующей, в эмоциональных реакциях организма [3]. Именно этим, на наш взгляд, можно объяснить те изменения ритмической активности, что наблюдались после длительного воздействия на животных стрессорных факторов, которые впоследствии не только модулировали поведение, но и ритмику головного мозга экспериментальных животных.

При регистрации ЭЭГ-ритмов у крыс группы Ф наблюдалось прогрессивное увеличение θ -ритма, который при депрессивном состоянии был достоверно низким, и уменьшение Δ -активности. Тем не менее, θ -ритм так и не достиг исходных показателей, имея более низкие значения по сравнению с нормой, а Δ -ритм, наоборот, несколько превышал показатели в группе К. Вышеописанная картина согласуется с литературными данными о влиянии Флуоксетина на ЭЭГ-ритмы головного мозга животных [18]. Низкое значение θ -активности связано, скорее всего, с тем, что, обладая анксиогенным эффектом, Флуоксетин не дает в полной мере восстановиться данному ритму, а также способствует увеличению β -ритма.

В группе В и θ -, и Δ -ритмы восстановились в условиях экспериментальной депрессии гораздо быстрее, чем в группе Ф. Также было зарегистрировано незначительное увеличение β -ритма, особенно в области соматосенсорной коры. Поскольку ранее подобных исследований по изучению ЭЭГ-профиля Вальдоксана не проводилось и литературных данных на этот счет нет, в нашей работе был впервые проведен анализ фармакологического влияния Вальдоксана на ЭЭГ-ритмы соматосенсорной коры головного мозга и гиппокампа крыс.

По итогам клинического исследования нами было констатировано, что редукция депрессивной симптоматики на фоне приема Вальдоксана происходит значительно быстрее, нежели при терапии Флуоксетином, что подтверждают данные шкалы CGI-I. Более быстрый регресс базовой депрессивной симптоматики и улучшение психического состояния, зарегистрированные у пациентов в группе В, получавшей Вальдоксан, мы связываем с антагонизмом этого ЛП к 5-НТ_{2С} рецепторам, а также его прямым воздействием на МТ₁- и МТ₂-рецепторы, так как известно, что 5-НТ_{2С}-рецепторы и при депрессивных, и при прочих психических расстройствах непосредственно вовлечены в формирование тревожной симптоматики, а их блокада может обуславливать значительный анксиолитический эффект [8,16].

Картина ЭЭГ головного мозга пациентов в динамике также имела специфические отличия. Они заключались в том, что при фармакотерапии вальдоксаном отмечалось наиболее значимое и быстрое восстановление нормальной ритмической активности головного мозга,

а также стабильное улучшение общего состояния, чего не наблюдалось при терапии Флуоксетином. На фоне курсовой терапии последним вышеописанная картина ритмики головного мозга у депрессивных пациентов коррелировала с выводами других авторов о способности данного СИОЗС незначительно увеличивать мощность Δ -ритма [14], а также влиять на показатели α -ритма [13].

До настоящего момента исследования по определению ЭЭГ-профиля Вальдоксана не проводились, и мы можем лишь предполагать, что нормализация и усиление быстроволновой активности ЭЭГ-ритмов является результатом его уникального механизма действия, в т.ч. прямого мелатониномиметического воздействия на MT_1 - и MT_2 -рецепторы и, возможно, отсутствия непосредственного стимулирующего воздействия на моноаминергические системы. Вероятно, определенное значение в механизмах реализации эффектов Вальдоксана может играть и его антагонизм по отношению к серотониновым-5-НТ_{2C}-рецепторам [8].

Выводы

Таким образом, полученные в ходе экспериментально-клинического исследования результаты позволяют нам сделать вывод о том, что прием Вальдоксана приводит к более быстрому регрессу депрессивного поведения у крыс и симптоматики у пациентов, а также оказывает положительное нормализующее воздействие на доминирующие в норме ЭЭГ-ритмы, чего нельзя сказать о Флуоксетине. Вышеизложенное может быть основанием для рекомендации по включению Вальдоксана в схему лечения пациентов с депрессивными рас-

стройствами средней степени тяжести, которые зачастую усугубляют течение хронической соматической патологии.

Список литературы

1. *Бочкарев В.К., Панюшкина С.В.* Электроэнцефалографические исследования при пограничных состояниях // Пограничные психические расстройства. - М.: Медицина. 2000. С. 120-133.
2. *Бут Г.* Актуальные вопросы лечения депрессий // Неврология. 2010. № 316.
3. *Ивлиева Н.Ю.* Участие мезокортико-лимбической дофаминергической системы в адаптивном поведении // Журн. высш. нервн. деят. 2010. Т. 60. № 3. С. 259-278.
4. *Мельникова Т.С., Лапин И.А., Саркисян В.В.* Обзор использования когерентного анализа ЭЭГ в психиатрии // Социальная и клиническая психиатрия. 2009. № 1. Т. 9. С. 90-94.
5. *Смулевич А.Б.* Депрессия как общемедицинская проблема: вопросы клиники и терапии // Consilium medicum. 2006. № 3. Т. 8. С. 16-18.
6. *Табеева Г.Р., Вейн А.М.* Фармакотерапия депрессии // Психиатрия и психофармакотерапия. 2000. № 1. С. 24-26.
7. *Bruder G.E., Sedoruk J.P., Stewart J.W., McGrath P.J., Quitkin F.M., Tenke C.E.* EEG alpha measures predict therapeutic response to an SSRI antidepressant: Pre and post treatment findings // Biological Psychiatry. 2008. № 63. V. 12. P. 1171-1177.
8. *Eser D., Baghai N.C., Moller H.J.* Evidence of agomelatine's antidepressant efficacy: the key points // Int Clin Psychopharmacol. 2007. № 2. V. 22. P. 15-19.
9. *Glickstein S.B., Schmauss C.* Dopamine receptor functions: lessons from knockout mice // Pharmacol. Ther. 2001. V. 91. № 1. P. 63-83.
10. *Itil T.M.* Quantitative pharmacoelectroencephalography // Psychotropic Drugs and the Human EEG. Modern Problems in Pharmacopsychiatry. Basel. - New York: Karger. 1974. V. 8. P. 43-75.
11. *Itil T.M.* The discovery of psychotropic drugs by computer analyzed cerebral bioelectrical potentials (CEEG) // Drug Development Research. 2004. V. 1. Iss. 4. P. 373-407.
12. *Holmes A., Lachowicz J.E., Sibley D.R.* Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes // Neuropharmacology. 2004. V. 47. № 8. P. 1117-1134.

13. *Knott V. Mahoney C., Kennedy S., Evans K.* EEG correlates of acute and chronic paroxetine treatment in depression // *J. Affect Disord.* 2002. V. 69. №1-3. P. 241-249.
14. *Patat A. Trocherie, S. Thébault J.J., Rosenzweig P., Dubruc C., Bianchetti G., Morselli P.L., Court L.A.* EEG profile of litoxetine after single and repeated administration in healthy volunteers // *Br. J. Clin. Pharmacol.*, V. 37. № 2. 1994. P. 157-163.
15. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates, 4-th Edition. 1998. P. 403-405.
16. *Stahl S.M.* Novel mechanism of antidepressant action: norepinephrine and dopamine disinhibition (NDDI) plus melatonergic agonism // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007. V. 10. P. 575-578.
17. *Suffin S.C., Emory W.H., Gutierrez G.A.* QEEG database method for predicting pharmacotherapeutic outcome in refractory major depressive disorders // *Am. Physicians and Surgeons.* 2007. V. 4. № 12. P. 104-108.
18. *Van Lier H. Coenen A.M.L., Drinkenburg W.H.I.M.* Behaviour-specific EEG effects of antidepressants // *Neuropharmacology.* 2004. V. 47. № 2. P. 163-174.

Experimental and clinical analysis of comparative Valdoxan and Fluoxetine influence on pharmaco-EEG parameters

O.M. Kudelina, V.B. Nazarov, Yu.S. Maklyakov,
D.P. Khloponin, V.G. Zaika

The problem of competent depression diagnostics and treatment in medical practice is quite obvious and actual. In this case pharmaco-EEG represents one of the most reliable methods of pharmacotherapy efficiency assessment.

We've analysed cerebral EEG rhythms distribution character in conditions of experimental depression in rats, including antidepressants (Valdoxan and Fluoxetine) usage. It was established that antidepressants induces animals exploration activity increase, as well as significant potentiation of normally dominating EEG theta-rhythm activity in rats.

The similar EEG-rhythm distribution analysis was carried out in patients with depression, including the period of Valdoxan and Fluoxetine pharmacotherapy. It is noted that antidepressants usage significantly improves current condition, inducing normal distribution of alpha-rhythm and reduction of slow-wave activity on EEG.

Key words: depression, EEG, antidepressants, Valdoxan, Fluoxetine.

Генетические и иммунологические аспекты нарушения метаболической устойчивости эндотелия сосудов у больных рефрактерной артериальной гипертензией

А.В. Сафроненко¹, В.Б. Назаров², Ю.С. Макляков¹,
В.А. Сафроненко¹, А.А. Демидова¹

¹ – ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

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

Контактная информация: к.м.н. Сафроненко Андрей Владимирович, alald@inbox.ru

Целью работы явилось изучить у больных рефрактерной артериальной гипертензией функциональные резервы эндотелиоцитов и дать оценку значимости влияния генетических и иммунологических механизмов на функциональное состояние сосудодвигательной функции эндотелия. В основу работы положены результаты обследования 42 больных рефрактерной артериальной гипертензией. В результате было установлено, что у больных рефрактерной артериальной гипертензией в 66,7% наблюдений метаболическая устойчивость эндотелиальных клеток к продуктам окислительного стресса сохранена, а в 33,3% происходит потеря резистентности к действию цитотоксических продуктов. В ходе изучения цитокиновой системы при рефрактерной артериальной гипертензии наблюдаются два тесно взаимосвязанных процесса: дисбаланс между гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-6) и противовоспалительными цитокинами (интерлейкин-4, интерферон- γ) с преобладанием первых над вторыми. У больных рефрактерной артериальной гипертензией с отсутствием метаболической устойчивости эндотелия способность к эндотелийопосредованной вазодилатации при стимуляции хемо- и механорецепторов прогрессивно снижается, что ассоциировано с повышением уровня провоспалительных цитокинов в крови и наличием полиморфных вариантов «-174 G/C» в гене интерлейкина-6 и «308 G/A» в гене фактора некроза опухоли- α .

Ключевые слова: рефрактерная артериальная гипертензия, цитокины, полиморфизм генов, метаболическая устойчивость эндотелия, дисфункция эндотелия сосудов.

Введение

Благодаря исследованиям последних лет доказано, что обязательным компонентом артериальной гипертензии (АГ) является эндотелиальная дисфункция, которая способствует прогрессированию нарушений системной гемодинамики и развитию рефрактерности заболевания к лечению [8]. Основная роль в развитии эндотелиальной дисфунк-

ции принадлежит «окислительному стрессу», который может развиваться на фоне нарушения функций фагоцитарных клеток, снижения антиоксидантной защиты, разбалансировки цитокиновой сети [4, 5]. Циркулирующие активированные моноклеарные фагоциты, продуцируя провоспалительные цитокины интерлейкин- 1β и фактор некроза опухоли- α , способствуют

увеличению экспрессии на эндотелиальных клетках ряда адгезивных молекул, секреции эндотелием интерлейкина-6 и металлопротеиназ, воспалению интимы сосудов, а также изменяют сократимость гладкомышечных клеток сосудов, результатом чего является продукция белков острой фазы, активация компонентов комплемента и фибриногена [6]. Воспаление интимы сосудов приводит к изменениям базовой секреции вазодилататоров аденозина и оксида азота [9].

Во многих исследованиях предметом научного интереса является выявление самого факта дисфункции эндотелия у больных [11] и не оцениваются резервные возможности восстановления деятельности эндотелиальных клеток. Между тем, эндотелий сосудов первым подвергается контакту с биологически активными веществами и раньше других повреждается [13]. Повреждение эндотелиоцитов может происходить как с нарушением структуры, так и с нарушением функции [1, 2]. Исследование функции эндотелиоцитов и факторов, модулирующих функциональное состояние эндотелиальных клеток, позволит ответить на вопрос об обратимости патологических изменений, профилактировать и лечить процессы, приводящие или реализующие сердечно-сосудистые осложнения при рефрактерной АГ.

В связи с вышеизложенным, **целью** работы явилось изучить у больных рефрактерной АГ функциональные резервы эндотелиоцитов и дать оценку значимости влияния генетических и иммунологических механизмов на функциональное состояние сосудодвигательной функции эндотелия.

Материалы и методы

В основу работы положены результаты обследования 42 больных рефрактерной АГ. Среди больных были 30 мужчин (71,4%) и 12 женщин (28,6%). Возраст пациентов варьировал от 43 до 72 лет, в среднем составив $59,4 \pm 1,12$ лет. Все больные имели III степень тяжести АГ. Длительность АГ, в среднем, составляла $9,9 \pm 0,63$ лет. От всех пациентов получено информированное согласие на проведение исследования.

Метаболическую устойчивость эндотелия у пациентов оценивали при исследовании фармакологически потенцируемой эндотелийзависимой вазодилатации. На первом этапе больным подкожно вводили 0,5 мл 0,01% раствора метахолина и с помощью доплерографического ультразвукового метода определяли изменение диаметра плечевой артерии и скорости кровотока в ней. По изменению диаметра артерии и проценту прироста его величины после пробы по сравнению с исходным значением оценивали эндотелийопосредованные вазодилатационные способности артерии. Диаметр и кровоток артерии изучали в режиме двухмерного ультразвукового сканирования. Для этого использовали систему ACUSON 128 XP/10 (США). На следующий день больному вводили в прежнем объеме метахолин и внутривенно 5 мл 10% раствора аскорбиновой кислоты. Вновь определяли изменение диаметра и скорости кровотока в артерии. Если при введении аскорбиновой кислоты имело место дополнительное расширение артерии и повышение амплитуды эндотелийзависимой вазодилатации, то у эндотелиоцитов была сохранена метаболическая устойчивость к окислительному стрес-

су [12]. Аскорбиновая кислота является мощным водорастворимым антиоксидантом, способным удалять/нейтрализовать ряд реактивных видов кислорода [12]. Если эндотелиальные клетки в условиях снижения концентрации активных форм кислорода и азота улучшали свои сосудодвигательные свойства, то можно говорить о сохранных резервных возможностях эндотелия, высокой метаболической устойчивости к действию оксидативного стресса.

В случае если дополнительного расширения артерии на введение аскорбиновой кислоты не происходило, то это свидетельствовало о выраженных повреждениях эндотелиальных клеток и отсутствии резервных возможностей эндотелиоцитов противостоять активным формам кислорода [12].

Определение содержания фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α), интерлейкина-1бета, интерлейкина-6, интерлейкина-8, рецепторного антагониста интерлейкина-1 (РАИЛ-1), γ -интерферона (γ -ИФ) в сыворотке крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием соответствующих тест-систем на фотометре Multilabel Counter 1420 Victor (Финляндия) с применением набора реактивов «ИЛ-8-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», Новосибирск). В контрольную группу для определения нормального содержания интерлейкинов (ИЛ) в крови были объединены 32 здоровых донора.

При генетическом исследовании материалом для исследования послужила тотальная геномная ДНК, взятая из образцов цельной венозной крови из локтевой вены. Эту кровь смешивали с антикоагулянтом (6% раствор этиленди-

аминтетрауксусная кислота). Образцы крови находились на хранении в замороженном состоянии при температуре -20°C до момента выделения ДНК, а выделение ДНК происходило при помощи метода фенол-хлороформной экстракции. У больных АГ методом полиморфизма длины рестриктных фрагментов определяли 3 полиморфных варианта генов: «-31 T/C» в гене интерлейкина 1 β , «-174 G/C» в гене интерлейкина-6 и «308 G/A» в гене ФНО- α . В работе использовались специфические последовательности праймеров для ПЦР.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США). При определении достоверности статистических различий показателей между группами использовался параметрический t-критерий Стьюдента при нормальном распределении выборок и непараметрический критерий Манна-Уитни – при отличии распределения от нормального. При проверке достоверности сопряжения между двумя качественными признаками использовали метод построения таблиц сопряженности 2×2 и критерия Пирсона χ^2 .

Результаты и их обсуждение

Применяемая у больных рефрактерной АГ сосудистая проба с метахолином позволила изучить соответствующее изменение артериального кровотока, связанное со стимуляцией мускариновых холинорецепторов эндотелия. Исходный диаметр плечевой артерии до пробы соответствовал $3,61 \pm 0,09$ мм и после пробы изменился незначительно – на $2,66 \pm 0,69\%$, составив $3,71 \pm 0,25$ мм. Линейная скорость кровотока по плечевой артерии при сосудистой пробе изменя-

лась с $33,99 \pm 4,36$ см/с до $50,64 \pm 1,61$ см/с. При этом амплитуда реактивной гиперемии составила $37,91 \pm 0,19\%$. Незначительное изменение диаметра плечевой артерии при стимуляции холинорецепторов эндотелия свидетельствовало либо о структурном, либо о функциональном повреждении эндотелиоцитов. Для уточнения природы повреждения сосудистого эндотелия у больных рефрактерной АГ было изучено дальнейшее изменение диаметра артерии и кровотока по ней при внутрисосудистом введении аскорбиновой кислоты. У больных клинической группы после дополнительного введения аскорбиновой кислоты диаметр плечевой артерии увеличился на $2,96 \pm 0,28\%$, а линейная скорость кровотока – на $17,05 \pm 1,31\%$. В результате окончательное значение диаметра плечевой артерии составило $3,82 \pm 0,28$ мм, а линейная скорость кровотока – $57,07 \pm 1,83$ см/с.

У больных рефрактерной АГ с высокой метаболической устойчивостью эндотелиоцитов диаметр плечевой артерии при окклюзионной пробе изменялся, в среднем, с $3,65 \pm 0,08$ мм до $3,96 \pm 0,14$ мм, амплитуда эндотелийзависимой вазодилатации составила $8,49 \pm 0,65\%$. У пациентов этой же клинической группы, но с отсутствием устойчивости эндотелия к оксидативному стрессу, амплитуда эндотелийзависимой вазодилатации составила меньшую величину – $3,42 \pm 0,87\%$. Аналогичные по направленности изменения были установлены и для амплитуды реактивной гиперемии. Так, у пациентов с метаболической устойчивостью эндотелия амплитуда реактивной гиперемии – $81,45 \pm 3,12\%$ – была практически в 2 раза выше, чем у больных с отсутствием резистентности эндотелиоцитов к оксидативному стрессу ($40,52 \pm 3,94\%$).

Таким образом, у больных рефрактерной АГ при высокой метаболической устойчивости эндотелия его сосудодвигательная функция в условиях деформации механорецепторов реализовывалась в большем объеме.

При индивидуальном анализе изменения диаметра плечевой артерии у больных рефрактерной АГ после введения аскорбиновой кислоты было установлено, что у 14 пациентов (33,3%) дополнительного расширения артерии не происходило. Данное обстоятельство свидетельствовало о структурно-функциональном повреждении у них эндотелия и об отсутствии у эндотелиоцитов резервных возможностей, реализующихся при уменьшении интенсивности окислительного стресса. У 28 больных рефрактерной АГ (66,7%) введение антиоксиданта сопровождалось расширением артерии и усилением кровотока, что указывало на метаболическую устойчивость эндотелия к окислительному стрессу и сохранению у него сосудодвигательной функции. Свободнорадикальное окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот в эндотелиальных клетках ограничило их функциональные возможности, но не вызвало структурного необратимого патологического процесса с потерей чувствительности рецепторов.

На следующем этапе работы были изучены механизмы, лежащие в основе цитокин-обусловленного повреждения интимы сосудов. Как известно, цитокины – это небольшие растворимые белковые молекулы, участвующие в межклеточном взаимодействии. Они периодически продуцируются отдельными клетками и различными тканями в ответ на специфические стимулы [7]. В работе было определено исходное со-

держание в крови провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α и противовоспалительных факторов – интерферона-γ, рецепторного антагониста к ИЛ-1β. В разных исследованиях можно встретить противоположную трактовку роли некоторых цитокинов (ИЛ-8, ИФ-γ) ввиду их многофункциональности. Для разделения цитокинов по функции на про- и противовоспалительные были использованы представления, изложенные в монографии [3].

Исходное содержание цитокинов в плазме крови у больных рефрактерной АГ по сравнению с контрольной группой практически здоровых людей представлено в табл. 1.

Таблица 1

Уровни цитокинов в плазме крови у больных с рефрактерной артериальной гипертензией и в контрольной группе

Показатель	Больные с рефрактерной АГ (n=42)	Контрольная группа (n=32)
ИЛ-1β, пг/мл	1,11±0,13*	1,64±0,09
ИЛ-6, пг/мл	6,89±0,22**	1,66±0,05
ИЛ-8, пг/мл	5,78±0,62**	30,4±0,73
ФНО-α, пг/мл	6,12±0,38**	0,57±0,02
РАИЛ-1β, пг/мл	1091,4±201,4**	518,2±2,78
ИФ-γ, пг/мл	34,78±3,21**	2,1±0,08

Примечание: достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой при p<0,05; ** – при p<0,001 (при использовании t-критерия Стьюдента для независимых выборок ввиду нормальности распределения и отсутствия различия дисперсий).

Анализ представленной информации в табл. 1 позволил выявить, что у больных рефрактерной АГ содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО-α по сравнению со здоровыми людьми контрольной группы было повышенным (p<0,001) в 4,15 и 10,7 раза соответственно, при одновременном снижении ИЛ-1β на 32,3% (p<0,05) и ИЛ-8 на 81% (p<0,05). При этом уровни рецепторного антагониста к ИЛ-1β и ИФ-γ по сравнению с контролем были повышены (p<0,001) в 2,1 и 16,6 раза соответственно.

Содержание цитокинов в крови у больных рефрактерной АГ было ассоциировано с выраженностью дисфункции эндотелия (табл. 2).

Таблица 2

Цитокиновый профиль у больных рефрактерной артериальной гипертензией в зависимости от функционального состояния эндотелия

Показатель	Метаболическая неустойчивость эндотелиоцитов	
	отсутствует (n=28)	присутствует (n=14)
ИЛ-1β, пг/мл	0,82±0,086	1,5±0,14*
ИЛ-6, пг/мл	4,1±0,47	7,7±0,31**
ИЛ-8, пг/мл	3,1±0,42	7,2±1,23**
ФНО-α, пг/мл	4,5±0,83	9,1±1,46**
РАИЛ-1β, пг/мл	1083,4± 202,96	1097,3± 189,83
ИФ-γ, пг/мл	36,3±9,29	39,2 ± 9,25

Примечание: достоверность различий показателей между группами при p<0,05, ** – при p<0,001 (при использовании критерия Манна-Уитни ввиду отличия выборки пациентов с метаболической неустойчивостью эндотелиоцитов от нормального распределения).

Сравнительный анализ цитокинового профиля в двух группах больных позволил отметить более высокие уровни провоспалительных цитокинов у больных при рефрактерной АГ и отсутствием метаболической устойчивости эндотелия. Причем повышение содержания изучаемых провоспалительных цитокинов носило достоверный характер ($p < 0,05$). Концентрация противовоспалительных цитокинов у больных рефрактерной АГ не отличалась в подгруппах с разной выраженностью метаболической устойчивости эндотелиоцитов.

Проведение корреляционно-регрессионного анализа выявило наличие тесной прямой достоверной взаимосвязи между изменением линейной скорости кровотока при стимуляции холинорецепторов эндотелия и содержанием в крови ФНО- α ($r=0,76$, $p < 0,001$), ИЛ-6 ($r=0,71$, $p < 0,001$), ИФ- γ ($r=0,69$, $p < 0,001$). Обнаруженные ассоциативные связи у больных рефрактерной АГ между содержанием в крови цитокинов и сосудодвигательной функций эндотелиоцитов позволяют дать обоснованное заключение о влиянии иммунологических регуляторных систем на функциональное состояние эндотелия.

Таким образом, развитие рефрактерной АГ сопровождается структурным повреждением эндотелиоцитов с необратимым угнетением его функционального состояния, что ассоциировано с повышением уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови. При этом повышение содержания противовоспалительных цитокинов можно считать как адаптивное явление, ограничивающее воспаление, которое наблюдалось вне зависимости от выраженности дисфункции эндотелия.

Полиморфизм генов цитокинов обуславливают иммунную конституцию больных. При обнаружении провоспалительных вариантов генов-цитокинов формируется повышенная склонность к активации иммунной системы при инфекциях, механическом воздействии на ткань [10].

Частота полиморфизмов генов цитокинов у пациентов с рефрактерной АГ оказалась высокой. Полиморфизм «-31 T/C» в гене интерлейкина-1 β был обнаружен у 22 (52,4%), «-174 G/C» в гене интерлейкина-6 – у 27 (64,3%), «308 G/A» в гене ФНО- α – у 35 (83,3%). Чаще всего, среди больных с рефрактерной АГ встречался полиморфизм «308 G/A» в гене ФНО- α , что способствовало синтезу этого провоспалительного цитокина и реже всего – полиморфизм «-31 T/C» в гене интерлейкина-1 β .

Однако при АГ, как и в случае с другими многофакторными заболеваниями, недостаточно лишь знания продукта гена и влияния полиморфизма этого гена на функциональные свойства белка. Конечный эффект гена во многом зависит от его ближайшего окружения и свойств системы, в которой он функционирует. Это, в свою очередь, в значительной мере зависит от индивидуальных особенностей и условий окружающей среды. Поэтому один и тот же набор генов может обладать различным функциональным значением в разных популяциях. В связи с этим, является актуальным выяснение роли полиморфизма ряда генов-кандидатов, факторов риска и некоторых клинических особенностей в течении АГ.

В табл. 3-5 отражена оценка сопряжения метаболической устойчивости эндотелия и полиморфизма «-31 T/C»

в гене ИЛ-1 β , «-174 G/C» в гене интерлейкина-6 и «308 G/A» в гене ФНО- α . В результате было установлено, что метаболическая неустойчивость эндотелия к окислительному стрессу у больных реф-

рактерной АГ была сопряжена с наличием полиморфизма «-174 G/C» в гене интерлейкина-6 ($p=0,009$) (табл. 4) и «308 G/A» в гене ФНО- α ($p=0,02$) (табл. 5). С полиморфизмом «-31 T/C» в гене

Таблица 3

Оценка сопряжения метаболической устойчивости эндотелия и полиморфизма «-31 T/C» в гене ИЛ-1 β

Метаболическая неустойчивость эндотелия	Абс./%	Полиморфизм «-31 T/C» в гене ИЛ-1 β		Всего
		присутствует	отсутствует	
присутствует	Абс. количество	9	5	14
	% от суммы по столбцу	37,5	27,8	33,3
отсутствует	Абс. количество	15	13	28
	% от суммы по столбцу	62,5	72,2	66,7
Всего	Абс. количество	24	18	42
	% от суммы по столбцу	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=0,44$; $p=0,51$

Таблица 4

Оценка сопряжения механочувствительности эндотелия и полиморфизма «-174 G/C» в гене интерлейкина-6

Метаболическая неустойчивость эндотелия	Абс./%	Полиморфизм «-174 G/C» в гене интерлейкина-6		Всего
		присутствует	отсутствует	
присутствует	Абс. количество	11	3	14
	% от суммы по столбцу	52,4	14,3	33,3
отсутствует	Абс. количество	10	18	28
	% от суммы по столбцу	47,6	85,7	66,7
Всего	Абс. количество	21	21	42
	% от суммы по столбцу	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=6,86$; $p=0,009$

Таблица 5

Оценка сопряжения механочувствительности эндотелия и полиморфизма «308 G/A» в гене ФНО- α

Метаболическая неустойчивость эндотелия	Абс./%	«308 G/A» в гене ФНО- α		Всего
		присутствует	отсутствует	
присутствует	Абс. количество	10	4	14
	% от суммы по столбцу	47,6	19,0	33,3
отсутствует	Абс. количество	11	17	28
	% от суммы по столбцу	52,4	81,0	66,7
Всего	Абс. количество	21	21	42
	% от суммы по столбцу	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=5,48$; $p=0,02$

ИЛ-1 β метаболическая неустойчивость эндотелия к окислительному стрессу сопряжена не была, о чем свидетельствовало низкое значение наблюдаемого критерия согласия Пирсона ($\chi^2=0,44$) и отсутствие доверительной значимости ($p=0,51$) (табл. 3).

Итак, проведение генетических исследований позволило обнаружить у пациентов рефрактерной АГ высокую встречаемость провоспалительных вариантов генов, кодирующих ранние этапы воспаления и иммунного ответа. Наличие провоспалительных вариантов генов предрасполагало к формированию у больных иммунного воспаления в сосудистой стенке, ограничивающего функциональные способности эндотелиальных клеток, – их вазодилататорные потенции, метаболическую устойчивость к окислительному стрессу и механочувствительность к продольным сдвигам.

Выводы

У больных рефрактерной АГ в 66,7% наблюдений метаболическая устойчивость эндотелиальных клеток к продуктам окислительного стресса сохранена, а в 33,3% происходит потеря резистентности к действию цитотоксических продуктов.

В ходе изучения цитокиновой системы при рефрактерной АГ наблюдаются два тесно взаимосвязанных процесса: дисбаланс между гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6) и противовоспалительными цитокинами (ИЛ-4, ИФ- γ) с преобладанием первых над вторыми.

У больных рефрактерной АГ с отсутствием метаболической устойчивости эндотелия способность к эндотелиопосредованной вазодилатации при

стимуляции хемо- и механорецепторов прогрессивно снижается, что ассоциировано с повышением уровня провоспалительных цитокинов в крови и наличием полиморфных вариантов «-174 G/C» в гене интерлейкина-6 и «308 G/A» в гене ФНО- α .

Список литературы

1. *Власов С.П., Ильченко М.Ю., Казаков Е.Б.* Дисфункция эндотелия и артериальная гипертензия. - Самара: Офорт. 2010. С. 34-56.
2. *Киреева В.В., Кох Н.В., Лифшиц Г.И., Апарцин К.А.* Дисфункция эндотелия как краеугольный камень сердечно-сосудистых событий: молекулярно- и фармакогенетические аспекты // Российский кардиологический журнал. 2014. № 10. С. 64-68.
3. *Кетлинский С.А., Симбирцев А.С.* Цитокины. - СПб: Фолиант. 2008. С. 95-112.
4. *Кузник Б.И.* Цитокины, атеросклероз, инфаркт миокарда и атеротромбоз // Проблемы клинической медицины. 2012. № 1. С.18-26.
5. *Радаева О.А., Новикова Л.В., Аношкина Г.Б.* Цитокиновый профиль у больных с артериальной гипертензией // Аллергология и иммунология. 2007. № 1. 86 с.
6. *Симбирцев А.С.* Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал. 2013. № 3. С. 18-41.
7. *Сукманова И.А., Яхонтов Д.А.* Функция эндотелия и уровень мозгового натрийуретического пептида у мужчин с систолической сердечной недостаточностью в разных возрастных группах // Цитокины и воспаление. 2009. № 1. С. 34-37.
8. *Чернявская Т., Задюченко В., Данилова Н., Гринева З.* Резистентная артериальная гипертензия: дифференцированный подход к терапии // Врач. 2014. № 5. С. 6-12.
9. *Bautista L.E., Veram L.M., Arenas I.A., Gamarra G.* Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension // J. Hum. Hypertension. 2005. № 19. P. 149-154.
10. *Bidwell J., Keen L., Gallageher G.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases // Genes Immun. 2009. № 1. P. 3-19.

11. *Erdine S.* Resistant hypertension. European Society of Hypertension Scientific Newsletter // Update on Hypertension Management. 2003. № 4. P. 15-24.
12. *Ting H.H., Timimi F.K., Haley E.A., Roddy M.A., et al.* Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm vessels of humans with hypercholesterolemia // *Circulation*. 1997. Vol. 95. P. 2617-2622.
13. *Viera A.J., Hinderliter A.L.* Evaluation and management of the patient with difficult-to-control or resistant hypertension // *American Family Physician*. 2009. № 10. P. 863-869.

Genetic and immunological aspects of metabolic stability of vascular endothelium in patients with persistent hypertension

A.V. Safronenko, V.B. Nazarov, Yu.S. Maklyakov,
V.A. Safronenko, A.A. Demidova

The aim of the work was the study of patients with persistent hypertension functional reserves of cells and to evaluate the significance of the impact of genetic and immunological mechanisms in the functional state of the function of the endothelium. The work is based on the results of a survey of 42 patients with persistent arterial hypertension. As a result, it was found that in patients with persistent arterial hypertension in 66,7% of observations metabolic stability of endothelial cells to oxidative stress is preserved, while the 33,3% results in a loss of resistance to the action of cytotoxic products. The cytokine system when there are hypertension refractor two closely interrelated processes: the imbalance between the overproduction of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-6) and anti-inflammatory cytokines (interleukin-4, interferon- γ) dominated the first over the second. Persistent arterial hypertension patients with absence of metabolic resistance ability of endothelial vasodilation during stimulation of chemo- and mechanoreceptors in progressively decreases, which is associated with increased levels of proinflammatory cytokines in the blood and the presence of polymorphic variants «-174 G/C» to the interleukin-6 and «308 G/A» in the tumor necrosis factor- α .

Key words: resistant arterial hypertension, cytokines, polymorphism of genes, metabolic stability of endothelium, vascular endothelial dysfunction.



Влияние разных доз этанола на ультразвуковую вокализацию крыс

Ю.В. Фокин¹, А.Г. Берзина², В.Н. Каркищенко¹, О.В. Алимкина¹,
Н.Б. Гамалея²

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

² – ФГБУ «Национальный научный центр наркологии» Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, fokin-yuri@yandex.ru

Исследовано влияние разных доз этанола на параметры вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне. Установлено, что накопление этанола отражается в изменении частотно-спектральных характеристик ультразвуковой вокализации крыс. Этанол, вводимый крысам в дозах, приблизительно равных 1, 3 и 4 г/кг, формирует позитивное аффективное состояние, а в дозах 2 и 5 г/кг – негативное. Ультразвуковая вокализация крыс, получивших 3 г/кг этилового спирта, может отражать признаки эйфории, а близкая к летальной доза 5 г/кг вызывает обнаружение в ультразвуке признаков дистресса. Модель исследования психоэмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуке можно рекомендовать для доклинических испытаний средств лечения алкогольной зависимости.

Ключевые слова: этанол, алкогольное опьянение, ультразвуковая вокализация, аффективное состояние, крысы.

Введение

Разработка лекарственных средств и способов лечения алкогольной зависимости тесно связана с изучением нейрофизиологических процессов, происходящих в организме под действием алкоголя.

Этиловый спирт относится к биологически активным веществам широкого фармакологического действия. Он быстро проникает в мозг и обнаруживается там почти в такой же концентрации как и в крови, что обуславливает его непосредственное влияние на ЦНС.

При высоких дозах алкоголя повышается сосудистая проницаемость. Это способствует поступлению алкоголя в астроциты, являющиеся компонентом гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В результате происходит набухание и деструкция астроцитов и, как следствие, повышение проницаемости ГЭБ. Пройдя этот барьер, этанол и, особенно, ацетальдегид могут оказывать прямое токсическое влияние на нейроны, приводя к их гибели [8].

Одним из доступных неинвазивных методов выявления структурных изме-

нений в ЦНС у человека под влиянием различного рода интоксикаций является регистрация стволовых слуховых вызванных потенциалов (ССВП). Метод ССВП широко применяется в клинической нейрофизиологии и в специальных экспериментальных исследованиях действия алкоголя на мозг человека.

До настоящего времени оценка влияния алкоголя на лабораторных животных проводилась с помощью метода электроэнцефалографии (ЭЭГ). Однако в последние годы группой учёных в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России проводился интенсивный поиск новых биологических моделей для исследования различных аспектов действия фармакологических препаратов, в т.ч. на психоэмоциональную сферу [3]. В частности, была изучена возможность применения с этой

целью метода регистрации ультразвуковой вокализации (УЗВ) животных [7]. Данный феномен УЗВ был обнаружен у всех исследованных видов лабораторных животных (крысы, мыши, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи, макаки-резусы), а также был установлен и в отношении человека. Было показано, что УЗВ крыс является не только коммуникативной особенностью животных, но и отражением таких аффективных состояний как комфорт/дискомфорт, тревожность, агрессия и др. [17]. В частности, было показано, что доминирование УЗВ крыс в диапазоне 20-30 кГц свидетельствует о негативных аффективных состояниях, тогда как УЗВ в более высокочастотном диапазоне (35-45 кГц) отражает позитивные аффективные состояния (рис. 1).

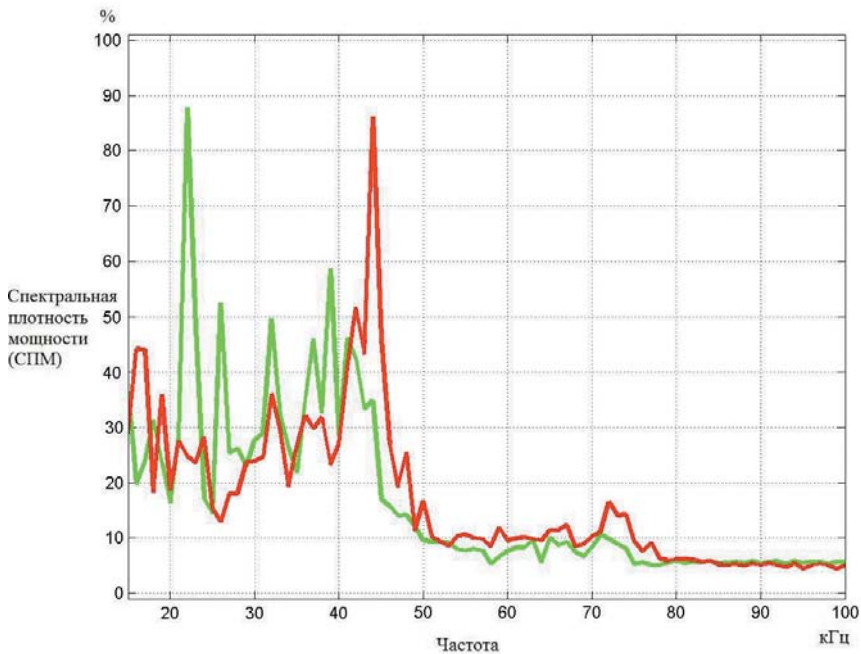


Рис. 1. Пример УЗВ крыс в позитивных и негативных аффективных состояниях. По оси абсцисс – частота УЗВ, кГц; по оси ординат – спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Зелёная кривая – психоэмоциональный дискомфорт, красная кривая – комфорт.

Способность человека и животных генерировать ультразвуковые колебания в сопоставимых диапазонах частот позволяет использовать параметры УЗВ для экстраполяции на человека результатов исследований, полученных на лабораторных животных.

Цель исследования – оценить действие разных доз этанола на параметры вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне.

Материалы и методы

Эксперимент проводился сотрудниками лаборатории нейротехнологий ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» совместно с сотрудниками лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный научный центр наркологии» Минздрава России на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА.

Тестируемые животные – 4 половозрелые (3 мес.) самки крыс линии WAG/GY, массой 250 ± 10 г.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 г.), 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 [9]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтическими комиссиями ФГБУН НЦБМТ ФМБА и ФГБУ «ННЦ наркологии» Минздрава России.

Условия кормления и содержания. Крыс содержали в микроизоляторной системе «RairIsoSystem». Животные соответствовали категории конвенциональных. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха $18-22^{\circ}\text{C}$ и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Алкогольное опьянение моделировалось с помощью внутрижелудочного зондового введения (рис. 2) этанола (водка «Путинка»), пятикратно, в дозах по 1 г/кг с интервалами в 20 мин (для 2-й и 3-й доз) и 60 мин (для 4-й и 5-й доз).



Рис. 2. Внутрижелудочное введение крысам алкоголя.

Регистрация УЗВ. Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack («Metris B.V.», Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье – 2000 интервалов. В ходе анализа спектральную плотность мощности ультразвука (СПМ), генерируемого каждым животным, нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку

изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения приводили в соответствие с максимумом. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам.

Запись УЗВ осуществлялась в течение 5 мин по следующей схеме:

- 1-я доза (1 г/кг) – через 20 мин,
 - 2-я доза (2 г/кг) – через 40 мин*,
 - 3-я доза (3 г/кг) – через 60 мин*,
 - 4-я доза (4 г/кг) – через 120 мин*,
 - 5-я доза (5 г/кг) – через 180 мин*,
- (* – после первой дозы).

Результаты и их обсуждение

График УЗВ крыс, получивших первую дозу этанола (через 20 мин после введения), представлен на рис. 3.

Согласно рис. 3, наибольшая мощность УЗВ группы животных, получивших этанол в дозе 1 г/кг, приходится на диапазон 37-44 кГц, с максимумом в его конечной точке. Дополнительные пики СПМ имеются в диапазонах до 20 и около 30 кГц, однако они выражены на 25-50% слабее.

Согласно литературным сведениям [13-19] и результатам, полученным нами ранее в исследованиях по данной тематике [2; 4-7; 11; 12], диапазон около 35-45 кГц в УЗВ крыс отражает их благоприятное, комфортное состояние, т.е. после «принятия» одной дозы алкоголя у крыс отмечается позитивное аффективное состояние.

До настоящего времени нет единого мнения о том, на какие именно структуры мозга наиболее сильно влияет алкоголь. Опыты на животных показали, что алкоголь в дозе 1г/кг вызывал началь-

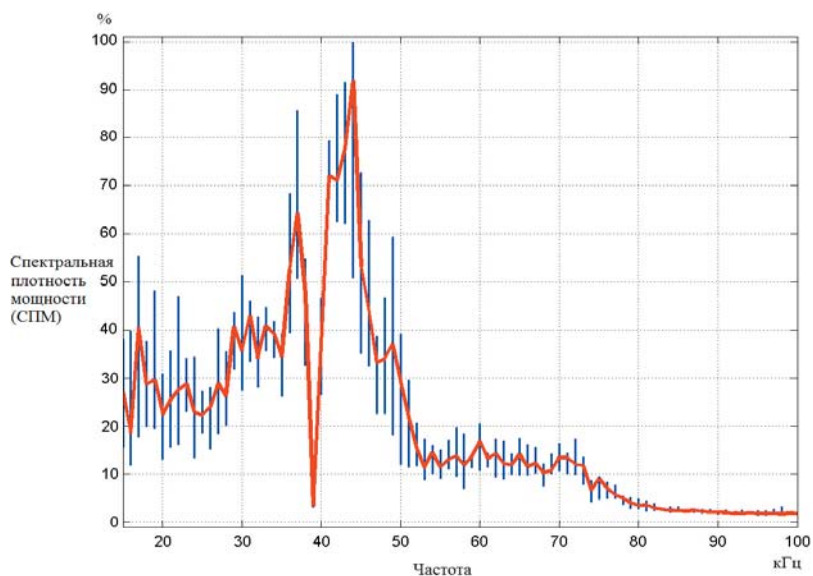


Рис. 3. УЗВ крыс после 1-й дозы алкоголя. По оси абсцисс – частота УЗВ, кГц; по оси ординат – спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Красная кривая – медианы частот, синие вертикальные линии – 95% доверительный интервал.

ное увеличение частоты и амплитуды волн спонтанной ЭЭГ в корковых зонах и уменьшение их частоты и амплитуды в среднемозговой ретикулярной формации при всех концентрациях раствора алкоголя. Однако, если концентрации более высоки, имеет место выраженное

уменьшение частоты и амплитуды волн во всех отведениях при заметной тормозной поведенческой реакции [1].

Результаты исследования УЗВ крыс, получивших вторую дозу этанола (через 40 мин после первой дозы), представлены на рис. 4.

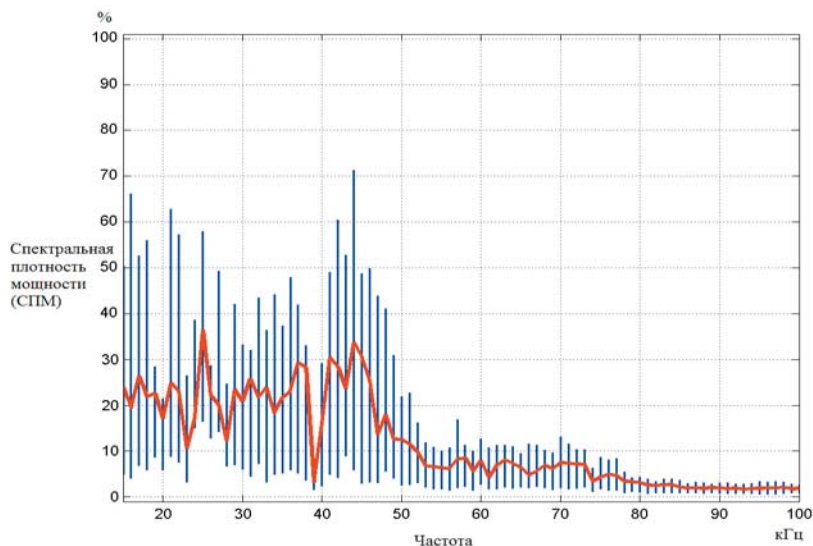


Рис. 4. УЗВ крыс после 2-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 3.

Из рис. 4 видно, что после второй дозы этанола (общая концентрация – примерно 2 г/кг, без учёта выведения) произошло существенное снижение спектральной мощности УЗВ в «диапазоне комфорта» и перемещение максимума её плотности в диапазон 20-30 кГц, являющийся показателем дискомфортного, тревожного психоэмоционального состояния. Максимум СПМ (примерно 38%) приходится на частоту около 26 кГц. На частоте около 45 кГц эта величина равна примерно 34%.

Таким образом, аффективное состояние животных, получивших вторую дозу алкоголя, в данный временной промежуток является достаточно противоречивым. Вероятно, оно может расцениваться как пограничное, с негативными признаками.

Параметры УЗВ крыс, получивших третью дозу этанола (через 60 мин после первой дозы), представлены на рис. 5.

После введения третьей дозы этанола (общая концентрация – примерно 3 г/кг, без учёта выведения) максимальная спектральная мощность УЗВ (около 70-80%) снова, как и после первой дозы алкоголя, приходится в диапазон 35-45 кГц, что свидетельствует о пребывании животных в комфортном психоэмоциональном состоянии.

Максимум СПМ приходится на крайнюю точку «комфортного» диапазона. Негативных признаков в виде тревожности, беспокойства и т.д. у крыс в данный временной промежуток не наблюдается (СПМ в «дискомфортном» диапазоне почти на 50% ниже). На основании этого можно предположить, что аффективное состояние крыс, получивших этанол в дозе, приблизительно равной 3 г/кг, более позитивное и, возможно, гомологично человеческой радости, эйфории и т.д.

Анализ УЗВ крыс, получивших четвертую дозу этанола (через 120 мин после первой дозы), представлен на рис. 6.

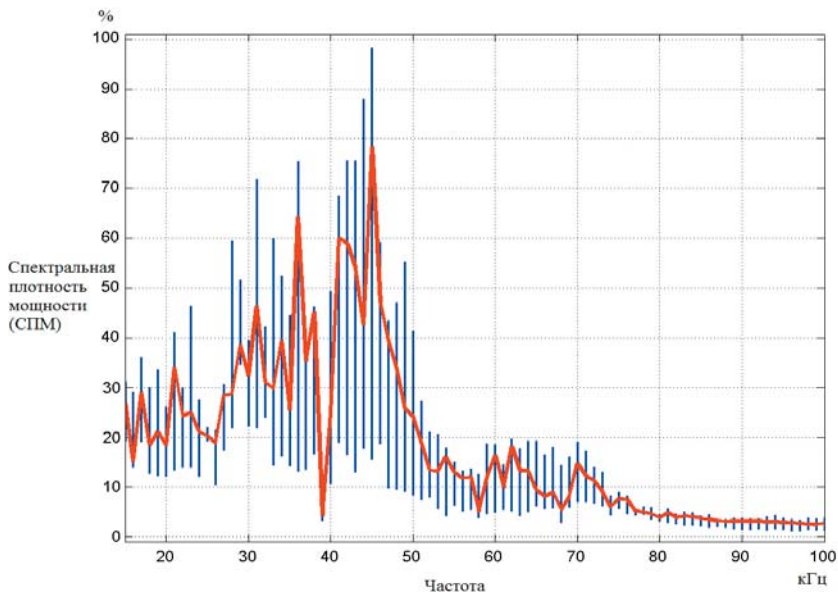


Рис. 5. УЗВ крыс после 3-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 3.

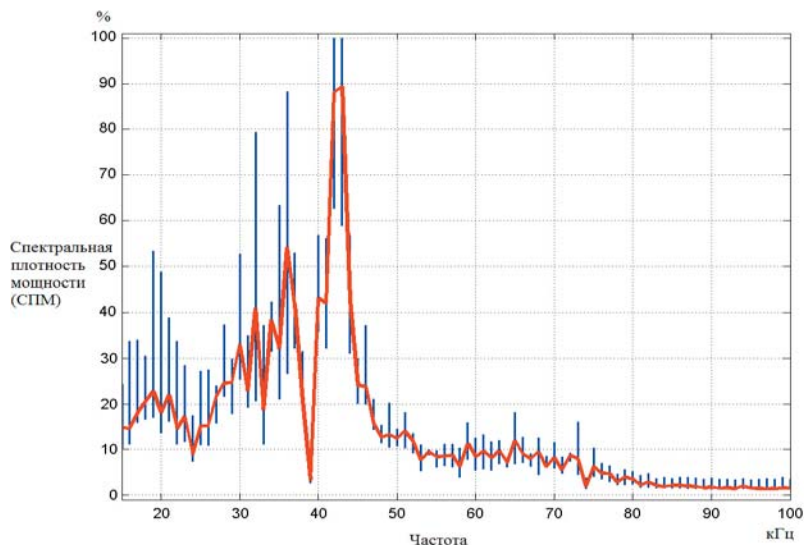


Рис. 6. УЗВ крыс после 4-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 5.

Анализируя рис. 6, можно заключить, что после введения четвертой дозы этанола (общая концентрация – примерно 4 г/кг, без учёта выведения) максимум СПМ чуть сместился влево (на 2-3 ед.), но, в целом, картина УЗВ не изменилась, т.е. психоэмоциональное состояние крыс в данный момент по-

прежнему является позитивным и благоприятным. Максимум мощности УЗВ (порядка 90%) приходится на частоту около 43 кГц, т.е. соответствует диапазону «комфорта».

Параметры УЗВ крыс, получивших пятую дозу этанола (через 180 мин после первой дозы), представлены на рис. 7.

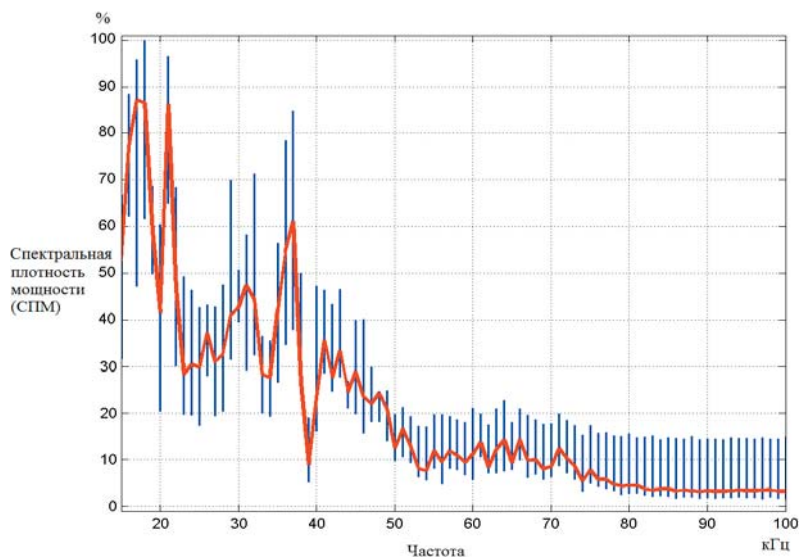


Рис. 7. УЗВ крыс после 5-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 3.

Из рис. 7 следует, что введение пятой дозы этанола (общая концентрация – примерно 5 г/кг, без учёта выведения), как и после второй дозы, вызвало снижение спектральной мощности УЗВ в диапазоне «комфорта» и одновременное её возрастание в диапазоне «тревоги». Максимум СПМ (примерно 88%) приходится на частотный диапазон 18-21 кГц, а СПМ на частоте около 38 кГц составляет примерно 61%.

Наблюдаемое «смещение» пика спектральной мощности УЗВ крыс, вероятно, отражает смену позитивного аффективного состояния животных на негативное. В эмоциональной сфере животных, по всей видимости, преобладают тревога, страх и, возможно, агрессия. Наблюдаемый эффект объясняется высокой дозой этилового спирта, близкой для крыс к летальной.

В других исследованиях [1, 10], при проведении опытов на людях, было показано, что через 60 мин после приема средней и большей дозы алкоголя (0,8-1,5 г/кг) возникает увеличение количества медленных волн в ЭЭГ, замедление частоты в α -диапазоне. При дальнейшей интоксикации происходит увеличение β -активности, т.е. можно утверждать, что средние и относительно высокие дозы алкоголя вызывают замедление ритмов ЭЭГ.

Выводы

1. Накопление этанола отражается в изменении частотно-спектральных характеристик УЗВ крыс.

2. При введении этилового спирта крысам в дозах, приблизительно равных 1, 3 и 4 г/кг, регистрируется позитивное, комфортное аффективное состояние, а в дозах 2 и 5 г/кг – дискомфортное аффективное состояние.

3. В УЗВ крыс, получивших 3 мг/кг этанола, могут отражаться признаки эйфории, а доза 5 мг/кг, близкая к летальной, отражает, вероятно, признаки дистресса.

4. Модель исследования психоэмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне можно рекомендовать при проведении доклинических испытаний средств лечения алкогольной зависимости.

Список литературы

1. *Арзуманов Ю.Л., Судаков С.К.* Нейрофизиологические механизмы зависимости от психоактивных веществ // Руководство по наркологии / под ред. Н.Н. Иванца. - Медицинское информационное агенство. М. 2008. С.141-163.
2. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007, 448 с.
3. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В.* Биологические модели в инновационной фармакологии // Мат-лы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» 18-21 сентября 2012 г. Республика Татарстан, г. Казань. – М.: Фолиум. – 2012. – 82 с.
4. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Сахаров Д.С., Алимкина О.В.* Роль нейромедиаторных систем мозга в генерации ультразвуковой вокализации и её корреляции с поведением животных // Биомедицина. – 2011. – № 4. – С. 8-18.
5. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капаназе Г.Д., Чайванов Д.Б.* Ультразвуковая вокализация и её информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 4-23.
6. *Морозов Г.В.* Алкоголизм. – М.: Медицина. – 1983. – С. 89-97.
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.
8. *Фокин Ю.В.* Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения на вокализацию крыс в ультразвуке // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 84-91.

9. **Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н.** Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обезд-виживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 17-21.
10. **Aalto J., Kiinmaa K.** Role of brain monoaminergic systems in the increased ethanol caused by REM-sleep deprivation. In: Advances in biomedical alcohol research / K. Lindros, R. Jikahri (eds.). - Oxford; Pergamon Press. 1987. P. 313-318.
11. **Blanchard R.J., Blanchard D.C., Agullana R., Weiss S.M.** Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems // *Physiol. Behav.* – 1991. – № 50. – P. 967-972.
12. **Brudzynski S.M.** Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches // *ILAR Journal.* – 2009. – Vol. 50. – N. 1. – P. 43-50.
13. **Brudzynski S.M.** Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: Acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding // *Behav. Brain Res.* – 2007. – № 182. – P. 261-273.
14. **Burgdorf J., Knutson B., Panksepp J., Shippenberg T.S.** Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs // *Psychopharmacology.* – 2001. – № 155. – P. 35-42.
15. **Burgdorf J., Kroes R.A., Moskal J.R., Pfau J.G., Brudzynski S.M., Panksepp J.** Ultrasonic vocalization of rats during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback // *J. Comp. Psychol.* – 2008. – № 122. – P. 357-367.
16. **Knutson B., Burgdorf J., Panksepp J.** High-frequency ultrasonic vocalizations index conditioned pharmacological reward in rats // *Physiol. Behav.* – 1999. – № 66. – P. 639-643.
17. **Knutson B., Burgdorf J., Panksepp J.** Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats // *Psych. Bull.* – 2002. – № 128. – P. 961-977.
18. **Sanchez C.** Stress-induced vocalization in adult animals. A valid model of anxiety? // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – № 463(1-3). – P. 133-43.
19. **Wöhr M., Borta A., Schwarting R.K.W.** Overt behavior and ultrasonic vocalization in fear conditioning paradigm: A dose-response study in the rat // *Neurobio Learn Mem.*, 2005, 84:228-240.

Influence of different doses of ethanol on ultrasonic vocalization of rats

Yu.V. Fokin, A.G. Berzina, V.N. Karkischenko, O.V. Alimkina, N.B. Gamaleyа

Influence of different doses of ethanol on parameters of vocalization of rats in the ultrasonic range is investigated. It is established that accumulation of ethanol is reflected in change of frequency spectral characteristics of ultrasonic vocalization of rats. The ethanol entered to rats in doses, approximately equal 1, 3 and 4 g/kg forms a positive affective state, and in doses of 2 and 5 g/kg – negative. Ultrasonic vocalization of the rats who received 3 g/kg of ethyl alcohol can reflect euphoria signs, and close to lethal the dose of 5 g/kg causes detection in ultrasound of signs of a distress. The model of research of a psychoemotional state on vocalization of rats in ultrasound can be recommended for preclinical tests of remedies for alcoholic dependence.

Key words: ethanol, alcoholic intoxication, ultrasonic vocalization, affective state, rats.

Подбор условий и критериев оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий

Ю.М. Мясоедов, В.М. Безгин, В.Е. Козлов

ФКП «Курская биофабрика»

Контактная информация: Мясоедов Юрий Михайлович, MyasoedovYurij@yandex.ru

В соответствии с требованиями международной документации подобраны условия и критерии оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий (КАМ). Показана целесообразность определения биологической активности КАМ на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*. Показано, что определение показателя «специфичность КАМ» предпочтительнее осуществлять на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*, и морских свинках, инфицированных *M. bovis*. Ценность исследования заключается в разработке биологических моделей и подборе доз КАМ, приемлемых для определения биологической активности и специфичности.

Ключевые слова: морские свинки, микобактерии, биологическая активность, специфичность, аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий.

Введение

Туберкулёз животных является одним из распространённых инфекционных заболеваний, причиняющим значительный экономический ущерб животноводству и представляющим эпидемиологическую опасность для людей [3]. Скрининговым методом выявления инфицированных патогенными микобактериями животных является аллергическая проба с использованием ППД туберкулина для млекопитающих [9]. В ряде случаев, при постановке аллергической пробы на животных, инфицированных непатогенными микобактериями, возникают затруднения, обусловленные проявлением неспецифических реакций на ППД туберкулин для млекопитающих. В подобной ситуации последующее аллергическое исследование осуществляют с использованием ППД туберкулина

для млекопитающих и ППД туберкулина для птиц или аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий (КАМ) [5]. При этом использование аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий более выгодно в сравнении с применением ППД для птиц, так как первый имеет более широкий спектр антигенов атипичных микобактерий, циркулирующих на территории Российской Федерации [7].

Известно, что точность аллергического исследования напрямую определяется величиной биологической активности и специфичностью используемых аллергенов. Учитывая различия методик определения биологических характеристик аллергенов, используемых разными лабораториями, на международном уровне были разработаны критерии оценки и методы контроля для

ППД туберкулина для млекопитающих и ППД для птиц и предложены соответствующие эталоны [3, 8]. В то же время, для аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий Международных стандартов, а также условий и критериев оценки биологических параметров качества не разработано.

Целью исследования является подбор условий и критериев оценки величины биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий.

Материалы и методы

В исследовании были использованы 40 беспородных самок морских свинок массой 500 ± 100 г, одновременно полученных из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, филиал «Андреевка». Животных содержали в вольерах на стандартном рационе кормления с использованием гранулированного корма.

Перед заражением морских свинок тестировали на туберкулез аллергическим способом с использованием 5 МЕ ППД туберкулина для млекопитающих [4].

В работе были использованы следующие виды микобактерий: бычьего вида - *M. bovis* штамм BCG; птичьего вида - *M. avium* штамм 2282; атипичные - *M. scrofulaceum* штамм N- 12C Non и *M. intracellulerae* штамм S- 13C Scoto. Микобактерии культивировали на картофельной среде Павловского в течение 25 суток, при температуре 37°C , после чего приготавливали суспензии на физиологическом растворе для инфицирования морских свинок:

- *M. bovis* штамм BCG – 0,2 мг/0,1 см³, внутрикожно;

- *M. avium* штамм 2282 – 3 мг/0,5 см³, внутримышечно;

- смесь *M. scrofulaceum* штамм N- 12C Non и *M. intracellulerae* штамм S- 13C Scoto – по 0,5 мг/ 0,5 см³, внутримышечно.

Через 30 дней после инфицирования животные были использованы в опытах.

В исследовании были использованы следующие микобактериальные аллергены производства ФКП «Курская биофабрика»:

- туберкулин очищенный ППД для млекопитающих, эталонная серия;

- туберкулин очищенный ППД для птиц, эталонная серия;

- аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, производственная серия.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили, используя следующие математические формулы:

- Логарифм относительной активности/специфичности препарата:

$$\lg R = \frac{(\bar{x}_{1\min} - \bar{x}_{2\min}) + (\bar{x}_{1\max} - \bar{x}_{2\max})}{Kb},$$

где \bar{x}_1 – величина ответной реакции (мм) на первый аллерген; \bar{x}_2 – величина ответной реакции (мм) на второй аллерген; K – сумма слагаемых в числителе; b – усреднённый тангенс угла наклона прямых к горизонтальной оси (прямых зависимости ответной реакции от логарифма дозы туберкулина).

- Усреднённый тангенс угла наклона прямых к горизонтальной оси:

$$b = \frac{(\bar{x}_{1\max} - \bar{x}_{1\min}) + (\bar{x}_{2\max} - \bar{x}_{2\min})}{2 \times (\lg d_{\max} - \lg d_{\min})},$$

где d – доза вводимого аллергена.

- Относительная активность/специфичность (R): $R = 10^{\lg R}$

Результаты и их обсуждение

Биологическую активность туберкулинов, изготовленных из *M. bovis*, *M. tuberculosis* и *M. avium*, определяют лабораторным способом на морских свинках, инфицированных теми видами микобактерий, из которых изготовлены аллергены [6]. Учитывая то, что КАМ является комплексным препаратом, в состав которого входят антигены микобактерий двух групп по классификации Ranyon (*M. scrofulaceum* – II группа и *M. intracellulerae* – III группа), определение величины «биологическая активность» предполагает подбор варианта инфицирования морских свинок и определение дозировок аллергенов, обеспечивающих диапазон приемлемых значений реакций от 8 до 25 мм, согласно требованиям МЭБ [9].

Вариантами выбора биологических моделей для определения биологической активности могут быть морские свинки, инфицированные микобактериями, из которых изготовлен КАМ, то есть смесь микобактерий *M. scrofulaceum* и *M. intracellulerae*, либо микобактериями, имеющими высокую степень гомологии с микобактериями, из которых приготовлен аллерген. Так, например, высокой степенью гомологии между антигенами микобактерий, ис-

пользуемых для приготовления КАМ, являются микобактерии *M. avium*, относящиеся к комплексу *M. avium – intracellulerae*. Использование животных, инфицированных *M. avium*, может явиться основой для определения эквивалента биологической активности КАМ в отношении ППД для птиц, и таким образом возможно стандартизовать КАМ в отношении Международного стандарта PPD-*avium*. Принимая во внимание вышеизложенное, подбор условий и критериев для оценки величины «биологическая активность» осуществляли на двух группах морских свинок: 1 – инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulerae* и *M. scrofulaceum*; 2 – инфицированных *M. avium*.

В проведенных исследованиях были определены оптимальные значения доз КАМ – 20 и 2 Ед., а также ППД для птиц – 200 и 20 МЕ, обеспечивающие уровень кожной аллергической реакции от 8 до 25 мм, которые в последующем были использованы для определения величины «биологическая активность КАМ». Оценка вариантов осуществлялась по следующим показателям: значение относительной активности и доверительный интервал. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1

Определение биологической активности КАМ

Показатели	Группа № 3				Группа № 4			
	Смесь микобактерий <i>M. intracellulerae</i> и <i>M. scrofulaceum</i>				<i>M. avium</i>			
Препараты	КАМ		ППД пт.		КАМ		ППД пт.	
d	20 Ед.	2 Ед.	200 МЕ	20 МЕ	20 Ед.	2 Ед.	200 МЕ	20 МЕ
\bar{x}	18,8	10,6	18,7	10,9	16,7	9,7	19,1	14,14
n	10				10			
R	0,98				0,26			
д.и.	53-187				67-149			

Обозначения: d – доза препарата, \bar{x} – среднее значение кожной реакции ПЧЗТ, n – число животных, R – значение относительной активности, д.и. – доверительный интервал (при вероятности $p=0,95$), КАМ – аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, ППД пт. – туберкулин сухой очищенный для птиц.

Из полученных данных видно, что биологическая активность КАМ значимо выше в группе морских свинок, заражённых смесью *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, в сравнении с группой морских свинок, заражённых *M. avium*, $-0,98 > 0,26$, при соответствии границам доверительного интервала 50-200% в обоих случаях. Из этого следует, что данный вариант инфицирования морских свинок оказывает влияние на значение R, что обуславливает целесообразность определения биологической активности на морских свинках, зараженных смесью микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, как наиболее гомологичной модели.

Исследованиями показано, что у микобактерий разных видов, используемых для изготовления микобактериальных аллергенов, в состав клеточной стенки входят родовые и видовые антигены, характеризующиеся сходствами и различиями биологических свойств [3]. Микобактериальные аллергены, в состав которых входит большое количество родовых антигенов, характеризуются низкой специфичностью, ограничивающей их использование для диагностики туберкулёза [1]. Поэтому современные технологии, применяемые при производстве микобактериальных аллергенов, позволяют значительно снизить концентрацию родовых антигенов при концентрировании видовых антигенов в готовом продукте, в т.ч. и при изготовлении аллергена КАМ [2].

Согласно требованиям международной нормативно-технической документации [8, 9], оценка специфичности ППД туберкулина для млекопитающих осуществляется на морских свинках,

инфицированных *M. avium*, а ППД туберкулина для птиц – на морских свинках, инфицированных *M. bovis*, то есть микобактериях, характеризующихся низкой степенью гомологии видовых антигенов в отношении используемого туберкулина. Таким образом, осуществляется косвенная оценка степени очистки аллергена от родовых антигенов, при этом показатель специфичности рассчитывается аналогично показателю «активность», но выражается в процентах.

Принимая во внимание вышеизложенное, следующим этапом исследования был подбор условий и критериев оценки специфичности КАМ.

Одним из обязательных условий при осуществлении дифференциально-диагностического исследования на туберкулёз у животных с ППД для млекопитающих и КАМ является использование таких дозировок, которые обеспечивают проявление более интенсивных аллергических реакций на ППД для млекопитающих в случае инфицирования патогенными микобактериями, при наличии менее интенсивных или отсутствии реакций на КАМ. Аналогичным образом проявляются более выраженные аллергические реакции на КАМ при наличии менее интенсивных или их отсутствии на ППД для млекопитающих при иницировании атипичными микобактериями. Принимая во внимание вышеизложенное, очевидно, что определение специфичности КАМ следует оценивать на морских свинках, инфицированных как смесью микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, так и на морских свинках, инфицированных *M. bovis*.

В результате проведенных исследований были подобраны дозировки для определения показателя «специфичность КАМ», обеспечивающие уровень кожной аллергической реакции от 8 до 25 мм, на морских свинках, инфицированных смесью *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, – 40 Ед. и 4 Ед.; на морских свинках, инфицированных *M. bovis*, – 675 Ед. и 27 Ед. При определении показателя специфичности ППД для млекопитающих на морских свинках, инфицированных смесью *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, были использованы дозы 1000 и 100 МЕ, а на морских свинках, инфицированных *M. bovis*, – 25 и 1 МЕ, что также обеспечивает интенсивность кожных аллергических реакций от 8 до 25 мм. Оценка тестов осуществлялась по следующим показателям: значение относительной активности и доверительный интервал. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Из полученных данных видно, что при использовании морских свинок,

инфицированных смесью атипичных микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, процентное выражение специфичности КАМ соответствует двум, а при использовании группы морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis*, показатель специфичности ППД для млекопитающих соответствует шести. В свою очередь, в нормативно-технической документации МЭБ и ЕС установлен показатель специфичности для ППД туберкулина для млекопитающих и ППД туберкулина для птиц, который не должен превышать 10%. Таким образом, показана целесообразность использованного подхода в реализации теста при определении специфичности. Результаты проведенных исследований явились основой при разработке тестов контроля показателей «величина», «биологическая активность» и «специфичность» аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий и были отражены в нормативной документации – СТО 00482909.

Таблица 2

Определение специфичности КАМ

Показатели	Группа № 1				Группа № 2			
	Смесь микобактерий <i>M. intracellulatae</i> и <i>M. scrofulaceum</i>				<i>M. bovis</i>			
Заражение								
Препараты	КАМ		ППД мл.		ППД мл.		КАМ	
d	40 Ед.	4 Ед.	1000 МЕ	100 МЕ	25 МЕ	1 МЕ	675 Ед.	27 Ед.
\bar{x}	13,56	8,88	13,56	10,25	17,75	13,15	17,45	11,55
n	10				10			
R (%)	0,02 (2,0%)				0,059 (5,9%)			
д.и.	50-200				50-197			

Обозначения: d – доза препарата, \bar{x} – среднее значение кожной реакции ПЧЗТ, n – число животных, R – значение относительной активности, д.и. – доверительный интервал (при вероятности $p=0,95$), КАМ – аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, ППД мл. – туберкулин сухой очищенный для млекопитающих.

Выводы

1. В соответствии с требованиями международной документации подобраны условия и критерии оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий.

2. Показана целесообразность определения биологической активности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*.

3. Показано, что определение показателя «специфичность» аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий предпочтительнее осуществлять на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*, и морских свинках, инфицированных *M. bovis*.

Список литературы

1. **Безгин В.М.** Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика / Дисс... канд. биол. наук. - М. 1990. 134 с.
2. **Безгин В.М., Козлов В.Е.** Новые технологии производства диагностических препаратов для ветеринарной медицины // Ветеринарная медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. - Харків. 2003. № 81. С. 41-45.
3. **Кошечкин В.А., Иванова З.И.** Туберкулез. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2007. 302 с.
4. Методические наставления по проведению исследований при микобактериозах животных. - М. 2012. 85 с.
5. Наставление по диагностике туберкулеза животных. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 18 ноября 2002 г. - М. 2002 г. 63 с.
6. **Фрадкин В.А.** Диагностические и лечебные аллергены. - М.: Медицина. 1990. С. 52-53.
7. **Шаров А.Н.** Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение её эффективности / Дисс... докт. вет. наук. - М.: 1990
8. European Pharmacopoeia, 4th ed. Council of Europe Strasbourg. 2002. P. 2088-2089.
9. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed. 2012. Vol. 1. P. 683-695.

Selection of conditions and criteria of an estimation of biological activity and specificity of Purified Allergen of atypical mycobacterium

Yu.M. Myasoedov, V.M. Bezgin, V.E. Kozlov

According to the International Documentation requirements of the parameters and the criteria of the biological activity estimation and specificity of Purified Allergen of atypical mycobacterium weve found out. The expediency of definition of size biological activity of Purified Allergen of atypical mycobacterium on the guinea pigs infected with mixture of mycobacteria *M. intracellulareae* and *M. scrofulaceum* is shown. It is shown, that the definition of a parameter of Purified Allergen of atypical mycobacterium requires to carry out the specificity of the allergen on guinea pigs infected with a mixture of mycobacterium *M. intracellulareae* and *M. scrofulaceum* and the guinea pigs infected *M. bovis*. The main point of the research consists of in the development of biological models and selection of dozes of Purified Allergen of atypical mycobacterium for the definition of size biological activity and specificity.

Key words: guinea pigs, mycobacteria, biological activity, specificity, Purified allergen of atypical mycobacterium.



Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей

В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко

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

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

Работа посвящена исследованию последствий влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самцов лабораторных крыс и мышей. В эксперименте были использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии НУ/У, выведенные и поддерживаемые в НЦБМТ ФМБА России, и мыши линии С57BL/6У, поддерживаемые также в НЦБМТ. Молодых половозрелых самцов крыс и мышей, подвергнув воздействию острой гипобарической гипоксии, на 9-18 дни постгипоксического периода спаривали с виргинными самками. Для выявления последствий острого гипоксического стресса на мужские половые клетки учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводили, вскрывая самок на 19-20 дни беременности. Установлено, что при общей смертности эмбрионов в постимплантационном периоде развития в 32,3% у самок крыс и в 40,2% у самок мышей доля смертности эмбрионов, обусловленная влиянием острой гипоксии, составила 27,2% и 32,8% соответственно. Потери из числа овулировавшихся яйцеклеток на доимплантационной стадии у самок в опыте составили у крыс – 16,6%, у мышей – 5,2%. Таким образом, суммарные потери под влиянием острой гипоксии на мужские репродуктивные клетки были равны у самок крыс 43,8%, у самок мышей – 38,0%. Экспериментально установлено также, что уровень постимплантационной эмбриональной смертности находится в прямой зависимости от «качества очистки» (числа спариваний) самца от сперматозоидов предыдущих стадий сперматогенеза. Так, если после 1-го и 2-го спаривания величина постимплантационной эмбриональной смертности составила около 20%, то после 3-го и 4-го – она возросла до 46-78,8%.

Ключевые слова: острая гипобарическая гипоксия, репродуктивная функция, крысы, мыши.

Введение

Гаметогенез является сложным энергозависимым процессом, весьма чувствительным к дефициту кислорода, что обуславливает его высокую ранимость при различных ишемических и гипоксических воздействиях. В настоящее время актуальным и недостаточно изученным являются последствия влияния острой

гипоксии на репродуктивные клетки млекопитающих. Определенный интерес в этом аспекте представляет работа [5], в которой проводилось изучение последствий острой гипобарической гипоксии на процессы сперматогенеза у крыс. Отмечено, что начиная с 3 суток эксперимента, наблюдалось значительное уменьшение количества всех типов клеток спермато-

генного эпителия, а на 14-е сутки наблюдения у всех животных в ткани тестикул отсутствовали ранние сперматиды, а клетки Лейдига были обнаружены только у 20% экспериментальных животных. Вероятно, это единственная работа, где проводилось изучение влияния острой гипобарической гипоксии на процессы сперматогенеза у млекопитающих. Вместе с тем, следует отметить, что в ней исследовали и сопоставляли эффект острой гипоксии только в процессе формирования половых клеток.

Учитывая отсутствие работ по планируемой теме, **целью** наших исследований было изучить влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самцов крыс и мышей между второй – началом третьей недели постгипоксического периода.

Материалы и методы

Для исследования последствий влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки половозрелых самцов крыс и мышей подвергали воздействию острой гипоксии. Начиная с 1 суток, к каждому самцу на ночь подсаживали виргинных самок (в соотношении 1:1 у крыс и 2:1 у мышей), чтобы иметь фиксированную беременность. Для этого утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс и влагалищных пробок у самок мышей отбирали и вели отсчет срока беременности. Учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводили путем вскрытия самок крыс на 20-й день, самок мышей – на 19-й день беременности. В эмбриологический анализ не были включены самки крыс и мышей, у которых полностью отсутствовали им-

плантанты. Таким образом, было исследовано 80 самок крыс и 60 самок мышей в опыте, по 50 – в контроле.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, 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), Strasburg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [2]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Исследования направлены на изучение последствий влияния острой гипобарической гипоксии на мужские репродуктивные клетки крыс и мышей.

Моделирование острой гипобарической гипоксии для самцов крыс осуществляли в барокамере при разрежении атмосферы в 145 мм рт.ст., что соответствует высоте 11500 м над уровнем моря. Подъем на «высоту» длится 1 мин, у низкоустойчивых животных время жизни на «высоте» не превышает 60 сек., что, естественно, не может являться значимой мерой воздействия, способной оказать влияние на репродуктивные клетки. Поэтому после подъема самца на критическую «высоту», и с момента, когда он начинал биться в агонии, во избежание его гибели, «опуска-

ли» до предельной для него «высоты» – 9000-9500 м и продолжали подвергать гипоксии, которая длилась 8-10 мин. Что касается воздействия острой гипобарической гипоксии на самцов мышей, то оно отличалось от крыс только тем, что «высота» подъема для них не превышала 8000 м.

Результаты и их обсуждение

С целью изучения последствий влияния острой гипоксии на мужские репродуктивные клетки, молодых половозрелых самцов крыс и мышей подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии и на 9-18 дни постгипоксического периода спаривали с виргинными самками (по видам). Для учета уровня

эмбриональной смертности в утробном периоде развития самок крыс вскрывали на 20-й день, самок мышей – на 19-й день беременности. Результаты проведенного эмбриологического анализа представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Полученные данные позволили установить, что число имплантатов на самку крыс в опыте составило, в среднем, 9,16, в контроле – 10,98; у мышей – соответственно – 7,34 и 7,74. Расчет, произведенный по формуле (предложенной нами), показал, что потери на доимплантационном периоде развития (Р) составили у крыс 16,6%, у мышей – 5,2%.

$$P = \left(1 - \frac{\text{число имплантатов на 1 самку в опыте}}{\text{число имплантатов на 1 самку в контроле}} \right) \times 100$$

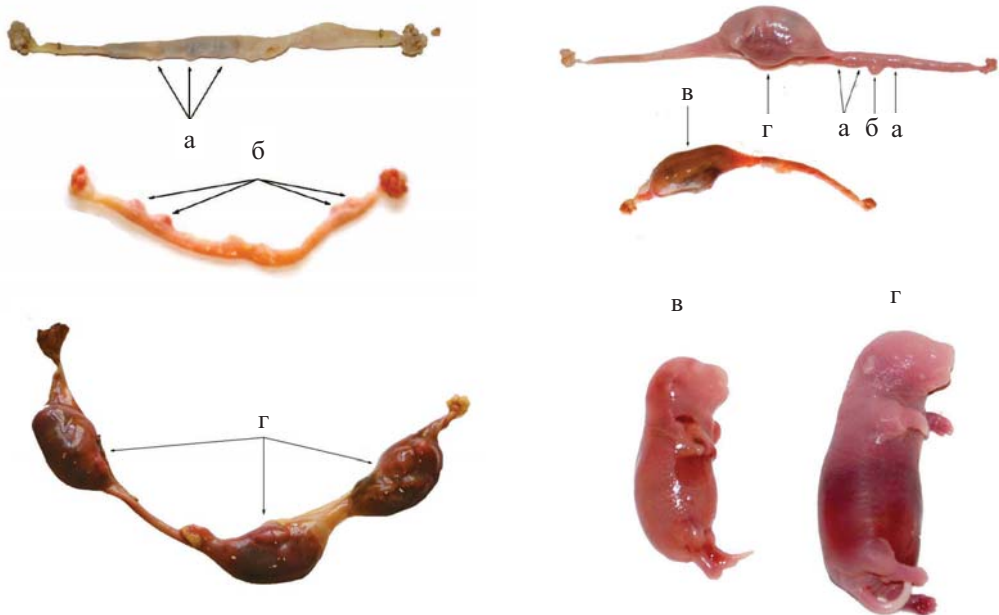


Рис. 1. Потомство самцов, подвергнувшихся острому гипоксическому стрессу (вскрытие на 20 день):
 А – эмбрионы, погибшие в период имплантации 4-6 день развития;
 Б – погибшие на 7-8 день;
 В – гибель эмбрионов наступила на 15-17 день развития;
 Г – эмбрионы, перенесшие острую гипоксию.

**Последствия влияния острой гипобарической гипоксии
на репродуктивные клетки самцов крыс и мышей**

Показатель	Крысы		Мыши	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Число самок	80	50	60	50
Число мест имплантаций	733	549	440	387
Среднее число эмбрионов на 1 самку (M±m)	9,16±0,33	10,98±0,24	7,34±0,22	7,74±18
Коэффициент вариации	28,7	19,3	30,7	18,3
Число живых эмбрионов	496	521	263	358
Среднее число живых эмбрионов на 1 самку	6,2±0,27	10,42±0,21	4,38±0,31	7,16±0,19
Коэффициент вариации	45,4	20,76	54,65	16,17
Мертвых эмбрионов всего	237	28	177	29
% от общего числа	32,3	5,1	40,2	7,4
В т.ч. спонтанная эмбриональная смертность (%)		5,1		7,4
В т.ч. % погибших от гипоксии	27,2		32,8	

Значительное превышение доимплантационных потерь у самок крыс могло быть обусловлено разницей в чувствительности поздних сперматид, в результате которой зрелые сперматозоиды оказались неспособными оплодотворить яйцеклетки, либо оплодотворенные ими зародыши почему-то не получили дальнейшего развития, в любом варианте они вызваны под воздействием гипоксии.

Согласно результатам проведенного анализа, посимплантационная эмбриональная смертность у самок крыс опытной группы, в целом, составила 32,3%, у мышей – 40,2%. Однако учитывая, что спонтанная постимплантационная эмбриональная смертность у крыс была равна 5,1%, у мышей – 7,4%, то реальная смертность эмбрионов, обусловленная влиянием острой гипоксии, у самок крыс составила 27,2%, у мышей – 32,8%. Следовательно, суммарная эмбриональная смертность, вызванная влиянием острой гипобарической гипоксии, у крыс равна 43,8%, у мышей – 38,0%.

Ранее [3], исследуя частоты транслокаций, индуцированных Химическим мутагеном (тио-ТЭФ) в половых клетках самок и самцов мышей, нами было установлено, что они практически равны. В то же время, под воздействием острой гипобарической гипоксии чувствительность репродуктивных клеток, выраженная в эмбриональной смертности потомства, у самок [3] и самцов (в настоящем эксперименте) крыс имела значительные расхождения. Так, если под влиянием острой гипоксии на репродуктивные клетки самок постимплантационная эмбриональная смертность была равна 32,89%, то у самцов она равнялась 27,2%, суммарная эмбриональная смертность составила, соответственно, 47,16% и 43,80%. Есть основание предположить, что расхождение по уровню эмбриональной смертности у самок крыс, обусловленное влиянием острой гипоксии на половые клетки самок и самцов, вызвано физиологическими особенностями реализации последних.

Известно, что период дифференциации мужских и женских генеративных клеток протекает постоянно. При этом, если женские половые клетки каждой стадии овогенеза, овулируясь, покидают половые пути самки, то у самцов это происходит только лишь при спаривании с самками. Во всех остальных случаях сперматозоиды скапливаются в семяприемнике, что ведет к наложению одной стадии сперматогенеза на другую. Чтобы уменьшить погрешность, обусловленную этим процессом, при постановке эксперимента на чувствительность мужских половых клеток той или иной стадии сперматогенеза предварительно проводят «очистку» семяприемника самца. С целью изучения связи между степенью «очистки» самца от сперматозоидов предыдущих стадий, определяемой числом спариваний его с самками и уровнем эмбриональной смертности, нами был проведен дифференцированный учет постимплантационной эмбриональной смертности у крыс, результаты которого представлены в табл. 2 и на рис. 2.

Таблица 2
Зависимость эмбриональной смертности потомства от числа спариваний самцов, подвергшихся острой гипобарической гипоксии

Число спариваний самца	Общее число имплантатов	В т.ч. мертвых эмбрионов	Доля погибших эмбрионов (%)
1	247	29	11,7
2	213	42	19,7
3	150	69	46,0
4	123	97	78,8

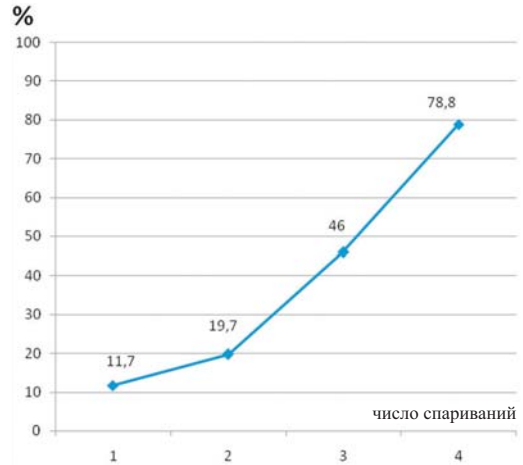


Рис. 2. Характер зависимости уровня эмбриональной смертности потомства от числа спариваний самцов, перенесших острый гипоксический стресс.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии прямой зависимости уровня гибели эмбрионов от числа спариваний самца. Так, если после первого и второго спаривания смертность эмбрионов не превышала 20%, то после 3-го 4-го она достигла 46-78,8%. И, наконец, необходимо указать, что в настоящем эксперименте, также как и в предыдущей нашей работе [3], число «прохолостившихся» по неустановленным причинам самок крыс в опыте составило 23, самок мышей – 12 особей.

Выводы

В настоящей работе исследованы последствия влияния острой гипобарической гипоксии на мужские половые клетки лабораторных крыс и мышей. Установлено, что острая гипоксия оказала существенное влияние на мужские репродуктивные клетки крыс и мышей, вызывая высокую эмбриональную

смертность на постимплантационной стадии развития.

Уровень смертности эмбрионов после имплантации под воздействием острой гипоксии у крыс составил 27,2%, у мышей – 32,8%. Доля потерь на доимплантационной стадии у самок крыс опытных групп была равна 16,6%, у мышей – 5,2%. Следовательно, суммарные потери, обусловленные влиянием острой гипобарической гипоксии на мужские репродуктивные клетки, составила у крыс 43,8%, у мышей – 38,0%. Экспериментально установлено также, что уровень постимплантационной эмбриональной смертности находится в прямой зависимости от «качества очистки» (числа спариваний) самца от сперматозоидов предыдущих стадий сперматогенеза. Так, если после 1-го и 2-го спаривания величина постимплантационной эмбриональной смертности составила около 20%, то после 3-го и 4-го она возросла до 46-78,8%

Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. 2013. № 1. С. 7-17.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль – 2С. 2010. 358 с.
3. Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н. Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. Сообщение 2: Исследование последствий острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей // Биомедицина. № 2. 2014. С. 80-85.
4. Семенов Х.Х., Малащенко А.М. Поиск гетерозиготных по транслокациям самок мышей среди потомков от самцов, подвергнутых воздействию химического мутагена (тио-ГЭФ) // Цитология и генетика. № 5. - Киев. 1977. С. 454-457.
5. Шевантаева О.Н., Рыжиков Д.И., Косога Ю.И., Баландина М.В. Возможность коррекции нарушений сперматогенеза после острой гипобарической гипоксии / Мат-лы 4-ой Российской конф. - М. 2005. С. 120-121.
6. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Ганапольский 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. № 4. 2013. С. 29-45.

Influence of a sharp hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice

V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko

Work is devoted to research of consequences of influence of a sharp hypobaric hypoxia on reproductive cages of males of laboratory rats and mice. In experiment the rats of the HY/Y line, low-steady against a hypoxia brought and supported in SCBMT of FMBA of Russia and a mouse of the C57BL/6Y line supported also in our Center were used. Young sexually mature of males of rats and mice, having subjected to influence of a sharp hypobaric hypoxia, for 9-18 days of the post-hypoxemic period coupled to virginny females. For identification of consequences of acute hypoxemic stress on man's gametes, the accounting of embryonic mortality in the uterine period of development carried out, opening females for 19-20 days of pregnancy. It is established that at the general mortality of embryos in the post-implantation period of development in 32,3% in females of rats and in 40,2% at females of mice, the share of mortality of embryos caused by influence of a sharp hypoxia made 27,2% and 32,8%, respectively. Losses from among the ovulated ova at a preimplantation stage at females in experience made at rats – 16,6%, at mice – 5,2%. Thus, total losses under the influence of a sharp hypoxia on man's reproductive cages were equal at females of rats 43,8%, at females of mice – 38,0%. It is experimentally established also that the level of post-implantation embryonic mortality is in direct dependence on “quality of cleaning” (number of pairings) of a male on spermatozoa of the previous stages of a spermatogenesis. So, if after the 1st and 2nd pairing the size of post-implantation embryonic mortality made about 20%, after the 3rd and 4th – it increased to 46-78,8%.

Key words: sharp hypobaric hypoxia, reproductive function, rats, mice.

Биологическая модель экспериментального невроза у лабораторных животных

В.Ц. Болотова¹, В.А. Крауз¹, Е.Б. Шустов²

¹ – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия МЗ РФ», Санкт-Петербург

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

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

Целью настоящего исследования является статистический анализ модели экспериментального невроза у лабораторных животных. Проанализированы типичные модели невроза, показаны их достоинства и недостатки. Изучена динамика показателей эмоционального состояния животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) в разные сроки формирования неврозоподобного состояния. Количественная оценка невротизации животных учитывает как бальную оценку показателей теста ПКЛ, так и выраженность поведенческих признаков невроза. Разработана методика оценки выраженности признаков экспериментального невроза у лабораторных животных. Установлено, что для формирования экспериментального невроза у крыс наиболее оптимальным является весенне-летний период. Биомедицинская модель экспериментального невроза может быть использована для проведения доклинических исследований по изучению эффективности новых антиастенических средств.

Ключевые слова: неврозы, биологическое моделирование, лабораторные животные.

Введение

Одной из наиболее распространённых форм патологии нервной системы являются неврозы. Термин «невроз» применяют для обозначения функциональных расстройств нервной системы. Неврозы относят к «болезням цивилизации» и связывают широкую их распространённость с нарастающей урбанизацией населения, информационными перегрузками, уменьшением доли физического труда в жизни современного человека, воздействием на него неблагоприятных социально-бытовых факторов, многочисленных психотравмирующих ситуаций.

По данным ВОЗ, заболеваемость неврозами в мире за последние 65 лет возросла более чем в 20 раз. Дан-

ные эпидемиологических исследований неврозов свидетельствуют не только о большой медицинской, но и социально-экономической значимости этой проблемы: заболеваемость неврозами достигает 20-30% [1]. Поэтому информативная и статистически корректная биологическая модель формирования невротического состояния является ценным инструментом разработки и доклинической оценки эффективности новых антиневротических средств.

Патогенетические аспекты формирования экспериментальных неврозов. Клиническая картина почти всех форм неврозов включает в себя нарушение сна, эмоционального состояния и вегетативно-висцеральные, пре-

имущественно сердечно-сосудистые, и желудочно-кишечные расстройства. В последнее время все чаще встречаются указания на важную роль в патогенезе неврозов структур лимбико-ретикулярного комплекса, с которым связана основная симптоматика болезни.

Нарушения условно-рефлекторной деятельности после невротизирующих воздействий наблюдали у всех лабораторных животных, но выражались они по-разному: в виде увеличения латентных периодов и нарушения силовых отношений рефлексов с развитием фазовых состояний (уравнительная, парадоксальная, ультрапарадоксальная), снижения или выпадения условных рефлексов и т.п. Четко выявлялась зависимость характера нарушений условно-рефлекторной деятельности от типологических особенностей нервной системы животных. Нарушения эти были длительными и носили, особенно в начале процесса, волнообразный характер: периодическое улучшение без всякой видимой причины вновь сменялось ухудшением. Эти волнообразные изменения состояния вегетативной и рефлекторной нервной деятельности рассматриваются не как проявление начинающейся болезни, а скорее как мобилизация защитных сил организма. При невротических нарушениях, вызванных длительными стрессовыми воздействиями, происходит истощение катехоламиновых систем, что может привести к снижению интенсивности метаболических процессов. Отмечены нарушения всех фаз сна – укорочение продолжительности глубоких фаз сна, увеличение числа пробуждений, его дефектность

и функциональная неполноценность. Были выявлены нейромедиаторные, сосудистые и глионейрональные нарушения, указывающие на развитие в ЦНС гипоксии и снижение скорости локального мозгового кровотока в 2-3 раза [1, 3-5].

Основная масса исследователей придерживается следующей схемы патогенеза неврозов: психоэмоциональный стресс → стимуляция мозговой деятельности; стрессорные реакции → нарушение интегративной деятельности (дезинтеграция нервной деятельности, нарушения поведения и сна) → нарушения вегетативной нервной деятельности, нейромедиаторной активности, эндокринной системы (симптоадреналовые сдвиги, увеличение выработки дофамина, ваготонии, инсулярные сдвиги) → нарушения метаболизма микроструктур и микроциркуляции → нарушения деятельности внутренних органов и соматической сферы. Формируется порочный круг: гипоксия мозга стимулирует психоэмоциональный стресс и стимулирует деятельность мозга [1, 3, 4, 9].

В условиях экспериментального невроза у лабораторных животных воспроизводятся следующие состояния:

1. Неврозы с преобладанием процессов возбуждения. Развивается в результате ослабления процессов торможения. Его характерными особенностями является:

- постоянное и неадекватное волнение;
- частая агрессия по отношению к другим особям.

2. Неврозы с преобладанием процессов торможения. Данное психическое

состояние является результатом ослабления процессов возбуждения. Характерные особенности течения данного психического состояния проявляются в следующем:

- развитие пассивных оборонительных реакций;
- депрессия;
- сонливость животного.

Для решения задач экспериментальной психофармакологии модели экспериментального невроза должны удовлетворять ряду требований:

- модальности и интенсивности эмоционального состояния животных (хотя бы в условных градациях его выраженности);
- адекватности выполнения нестандартных форм поведения в эмоционально-стрессовой ситуации;
- характера внутригрупповых взаимодействий животного, т.е. состояния адекватности его зоосоциальных контактов;
- вегетативных проявлений, возникающих в условиях эмоциогенной ситуации.

В настоящее время в исследовательской практике встречаются следующие методические подходы к моделированию неврозоподобных состояний у лабораторных животных:

1. Ограничение рефлекса – инстинкта свободы – фиксация в станке, вынужденная гипокинезия (иммобилизационный стресс).

2. Изменение суточного светоритма и ритмов сна, питания и водопотребления (десинхроноз, конфликт афферентных возбуждений).

3. Изменение привычных иерархических отношений (изоляция, зоосоциальный стресс).

4. Астенизация нервной системы (шум, депривация сна, длительные вибрационные воздействия, изменения газового состава вдыхаемого воздуха, вынужденная физическая нагрузка, непривычные температурные или запаховые воздействия и т.п.).

Сравнительная характеристика современных экспериментальных моделей невроза представлена в табл. 1.

Анализ достоинств и недостатков различных методических подходов к экспериментальной невротизации лабораторных животных показал, что при отсутствии дополнительных специальных требований более адекватным задачам психофармакологических исследований можно считать подход, связанный с конфликтом афферентных возбуждений и формированием десинхроноза у лабораторных животных.

Необходимо также отметить, что в литературе нет единого взгляда на информативность различных методик оценки состояния животных в процессе невротизации, а также критерии формирования невроза. О состоянии невроза, как правило, судят на основании качественных признаков, в то время как количественные оценки его выраженности или отсутствуют вообще, или затрагивают только отдельные признаки, но не их совокупность. Не представлены также количественные данные о влиянии на эффективность формирования невроза таких значимых для состояния грызунов факторов как сезонность, пол и возраст лабораторных животных.

Целью настоящего исследования является статистический анализ модели экспериментального невроза у лабораторных животных.

Сравнительная характеристика моделей невроза ([1, 3, 8, 9])

Модель	Достоинства	Недостатки
Ограничение рефлекса – инстинкта свободы – фиксация в станке, вынужденная гипокинезия (иммобилизационный стресс)	<ul style="list-style-type: none"> - формирование устойчивого эмоционально-стрессового состояния - приводит к патологии одних и адаптации других регуляторных систем; - позволяет полно интерпретировать результаты; - результаты легко воспроизводимы 	<ul style="list-style-type: none"> - невозможность длительного воздействия на животного; - быстрое формирование адаптационных механизмов
Изменение суточного светоритма и ритмов сна, питания и водопотребления (десинхроноз, конфликт афферентных возбуждений)	<ul style="list-style-type: none"> - свободная двигательная активность животных; - позволяет полно интерпретировать результаты; - результаты легко воспроизводимы 	<ul style="list-style-type: none"> - медленное развитие процесса; - нарушение воспроизводства потомства; - необходимость дифференцирования эффектов невротизации от нарушений сна и нарушения питания
Изменение привычных иерархических отношений (изоляция, зоосоциальный стресс)	<ul style="list-style-type: none"> - свободная двигательная активность животных; - феномен доминирования и подчинения; - выделение наиболее жизнеспособных особей; - управленческая иерархия 	<ul style="list-style-type: none"> - воспроизводит невротическую картину не у всех животных; - выраженность невроза относительно слабая; - результаты в разных группах животных трудно воспроизводимы
Астенизация нервной системы (шум, депривация сна, длительные вибрационные воздействия, изменения газового состава вдыхаемого воздуха, вынужденная физическая нагрузка, непривычные температурные или запаховые воздействия и т.п.)	<ul style="list-style-type: none"> - снижение частоты реакции на исследователя и смены обстановки; - свободная двигательная активность животных; - очень хорошо воспроизводится у кроликов и морских свинок 	<ul style="list-style-type: none"> - требуется дополнительное оборудование для астенизирующих воздействий; - длительность процедуры (4-9 недель); - моделируется на ограниченных видах лабораторных животных; - результаты трудно воспроизводимы

Материалы и методы

Исследование проведено в ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия МЗ РФ» на 20 инбредных крысах, разводимых в питомнике «Рапполово». Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией организации. Животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе. В эксперименте были использованы белые беспородные крысы-самцы массой 120-180 г, по 10 особей в каждой серии исследования. С целью оценки значимости фактора сезонности, одна серия исследований проводилась в весенне-летний период, вторая – в осенне-зимний.

Хроническая невротизация крыс осуществлялась методом «конфликта афферентных возбуждений». В качестве стрессоров использовали экстероцептивные раздражители: свет электрической лампочки мощностью 300 Вт, звук электрического звонка интенсивностью 60 дБ и электрический ток пороговой величины. Раздражители подавали в соответствии с программой [4], представленной на рис. 1. Базовый цикл предъявления раздражителей длился 8 мин. Время действия каждого раздра-

жителя, применяемого отдельно, а также в сочетании с другими раздражителями, во всех случаях программы было различным, и интервалы между ними были также неодинаковы. Модель экспериментального невроза создавали в течение 1 мес., ежедневно помещая животных на 2 ч в условия стрессового воздействия. Продолжительность исследования составила 30 дней.

Оценку поведенческих реакций у лабораторных животных проводили в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ). Тестирование осуществлялось до начала невротизации (фон), а также ежедневно на протяжении 30 дней периода невротизации. Изменения в поведенческих реакциях животных оценивались как динамика среднегрупповых значений по отношению к фону [2].

В тесте ПКЛ оценивали состояние тревожности животных. Крысу помещали в центр установки, которая состояла из крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом 4-х рукавов длиной 45 и шириной 10 см (высота стенок в закрытых рукавах 10 см): два противоположных открытых, без стенок, и два закрытых, темных. В

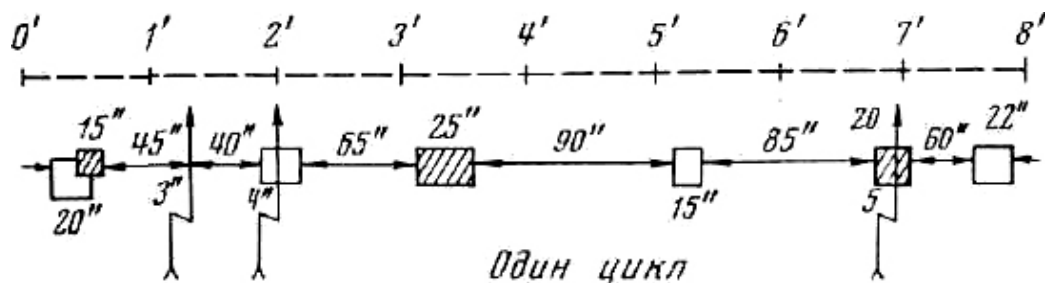


Рис. 1. Схема программы стрессового невротизирующего воздействия («конфликт афферентных возбуждений»). Обозначения: белые фигуры – свет; заштрихованные – звук; стрелка – электрический ток.

центре расположенных крест-накрест рукавов лабиринта находится открытая площадка размером 10x10 см. Исследования проводились при обычном освещении в течение 3 мин. Тест позволяет оценить уровень тревожности животных под влиянием длительного стресса. В течение эксперимента определяли время, проведенное животными в открытых и закрытых рукавах, число заходов в открытые и закрытые рукава, количество свешиваний и выглядываний с открытого рукава, количество стоек, груминг, время нахождения на центральной площадке, латентный период первого захода в открытый рукав, число уринаций и дефекаций. Кроме того, во время выполнения теста фиксировались случаи «нестандартного» поведения животных, которые могли бы быть отнесены к внешним признакам невроза у лабораторных животных.

Статистическая обработка данных проводилась в электронном виде с помощью пакета Microsoft Excel (модули «Описательная статистика», «Однофакторный дисперсионный анализ», «Корреляционный анализ»). Для выявления фазности в динамике показателей проводилась их нормализация в Т-балльные оценки по отношению к фоновым данным с последующим построением соответствующих лонгитюдных кривых.

Результаты весенне-летней и осенне-зимней серий исследования анализировались отдельно, а также в схеме однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты и их обсуждение

Однофакторный дисперсионный анализ, выполненный для показателей теста ПКЛ в отношении внешнего фактора «Невротизирующее воздействие»

по всей продолжительности исследования (30 дней), показал, что ни один из анализируемых показателей не может быть охарактеризован как высоко чувствительный к воздействию. Так, только для показателя «Груминг», характеризующего состояние комфорта у животных, отмечено слабое статистически значимое влияние фактора «невротизирующее воздействие» (снижение на 33% – умеренный дискомфорт, коэффициент детерминации $D=0,03$; $p=0,07$). По показателям, характеризующим особенности эмоционального состояния животных:

- «Время нахождения в открытом рукаве»: коэффициент детерминации $D=0,02$; $p=0,13$ (снижение на 56%, эмоционально спокойное состояние);

- «Количество заходов в закрытый рукав»: коэффициент детерминации $D=0,01$; $p=0,24$ (повышение на 33%, умеренная тревожность).

Для остальных показателей теста ПКЛ коэффициент детерминации фактора «Невротизирующее воздействие» был меньше 1%, а статистическая значимость отличий от фона варьировала от 0,5 до 0,9.

Отсутствие достоверного влияния стрессовых для животных хронических воздействий может быть связано, как минимум, с тремя причинами: недостаточностью силы воздействия, фазностью процесса, адаптацией к воздействию. Кроме того, может играть роль высокая вариативность самих исследуемых показателей, так как они анализировались в «сыром», не нормированном виде.

Для оценки фазности процесса невротизации был выполнен лонгитюдный анализ, для которого показатели теста ПКЛ, снимаемые в ходе невротизиру-

ющего процесса, были преобразованы в Т-оценки по отношению к фоновым данным по следующей формуле:

$$T=50+10*(X_i-X_m)/\sigma,$$

где Т – нормированная оценка показателя, соответствующая его месту на кривой нормального распределения; X_i – конкретное «сырое» значение показателя в соответствующий день невротизации; X_m – среднее значение параметра в фоновом исследовании; σ – стандартное отклонение показателя в фоновом исследовании.

Результаты лонгитюдного анализа динамики показателей теста ПКЛ при невротизирующем воздействии представлены на рис. 2 и 3.

Анализ данных, динамика которых отражена на рис. 2, показывает, что для них можно вычленить определенную фазность процесса невротизации. При этом первая фаза (1-4 дни) отражает стрессовую активацию животных (снижение количества заходов в закрытый рукав, повышение эмоциональной лабильности, повышение латентного пе-

риода захода в открытый рукав). Вторая фаза отражает переходный период от стресс-активации к началу невротизации животных. Она характеризуется постепенным волнообразным снижением эмоциональной лабильности животных при сохраненном высоком уровне стрессового поведения (количество заходов в темный рукав остается повышенным). Продолжительность этой фазы составляет 6-8 дней (с 5 по 11-13 день невротизации). Третья фаза захватывает период после 11-13 дня невротизирующего воздействия и характеризуется умеренно-повышенными признаками тревоги (увеличение длительности пребывания в закрытом рукаве) при стабилизации на низком уровне показателей эмоциональной лабильности и количества заходов в закрытый рукав и латентного периода 1 захода в открытый рукав. Таким образом, третья фаза отражает сочетание невротических проявлений и адаптации животных к хроническому стрессовому воздействию.

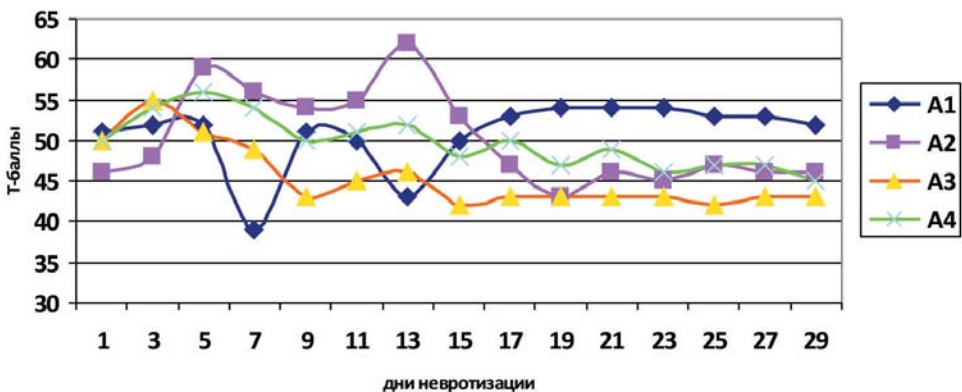


Рис. 2. Динамика показателей теста ПКЛ, отражающих эмоционально-тревожное состояние лабораторных животных в ходе невротизации. Обозначения: А1 – время пребывания в закрытом рукаве, А2 – количество заходов в закрытый рукав, А3 – эмоциональная лабильность, А4 – латентный период первого захода в открытый рукав.

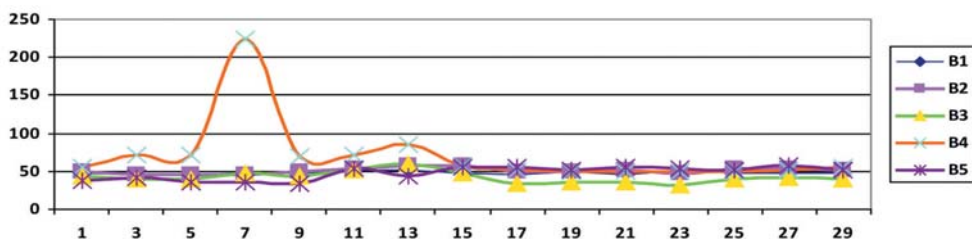


Рис. 3. Динамика показателей теста ПКЛ, отражающих эмоционально-комфортное состояние лабораторных животных в ходе невротизации. Обозначения: В1 – время пребывания в открытом рукаве, В2 – количество заходов в открытый рукав, В3 – ориентировочная активность, В4 – время пребывания на центральной площадке (конфликт мотиваций), В5 - груминг.

Анализ рис. 3 показывает, что параметры теста ПКЛ, связанные с открытыми участками лабиринта (открытый рукав и центральная площадка), практически не чувствительны к использованному в модели хроническому стрессовому воздействию. Их значения остаются в зоне, близкой к 50 Т-баллам, то есть соответствуют диапазону нормальных фоновых значений. И только показатель времени пребывания животных на центральной площадке, отражающий

конфликт мотиваций, оказался чувствительным ко второй фазе (перехода от стрессовой активации к собственно невротизации) формирующегося неврозоподобного состояния.

С учетом выявленных фазных изменений в динамике ряда показателей теста ПКЛ, для них был выполнен однофакторный дисперсионный анализ по внешнему фактору «Фазность процесса». Результаты дисперсионного анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты однофакторного дисперсионного анализа показателей теста ПКЛ по внешнему фактору «Фазность процесса»

Показатель теста ПКЛ	Центроиды групп по фазам невротизации				Коэффициент детерминации (D)	Достоверность различий (p)
	фон	фаза стресса	переходная фаза	фаза невротизации		
Кол-во заходов в закрытый рукав	2,3	2,0	3,2	4,1	0,13	0,001
Ориентировочная активность	15,2	9,8	12,1	18,7	0,12	0,001
Эмоциональная лабильность	1,8	2,7	1,6	0,6	0,11	0,004
Груминг	5,1	3,3	2,9	4,5	0,07	0,03
Кол-во заходов в открытый рукав	0,8	0,6	0,5	1,3	0,07	0,04
Время пребывания в открытом рукаве	0,15	0,06	0,05	0,14	0,05	0,10
Латентный период 1 захода в открытый рукав	2,5	2,8	3,5	2,8	0,02	0,40
Время пребывания в закрытом рукаве	4,4	4,4	4,3	4,2	0,02	0,61
Время пребывания на центральной площадке	0,04	0,24	0,23	0,28	0,01	0,77

Анализ табл. 2 показывает, что к фазным признакам невротизации лабораторных животных при хроническом стрессовом воздействии могут быть отнесены: повышение количества заходов в закрытый рукав, повышение эмоциональной лабильности, снижение ориентировочной активности, снижение груминга.

С учетом того, что процесс невротизации является длительным, нами был выполнен корреляционный анализ взаимосвязей показателей теста ПКЛ с длительностью невротизирующего воздействия (табл. 3).

Таким образом, совместный анализ данных табл. 2 и 3 показывает, что только показатель количества заходов лабораторных животных в закрытый рукав может отражать процесс невротизации. Динамика показателей ориентировочной активности, эмоциональной лабильности, количества заходов и времени нахождения животных в открытом рукаве установки для тестирования отражают процессы адаптации животных к хроническому тестовому воздействию.

Наблюдение за поведением животных в ходе процесса невротизации позволило выявить некоторые эпизоды «нестандартной» поведенческой активности, которые могут быть отнесены к признакам невротического поведения. Такие признаки представлены в табл. 4.

Указанные признаки невротического поведения животных могут быть оценены в баллах (невротические баллы), учитывающих как выраженность признака, так и частоту его проявления. Возможный вариант такой балльной оценки представлен в табл. 5.

Наличие одиночных признаков (1-3 за период наблюдения) оценивается в номинальном (единичном) значении балла. Если указанные признаки встречаются относительно часто (4-10 за период наблюдения), то они учитываются с весовым коэффициентом 2, при более частой встречаемости (более 10 эпизодов за период наблюдения) – с коэффициентом 3. Сумма баллов, набранных животным за 2-часовой период наблюдения, отражает выраженность сформированного у него невротического состояния.

Таблица 3

Статистически достоверные коэффициенты корреляции параметров теста ПКЛ с продолжительностью хронического стрессового воздействия в процессе невротизации

Показатель теста ПКЛ	Коэффициент линейной корреляции
Количество заходов в закрытый рукав	+0,86
Время нахождения в открытом рукаве	+0,80
Ориентировочная активность	+0,61
Эмоциональная лабильность	-0,61
Количество заходов в открытый рукав	+0,58

Таблица 4

Варианты «нестандартной» поведенческой активности животных, которые могут быть отнесены к внешним признакам неврозоподобного состояния

Условия наблюдения	Элементы нестандартной поведенческой реакции
Во время груминга	- расширение зоны умывания (нос + щеки; + ушки; + живот; + спина); - одновременно с умыванием передними лапами чешется задними лапами (нос, голова, бок); - одновременно с умыванием и почесываниями покусывает кожу лап или кожу вообще
Движения головой	- трясет головой в состоянии покоя; - крутит головой влево-вправо или вверх-вниз; - шевелит усами в состоянии покоя; - жующие движения челюстей в состоянии покоя; - боковые движения челюстей, скрежет зубами в состоянии покоя; - периодическое встряхивание головой
В закрытом рукаве	- активно обнюхивает стенки, углы или пол закрытого рукава; - активно облизывает стенки закрытого рукава; - крутится вокруг своего хвоста; - пятится назад; - сидит в замершей позе
Вне установки ПКЛ (клетка)	- избыточно активно перемещается в клетке; - демонстрирует агрессивное поведение (боксерские стойки); - подтягивается на крышке клетки

Таблица 5

Шкала бальной оценки невротического поведения животных

Баллы	Признаки поведения
1	расширение зоны умывания (нос + щеки); шевелит усами в состоянии покоя; активно обнюхивает стенки, углы или пол закрытого рукава; избыточно активно перемещается в клетке
2	расширение зоны умывания (нос + щеки + ушки); крутит головой влево-вправо или вверх-вниз; жующие движения челюстей в состоянии покоя; активно облизывает стенки закрытого рукава; подтягивается на крышке клетки
3	расширение зоны умывания (нос + щеки + ушки + живот); одновременно с умыванием передними лапами чешется задними лапами (нос, голова, бок); жующие движения челюстей в состоянии покоя; крутится вокруг своего хвоста в закрытом рукаве
4	расширение зоны умывания (нос + щеки; + ушки; + живот + спина); трясет головой в состоянии покоя; боковые движения челюстей в состоянии покоя; пятится назад в закрытом рукаве; демонстрирует агрессивное поведение (боксерские стойки) в клетке
5	одновременно с умыванием и почесываниями покусывает кожу лап или кожу вообще; периодическое встряхивание головой; скрежет зубами в состоянии покоя; сидит в закрытом рукаве в замершей позе

Анализ встречаемости этих признаков по фазам процесса невротизации показывает, что они не встречаются в первой фазе процесса, отдельные признаки с тяжестью в 1-2 балла могут проявляться во второй фазе процесса, более выражено поведенческие признаки невротических состояний у животных проявляются в третьей фазе, особенно на 3-4 неделе формирования невроза.

Так как динамика показателей теста ПКЛ не в полной мере соответствует формированию невротического состояния у лабораторных животных (в основном они характеризуют 1-ю и 2-ю фазы процесса), а оценка поведенческих признаков невроза более характерна для 3-й фазы процесса, то возникает задача разработки интегрального показателя, описывающего выраженность невротических проявлений на всем протяжении моделирования экспери-

ментального невроза. Таким показателем может стать интегральная балльная оценка признаков невротического состояния, суммирующая как результаты теста ПКЛ (переведенные в баллы), так и балльную оценку поведенческих признаков невроза.

Для получения балльной оценки признаков невроза по тесту ПКЛ необходимо текущие его показатели перевести в проценты по отношению к фоновым значениям и полученные результаты соотнести с ключом балльной оценки, представленной в табл. 6.

Суммарный бал, объединяющий балльную оценку теста ПКЛ и поведенческих признаков невроза, мы интерпретировали как показатель выраженности невротического состояния (ВН). Динамика этого показателя в весенне-летней и осенне-зимней сериях исследования представлена на рис. 4.

Таблица 6

**Ключ перевода показателей теста ПКЛ
(% от фоновых значений) в баллы признаков невроза**

Показатель	Выраженность признаков невроза (баллы)				
	1	2	3	4	5
Количество заходов в закрытый рукав	115-130%	131-145%	146-160%	161-200%	более 200%
Эмоциональная лабильность	130-150%	151-170%	171-190%	191-220%	более 220%
Ориентировочная активность	61-80%	51-60%	41-50%	31-40%	менее 30%
Грумминг	61-80%	51-60%	41-50%	31-40%	менее 30%

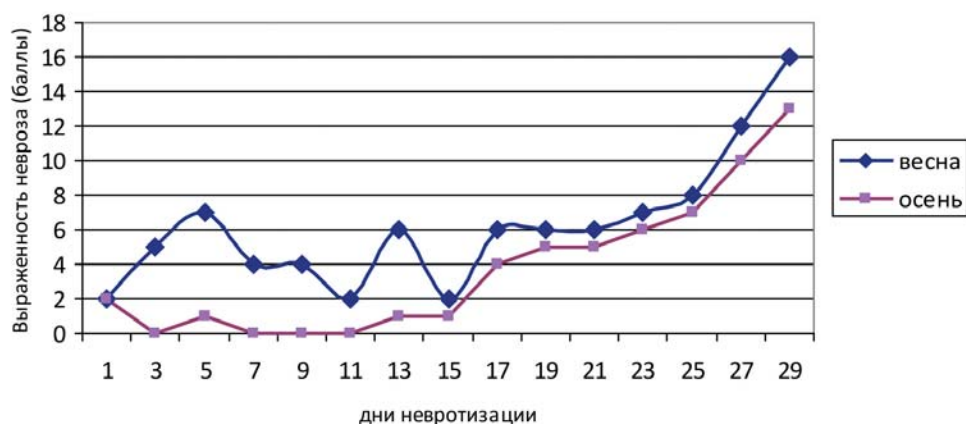


Рис. 4. Динамика показателя выраженности невротического состояния лабораторных животных при весенне-летнем и осенне-зимнем моделировании экспериментального невроза.

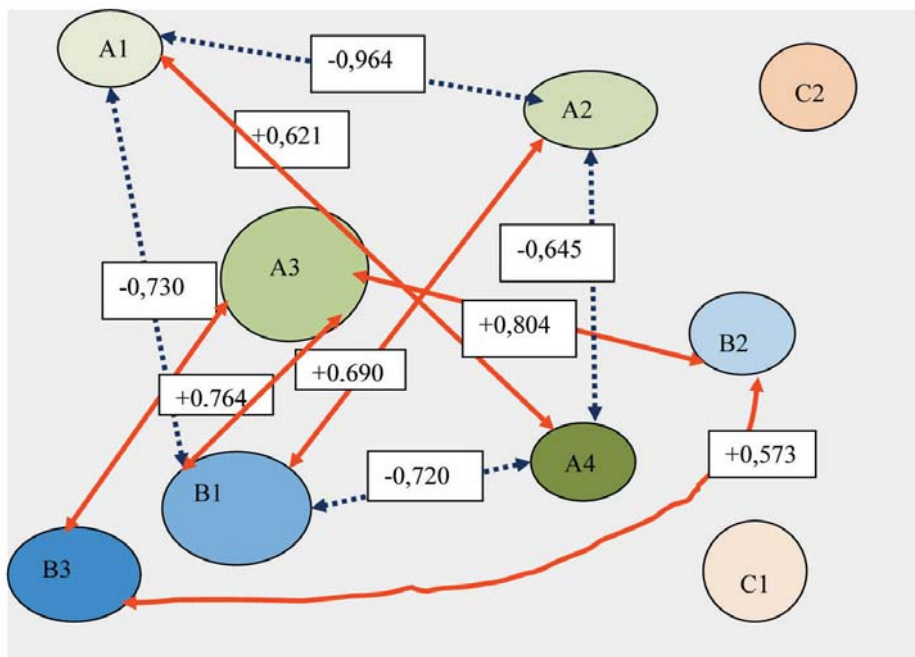
Анализ рис. 4 позволяет сделать вывод, что наиболее типично формирование невроза происходит при его моделировании в весенне-летний период. При этом отчетливо наблюдается стрессовая фаза (первые 3-5 дней), фаза переходных процессов (6-15 день), фаза начальной невротизации (16-25 дни) и фаза сформировавшегося невроза (26-29 дни). При этом границей, отделяющей предшествующие фазы от сформировавшегося невротического состояния, может считаться уровень показателя выраженности невроза (ВН), равный 10 баллам.

При выполнении моделирования невротического состояния у белых крыс в осенне-зимний период выявляются фазные отличия: стрессовая фаза становится слабее и короче (1-2 дня), за ней следует ранее не встречавшаяся фаза латентных изменений (3-12 дни). Фаза переходных процессов становится короче (13-16 день) и протекает при меньшей выраженности невротических признаков. Фазы начальной невротиче-

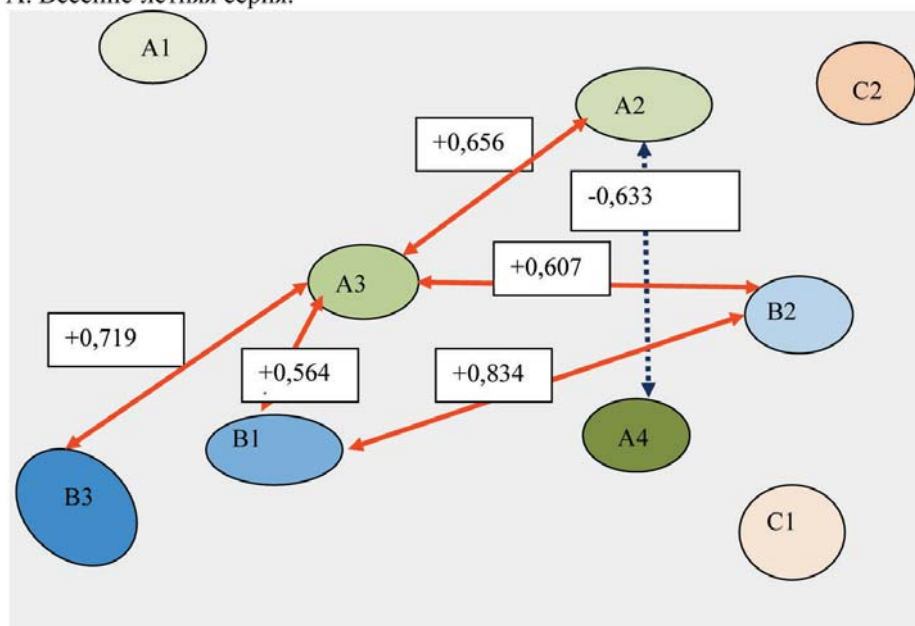
зации и сформировавшегося невроза протекают с близкой к весенней серии динамикой, но несколько менее выраженности признаков невротического состояния.

Такие отличия в картине протекания невротизации могут быть связаны с сезонным изменением функционального состояния нервной системы животных в фоновых условиях в разные сезоны исследования. Действительно, структура корреляционных связей показателей теста ПКЛ друг с другом в фоновом за мере в весенне-летней и осенне-зимней серии исследований существенно отличаются (рис. 5).

Анализ графов корреляционных связей показывает, что вне зависимости от сезона исследования самостоятельное значение в картине поведенческой активности лабораторных животных в тесте ПКЛ играют показатели груминга и эмоциональной лабильности, которые не имеют статистически значимых корреляций с другими показателями теста. В весенне-летний период моделирова-



А. Весенне-летняя серия.



Б. Осенне-зимняя серия.

Рис. 5. Графы корреляционных связей между показателями теста ПКЛ. Обозначения: А1 – время пребывания в закрытом рукаве, А2 – время пребывания в открытом рукаве, А3 – время пребывания на центральной площадке, А4 – латентный период 1 захода в открытый рукав, В1 – количество заходов в открытый рукав, В2 – количество заходов в закрытый рукав, В3 – ориентировочная активность, С1 – груминг, С2 – эмоциональная лабильность.

ния невроза остальные показатели теста ПКЛ образуют единый, тесно взаимодействующий фактор, который мы интерпретировали как фактор спонтанного поведения. При этом показатели времени пребывания животных в закрытом рукаве и латентный период 1 захода в открытый рукав, характеризующие состояние тревожности, образуют отрицательный полюс фактора, а остальные показатели – положительный. При этом 7 входящих в фактор показателей имеют 10 значимых корреляционных связей, и их среднее (по модулю) значение равно 0,73.

В осенне-зимний период происходит частичный распад корреляционных связей фактора спонтанного поведения. Из него вычленяется в самостоятельный, не коррелирующий с другими показателями, «время пребывания в закрытом рукаве». Значимость отрицательного полюса фактора снижается, в нем остается только показатель латентного периода 1 захода в открытый рукав (с умеренной отрицательной корреляционной связью с показателем времени пребывания в открытом рукаве). Из 6-ти оставшихся в факторе спонтанного поведения показателей формируются только 6 корреляционных связей с усредненным значением, равным 0,67.

Для биологических функциональных систем известно, что включение в структуру корреляционных связей между ее элементами новых показателей, повышение плотности и выраженности связей между ними является признаком напряжения функционирования системы. Так, для системы иммунитета это было показано, в частности, в работе [7]. Следовательно, фактор спонтанной поведенческой активности крыс, определяемый по показателям теста ПКЛ в весенне-летней серии исследований, отражает более высокую степень напряжения механизмов регуляции поведения животных. Имен-

но поэтому дополнительное хроническое стрессовое воздействие, связанное с формированием конфликта афферентных возбуждений, более четко формирует картину неврозоподобного состояния у крыс. В осенне-зимний период механизмы регуляции поведения и чувствительности к стрессовым воздействиям у животных функционируют в более автономном, менее напряженном режиме, что закономерно приводит к появлению латентной фазы невроза и меньшей выраженности его проявления при реализации невротической модели.

Выводы

Таким образом, проведенное исследование показало, что экспериментальный невроз у лабораторных животных (белых крыс) может быть получен при хроническом стрессовом воздействии, формирующем конфликт афферентных возбуждений.

Эффективной моделью невротических состояний у животных может считаться модель, в ходе которой на протяжении не менее 4-х недель животные 2 ч в день подвергаются комплексному стрессовому воздействию, сочетающемуся чередующиеся световые, звуковые и электрокожные афферентные раздражения. Формирующееся при этом функциональное состояние животных отражает как стресс-реакцию, так и адаптацию к хроническому стрессовому воздействию.

Обычно применяемый в целях оценки невротического состояния животных тест приподнятого крестообразного лабиринта является недостаточно информативным. Его показатели могут отражать динамику тревожности, эмоциональной лабильности, ориентировочной активности и комфортности у животных в ходе формирования экспериментального невроза. Однако эти показатели могут

быть использованы только для оценки фаз стрессовой активации и переходных процессов экспериментальной невротической модели. Для оценки собственно невротической фазы необходимо дополнительно использовать внешние поведенческие признаки невроза у животных.

Разработанная методика бальной оценки выраженности признаков невротического состояния, учитывающая как бальную оценку показателей теста ПКЛ, так и бальную оценку выраженности поведенческих признаков невроза позволяет количественно оценить невротизацию животных.

Показано, что для формирования экспериментального невроза у крыс более оптимальным является весенне-летний период. В осенне-зимний период у животных возникают отличия в фазности процесса невротизации и его выраженности, что осложняет процесс биомоделирования.

Показанная биомедицинская модель экспериментального невроза (хроническое стрессовое воздействие + система оценки) может быть использована при разработке и в доклинических исследованиях эффективности новых антиневротических средств.

Список литературы

1. Айрапетяни М.Г., Вейн А.М. Неврозы в эксперименте и в клинике. - М.: Наука. 1982. 270 с.
2. Болотова В.Ц., Крауз В.А. Экспериментальное моделирование невроза // Биомедицина. 2014. № 3. С. 148-149.
3. Вальдман А.В., Александровский Ю.А. Психотерапия невротических расстройств (экспериментально-теоретический и клинико-фармакологический анализ). - М.: Медицина. 1987. С. 111-129.
4. Ведяев Ф.П. Модели и механизмы нейрогенного стресса // Журнал высшей нервной деятельности. 1977. Т. 27. № 2. С. 325-327.
5. Ведяев Ф.П., Воробьева Т.М. Модели и механизмы эмоциональных стрессов. - Киев: Здоров'я. 1983. 136 с.
6. Воробьева Т.М., Бевзюк Д.А., Кириллова Н.А. Роль эмоциогенных структур мозга в механизмах формирования фобий и их возможной трансформации в агрессивное поведение у крыс // Психическое здоровье. 2009. № 4(35). С. 46-51.
7. Елисеева М.Ф., Ивко Н.А., Парамонова М.А., Михеев А.А. Состояние лимфоидного звена иммунитета у юных спортсменов, прошедших стимуляцию биологической активности // Детский тренер: журнал в журнале. Физическая культура. 2005. № 6. С. 28-34.
8. Кудрявцева Н.Н., Бондарь Н.П., Августиневич Д.Ф. Влияние повторного опыта агрессии на агрессивную мотивацию и развитие тревожности у самцов мышей // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2003. № 53(3). С. 361-371.
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.

Biological model of experimental neurosis in laboratory animals

V.Ts. Bolotova, V.A. Krauz, E.B. Shustov

The purpose of this study is the statistical analysis of experimental neurosis in laboratory animals. Analyzed the typical model of neurosis, showing their advantages and disadvantages. Dynamics of indicators of the emotional state of animals in the test elevated cross maze at different times of the formation of neurosis-like States was investigated. Quantitative assessment of neurotic animals takes into account both the ball an assessment of the performance of the test elevated cross maze and the severity of behavioral symptoms of neurosis. Developed a method of assessing the expression of the characteristics of the experimental neurosis in laboratory animals. It is established that for the formation of experimental neurosis in rats the best is spring and summer. Biomedical model of experimental neurosis can be used for preclinical studies investigating the effectiveness of new antiasthenic drugs.

Key words: neurosis, biological modeling, laboratory animals.

Влияние стволовых клеток на репродуктивную функцию речных раков

Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹, О.И. Степанова¹,
Н.В. Петрова¹

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

² – ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства (ФГБУН ВНИИР)

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

Научный интерес в плане обнаружения эволюционных закономерностей, а также практический интерес в области медицины представляет изучение влияния ксенотрансплантации стволовых клеток на репродуктивную функцию реципиентов. В качестве альтернативных биомоделей для эксперимента были выбраны беспозвоночные гидробионты – речные раки, так как они являются пойкилотермными организмами с внешним оплодотворением, у них легче проследить процесс оплодотворения и развития зародышей и по этическим соображениям. Половозрелым речным ракам вводились стволовые клетки костного мозга мышей-доноров в дозе 8-10 млн. Обнаружено, что введение стволовых клеток речным ракам инициирует у них активацию репродуктивной функции, а именно: спаривание, выход икры у самок и её оплодотворение.

Ключевые слова: речные раки *Pontastacus leptodactylus*, стволовые клетки, репродуктивная активность.

Введение

В настоящее время новое направление по применению стволовых клеток находит широкое применение в медицинской практике. Известно, что стволовые клетки обладают мощным регенеративным действием, направленным на восстановление паренхиматозных органов [4-6; 9].

В эволюционном аспекте значительный интерес представляет изучение влияния трансплантации стволовых клеток на воспроизводство многоклеточных организмов, особенно находящихся на относительно низких ступенях систематической классификации.

Данных по влиянию стволовых клеток на репродуктивную активность крайне мало. Известно, что первичные

половые клетки появляются вдали от будущей гонады, затем мигрируют в ее соматическую часть и становятся зрелыми половыми клетками [8, 11].

Предполагается эволюционное родство тотипотентных стволовых клеток и клеток половой линии и эволюционный консерватизм их структурной и функциональной организации, общие для представителей различных таксонов многоклеточных животных: кишечнополостные, губки, медузы, турбеллярии, корнеголовые ракообразные и млекопитающие [1, 2, 7, 10, 12].

Целью настоящих исследований было изучение влияния трансплантации клеток костного мозга (ККМ) на репродуктивную активность беспозвоночных гидробионтов.

Материалы и методы

Объектами исследований мы выбрали длиннопалых речных раков (*Pontastacus leptodactylus*) в качестве альтернативных биомоделей.

В эксперименте было сформировано 2 группы: интактный контроль и опытная группа. В каждую группу было отобрано по 12 особей обоего пола.

Ракам опытной группы в вентральный синус были введены стволовые клетки, однократно в дозе 8-10 млн ККМ.

Экспериментальные объекты содержались в аквариальных условиях с искусственной аэрацией и водоочисткой. Время опыта составляло 30 дней.

Стволовые клетки готовились следующим образом. У мышей-доноров проводили забор клеток костного мозга (содержащих ген зеленого белка (GFP)) под эфирным наркозом. Стерильно отсекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с суставами и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали вместе с лизирующим раствором (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM $KHCO_3$; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:4 в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре 22°C. Затем надосадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую от эритроцитов и полученную смесь клеток ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25мМ NEPES, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали во

флаконах при +37°C в CO_2 -инкубаторе, атмосфере с 5% CO_2 и 95% влажности в течение 3-х суток [3].

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

Результаты и их обсуждение

Через две недели после введения стволовых клеток у самок опытной группы (3 особи) произошло выметывание, оплодотворение и прикрепление икры. На их вентральной стороне между головогрудью и абдоменом хорошо заметны приклеившиеся сперматофоры самца (рис.).

Оплодотворения самок в контрольной группе на всем протяжении эксперимента не отмечено.



Рис. 1. Самки речного рака *Pontastacus leptodactylus* с икрой.



Рис. 2. Отбор проб икры для анализа.

Были отобраны образцы икры для анализов (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют об инициации половой активности.

С помощью проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выяснено, что в икру эти клетки не попадают: ген зеленого белка в ней не обнаружен.

Заключение

Таким образом, впервые получены данные о влиянии клеток костного мозга на репродуктивные функции гидробионтов. Введение стволовых клеток стимулирует выход и оплодотворение икры у половозрелых особей речных раков.

Список литературы

1. *Исаева В.В., Шукалюк А.И., Ахмадиева А.В.* Стволовые клетки беспозвоночных животных с репродуктивной стратегией, включающей бесполое размножение // Биология моря. 2007. Т. 33. № 1. С. 3-1.
2. *Исаева В.В., Шукалюк А.И., Кизилова Е.А.* Выявление стволовых клеток в колониальной интерне корнеголовых ракообразных *Peltogasterella gracilis* и *Sacculina polygenea* на паразитической стадии жизненного цикла // Цитология. 2003. Т. 45. № 8. С. 758-763.
3. *Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов*

Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревакин А.О., Деньгина С.Е. Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // Биомедицина. 2011. № 2. С. 30-34.

4. *Маслюков А.К., Сугачевская Е.В.* Стволовые клетки и их применение в практической медицине // www.transplantology.com. 2004.
5. *Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревакин А.О., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В.* Гидробионты – альтернативные биомодели // Биомедицина. 2014. № 3. 102 с.
6. *Ревакин А.О., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В., Касинская Н.В.* Приживаемость клеток костного мозга у рыб и речных раков // Биомедицина. 2013. № 3. С. 63-66.
7. *Akhmadieva A.V., Shulalyuk A.I., Isaeva V.V.* Interstitial cells in reproductive strategy of colonial hydroid *Obelia longissima* // Amer. Soc. Cell Biol. 45th Annu. Meet. (San Francisco, December, 2005): Molecular Biology of the Cell. 2005. Vol. 16. No. 11 (suppl.). 752 p.
8. *Kunwar P.S., Lehmann R.* Developmental biology: germ-cell at-traction // Nature. 2003. Vol. 421. P. 226-227.
9. *Michalopoulos G.K.* Liver regeneration after partial hepatectomy critical analysis of mechanistic dilemmas // The American Journal of Pathology. 2010. Vol. 176. № 1. P. 2-13.
10. *Rybakov A.V., Shukalyuk A.I.* Thylacoplethus isaevae sp. n., a new species of colonial rhizocephalans (Crustacea: Rhizocephala: Thompsoniidae) parasitic on a northwest Pacific hermit crab *Pagurus trigonocheirus* (Stimpson) // J. Mar. Biol. Assoc. UK. 2004. Vol. 84. P. 1009-1017.
11. *Saffman E.E., Lasko F.* Germline development in vertebrates and invertebrates // Cell Mol. Life Sci. 1999. Vol. 55. P. 1141-1163.
12. *Shukalyuk A.I., Isaeva V.V., Golovnina K.A., et al.* Vasa-related genes and their expression in stem cells of colonial *Polyascus polygenea* (Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala) // Abstracts. Int. Soc. Stem Cell Res. 3rd Annu. Meet. (San Francisco, June 2005). 2005. P. 215.

Influence of stem cells on reproductive function of crawfishes

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova,
N.V. Petrova

Scientific interest in respect of detection of evolutionary regularities, and also practical interest in the field of medicine represents studying of influence of a xenotransplantation of stem cells on reproductive function of recipients. As alternative biomodels for experiment invertebrate hydrobionts – crawfishes as they are poikilothermic organisms with external fertilization were chosen, at them it is easier to track process of fertilization and development of germs and in ethical reasons. To sexual maturity crawfishes stem cells of marrow of donor mice in a dose of 8-10 million KKM were entered. It is revealed that introduction of stem cells to crawfishes initiates at them activation of reproductive function. Namely pairing, a caviar exit at females and its fertilization.

Key words: crawfishes *Pontastacus leptodactylus*, stem cells, reproductive activity.

Регенерация патологически измененной печени карпа после межвидовой трансплантации стволовых клеток

Г.И. Пронина¹, А.О. Ревякин¹, Н.Ю. Корягина², Г.Д. Капанадзе¹,
О.И. Степанова¹, Н. В. Петрова¹, Ж.О. Курищенко¹

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

² – ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства (ФГБУН ВНИИР), Москва

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

Одним из путей восстановления паренхиматозных органов при нарушениях различного генеза является трансплантация стволовых клеток. Целью настоящих исследований явилось изучение регенерации печени молоди карпа с искусственно вызванной патологией под влиянием стволовых клеток мышей-доноров. Жировая дистрофия печени карпа вызывалась 7-кратным оральным введением Парацетамола в дозе 15 г/кг. Эксперимент показал приживаемость стволовых клеток мышей-доноров в печени молоди карпа и успешную регенерацию органа. Это было подтверждено обнаружением гена зеленого белка и проведением полимеразной цепной реакции, а также обнаружением донорских флуоресцирующих клеток в криосрезах печени молоди карпа и гепатопанкреаса речных раков. При этом у гидробионтов происходит интенсивная регенерация тканей и полное восстановление пораженных органов. Результаты исследований позволяют расширить возможности трансплантации стволовых клеток в разработке медико-биологических исследований моделей *in vivo* в области клеточных технологий.

Ключевые слова: стволовые клетки, рыбы, печень, регенерация.

Введение

Регенеративная терапия (восстановление поврежденных органов и тканей) посредством клеточной терапии – один из трендов современной медицинской науки и практики. Тканевой гомеостаз включает поддержание оптимального клеточного состава путем скоординированных во времени процессов гибели части клеток и замещения их новыми. После открытия стволовых клеток (СК) общепринятой стала иерархическая модель регенерации органов и тканей – как для поддержания гомеостаза, так и при восстановлении после повре-

ждений – согласно которой все новые клетки образуются из резидентных или циркулирующих СК через стадию прогениторных, активно размножающихся клеток. Вместе с тем, анализ регенерации печени показывает, что это не всегда так. Восстановление печени может идти за счет СК, но чаще происходит за счет дифференцированных клеток после их дедифференцировки. В последнем случае реализуется стохастическая модель регенерации, при которой образование новых клеток происходит не из специальных, а из любых клеток ткани.

До недавнего времени общепринятым было мнение, что регенерация печеночной паренхимы происходит за счет дифференцированных клеток – в основном, гепатоцитов, при некотором участии других клеточных типов, таких как клетки Купфера, эндотелий и эпителий желчных протоков. Было, в частности, показано, что в норме и в процессе регенерации после повреждения имеет место как размножение клеток, так и их гипертрофия. Некоторые гепатоциты увеличиваются в размерах и в них происходит эндоредупликация геномной ДНК, но без митоза. Выявлено, что при некоторых видах повреждения в регенерации печени участвуют не только дифференцированные клетки, но и резидентные и циркулирующие СК. Механизм восстановления печеночной паренхимы зависит от обстоятельств: норма, частичная гепатэктомия, отравление химическими агентами и т.п. Существенно различаются пути восстановления за счет собственных ресурсов и за счет трансплантированных клеток. Печень способна к выраженной регенерации в ответ на утрату гепатоцитов, имеющую любую природу. Даже если удалено 2/3 печени, масса органа восстанавливается в течение нескольких недель. Регенеративный ответ вполне предсказуем, его можно воспроизвести в эксперименте. У подопытных животных первоначальный ответ, продолжающийся 24 ч, проявляется в гипертрофии гепатоцитов. Затем следует диффузная гиперплазия этих клеток, начинающаяся в перипортальных зонах и достигающая пика примерно через 30 ч. Пролиферативный ответ убывает, когда восстанавливается исходная масса печени. После удаления 15% ткани печени

пролиферируют лишь перипортальные гепатоциты. Вслед за гепатоцитами в митоз вступают и другие эффекторные клетки печени, которые таким образом участвуют в восстановлении массы органа. Имеются доказательства того, что во взрослом организме в печени и в поджелудочной железе присутствуют клетки-предшественники паренхиматозных клеток обоих органов, так называемые печеночно-панкреатические СК [2, 6].

Ранее нами было показано (на крысах, мини-свиньях) моделирование гепатита и коррекция его СК [4]. Исходя из полученных данных, мы решили использовать пойкилотермные организмы, находящиеся на более низкой ступени эволюции – как по этическим соображениям, так и для изучения возможности экстраполяции результатов, полученных на этих альтернативных биомоделях на высших позвоночных.

Целью настоящей работы являлось изучение регенерации печени рыб после введения стволовых клеток мышей-доноров.

Материалы и методы

Объектами эксперимента являлись сеголетки карпа (*Cyprinus carpio L.*) чешуйчатой и зеркальной групп. Патология печени рыб была смоделирована Парацетамолом. Препарат вводился *per os* в дозе 15 г/кг с 1 мл дистиллированной воды 7-кратно в течение 14 дней. В качестве контроля были взяты рыбы, которым препарат не вводился.

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (время гибели животных – 30-40 мин). Исследовали жизнеспособность

клеток гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга (ККМ) по окраске трипановым синим.

Забор ККМ проводили у мышей-доноров (содержащих ген зеленого белка (GFP)) под эфирным наркозом. Стерильно иссекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с суставами и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали вместе с лизирующим раствором (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:4 в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре 22°C. Затем надсадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую от эритроцитов и полученную смесь клеток ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25мМ NEPER, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO_2 -инкубаторе, атмосфере с 5% CO_2 и 95% влажности в течение 3-х суток [1].

Через 3 суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой округлых неприкрепившихся гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся к пластику распластаных фибробластоподобных клеток – мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК КМ). Полученная

смешанная культура из гемопоэтических и стромальных ККМ от мышей-доноров была готова для трансплантации (рис. 1).

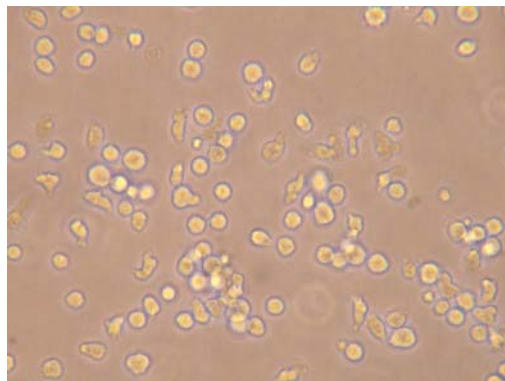


Рис. 1. Культура клеток на третьи сутки культивирования.

Культура ККМ вводилась рыбам внутривенно в хвостовую вену. Доза введения составила 8-10 млн культивированных ККМ.

Гибели рыб на всем протяжении эксперимента не отмечалось. Вскрытие опытных объектов производилось на 7, 14 и 21 день после введения ККМ.

Внутренние органы фиксировались в 10% растворе формалина. Затем, после обезвоживания и заливки в парафин, готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином. Гистологические исследования проводились с помощью цифровой микроскопии.

Результаты и их обсуждение

Под действием Парацетамола в печени рыб отмечены дистрофические изменения гепатоцитов – сочетание белковой и жировой дистрофии. Количество ядер гепатоцитов существенно меньше по сравнению с нормой.

Эксперимент показал успешную трансплантацию стволовых клеток мышей рыбам. Отмечалось зеленое свечение ККМ с геном GFP при микроскопии печени. Эти результаты подтверждены проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР): в опытных образцах был идентифицирован ген GFP.

Через 2 недели после введения стволовых клеток происходит снижение количества патологически измененных гепатоцитов, местами просматривается их регенерация, незначительные или умеренно выраженные воспалительные изменения в строме органа (рис. 2, 3).

Заключение

Таким образом, показано, что клетки костного мозга мышей успешно приживаются в организме рыб. Патологически измененная печень рыб после моделирования патологии Парацетамолом успешно регенерирует через 2-3 недели после введения стволовых клеток, что подтверждается гистологическими исследованиями.

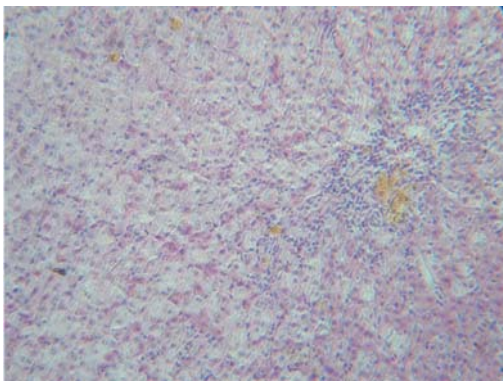


Рис. 2. Регенерация патологически измененной печени карпа. Инфильтрация портального тракта и незначительная инфильтрация клетками белой крови паренхимы. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. x200.

Список литературы

1. *Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Денъгина С.Е.* Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // Биомедицина. 2011. № 2. С. 30-34.
2. *Маслюков А.К., Сугачевская Е.В.* Стволовые клетки и их применение в практической медицине // www.transplantology.com. 2004.
3. *Ревякин А.О., Казакова Л.Х., Капанадзе Г.Д.* Мини-свинья как биомодель токсического гепатита // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2011. № 5.
4. *Ревякин А.О. Капанадзе Г.Д., Казакова Л.Х., Степанова О.И., Касинская Н.В., Кольшиев И.Ю.* Моделирование стойкого токсического гепатита на мини-свиньях светлогорской популяции // Биомедицина. 2012. № 4. С. 92-95.
5. *Ярыгин К.Н.* Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации // Патологическая физиология и экспериментальная терапия: кварталный научно-теоретический журнал / Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. - М.: Медицина. 2008. № 1. С. 2-8.
6. *Michalopoulos G.K.* Liver regeneration after partial hepatectomy. critical analysis of mechanistic dilemmas // The American Journal of Pathology. 2010. Vol. 176. № 1. P. 2-13.

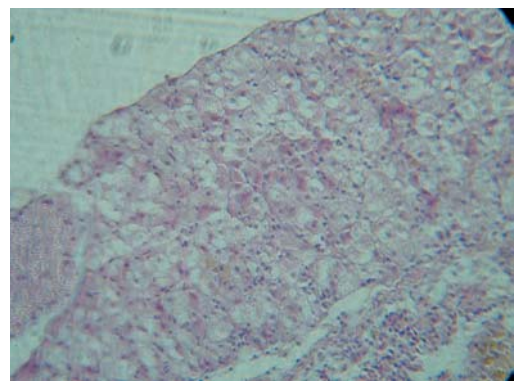


Рис. 3. Регенерация гепатоцитов после введения стволовых клеток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. x400.

Regeneration of pathologically changed liver of the carp after interspecific transplantation of stem cells

G.I. Pronina, A.O. Revyakin, N.Yu. Koryagina, G.D. Kapanadze,
O.I. Stepanova, N. V. Petrova, Zh.O. Kurischenko

One of ways of restoration of parenchymatous bodies at violations of various genesis is transplantation stem cells. The purpose of the real researches was studying of regeneration of a liver thresh a carp with artificially caused pathology under the influence of stem cells of donor mice. Fatty dystrophy of a liver of a carp was caused by 7-fold introduction of per os paracetamol in a dose of 15 g/kg. Experiment showed survival of stem cells of mice of donors in a liver threshes a carp and successful regeneration of body. It was confirmed with detection of a gene of green protein and the polymerase chain reaction (PCR), and also detection of the donor fluorescing cages in cryocuts of a liver thresh a carp and a hepatopancreas of crawfishes. Thus hydrobionts have an intensive regeneration of fabrics and a complete recovery of the struck bodies. Results of researches will allow expanding possibilities of transplantation of stem cells in development of medicobiological researches of in the vivo models in the field of cellular technologies.

Key words: stem cells, fishes, liver, regeneration.

Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», которая будет проводиться 20-21 мая 2015 г. в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:

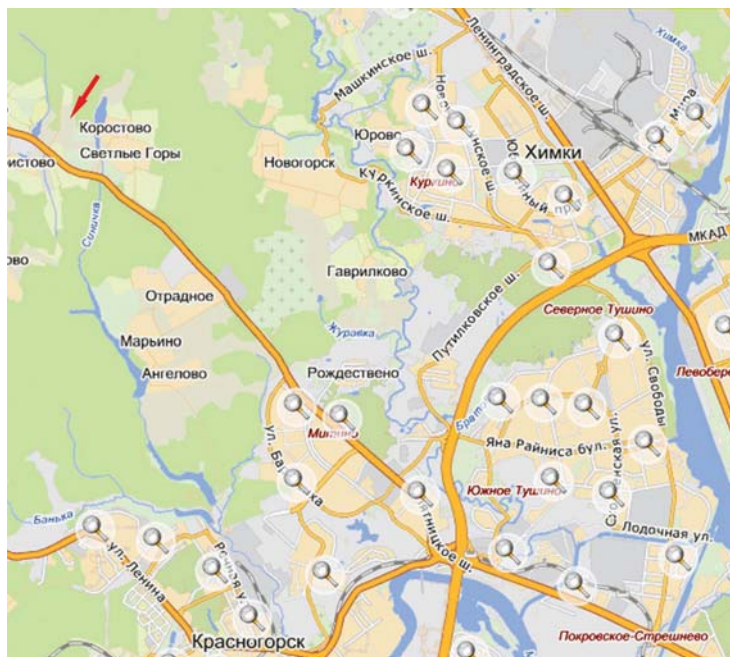
143442, Московская обл., Красногорский р-н,
пос. Светлые горы, владение 1,
тел. (495) 561-52-64, факс (495) 561-52-73
e-mail: scbmt@yandex.ru

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 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, 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.*

Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин, на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов. Просьба к участникам выслать материалы докладов с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения, названия доклада, а также информации о необходимости бронирования места в гостинице до 1 мая 2015 года.

СХЕМА ПРОЕЗДА:



Адрес: 143442, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые горы, владение 1.

Проезд по Пятницкому шоссе от станции метро «Тушинская» на автобусе 575 или маршрутном такси 460 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

От станции метро Митино или Пятницкое шоссе на автобусе 575, маршрутном такси 575, 460, 707 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

На автомобиле: по Пятницкому шоссе (6 км от Кольцевой автодороги) до поворота на Светлые горы, мимо пруда, до магазина, после него поворот по указателю налево между двух прудов, по дамбе прямо до Центра.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного и экспериментального характера, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвящённые биологическому, математическому и комплексному моделированию, новым медицинским технологиям. Особое внимание уделяется вопросам генетической, микробиологической, экологической стандартизации лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых видов биологических моделей, представляющих собой специализированные линии лабораторных животных и альтернативных биологических объектов, имеющих ценность для биомедицинских исследований, моделирующих патологические состояния человека, клеточных культур, органов и тканей. Рассматриваются материалы, посвященные вопросам экстремальных воздействий на организм, включая неблагоприятные факторы спорта высших достижений. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных.

РУБРИКАЦИЯ ЖУРНАЛА

1. Новые биомедицинские технологии.
2. Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.
3. Новые регуляторные пептиды.
4. Спортивное питание.
5. Релевантное и альтернативное биомоделирование.
6. Лабораторные животные.
7. Методы биомедицинских исследований.
8. Генетика лабораторных животных.
9. Доклинические исследования новых медицинских технологий.
10. Клинические исследования новых медицинских технологий.
11. Информационные материалы и нормативные документы.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ

Статью следует представлять в двух экземплярах с электронной версией текста, набранного в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12 на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Латинские названия видов должны быть выделены *курсивом*.

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, контактную информацию, 4) учреждения, в которых была проведена работа, почтовый адрес с индексом. На той же странице печатается реферат (объем 100-250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов).

Объем представляемой статьи не должен превышать 16 машинописных страниц, включая таб-

лицы и рисунки. Таблицы и рисунки расставляются авторами по тексту. Рисунки в электронной форме прилагаются отдельными файлами.

Результаты исследований должны быть статистически обработаны. Достоверность полученных результатов должна быть оценена с применением корректных статистических критериев.

В конце статьи приводится список цитированной литературы (не более 30 источников) и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи.

В конце статьи приводятся наименование статьи, фамилии авторов, место работы, контактная информация, реферат и ключевые слова на английском языке. Реферат должен быть информативен (не содержать общих слов), английский вариант не должен быть калькой русскоязычной версии (написан качественным английским языком с использованием терминологии исследования), содержательным, компактным, но не коротким (объемом 100-250 слов). Реферат должен представлять собой структурированную аннотацию и содержать цель исследования, методологию (материалы и методы), обсуждение результатов, выводы, возможность последующего использования работы (следующие шаги исследования), практическое применение, социальные последствия (влияние на общество, политику), оригинальность (ценность).

К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу, и на отдельном листе – фамилию, имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другую рубрику или номер журнала.

Все рукописи направляются на внешнее рецензирование.

За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается. После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

РУКОПИСИ НАПРАВЛЯТЬ ПО АДРЕСУ:

143332 Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые горы, ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, редакция журнала «Биомедицина».

Электронный адрес для переписки с редакцией: sinayva@yandex.ru или scbmt@yandex.ru

Телефон редакции: 8(495)561-52-64.

Подробные требования к оформлению статей и электронную версию журнала можно посмотреть на сайте www.scbmt.ru.

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

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 клинко-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 органотропных пептидных нуклеопротеидных комплексов, при предельных физических нагрузках, утомлении, астенизации, хронических заболеваниях 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.

В четвертом томе сформулирована концепция применения фармнутриентов как лекарственных компонентов спортивного питания, основанная на идеологии «метаболического конструктора» персонализированной нутритивной 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.



Заявки на книги принимаются по адресу:
scbmt@yandex.ru.