

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

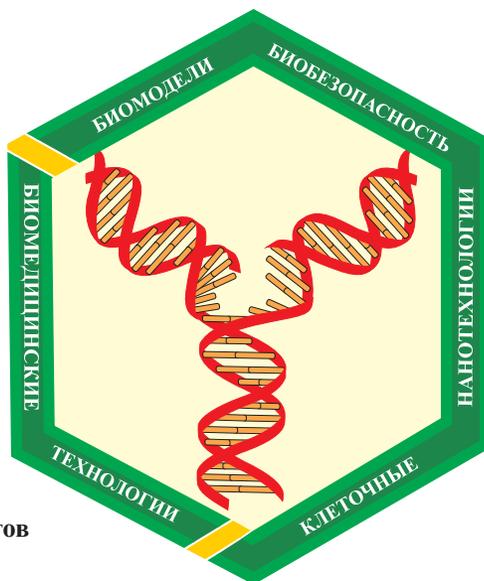
Научный журнал.

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. Капанадзе, Светлые горы МО, С.Л. Люблинский, Обнинск Калужская область,
Е.Л. Матвеевко, Светлые горы МО, А.Н. Мурашѳв, 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. Зефиоров, 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 27.06.2015
Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, Д.Б. Чайванов**
Релаксационная транскраниальная стимуляция головного мозга спортсменов: роль серотониновых механизмов4
- Е.Б. Шустов, С.В. Оковитый**
Экс-орфанные рецепторы как мишени для потенциальных лекарственных средств.....15

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

- Г.П. Копыльчук, О.Н. Волощук**
Моделирование ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени в условиях алиментарной депривации протеина.....30

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- А.Ю. Баранов, Т.А. Малышева**
О выборе методики исследования эффектов общего криотерапевтического воздействия37
- М.С. Дуля, Е.Д. Шевченко, Н.В. Петрова**
Разработка методологии получения растворимой формы рекомбинантной N-ацетилтрансферазы-2 человека47
- Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, О.И. Степанова, Ж.О. Курищенко, Н.В. Петрова**
Регенерация гепатопанкреаса речных раков после трансплантации клеток костного мозга мышей-доноров53

ГЕНЕТИКА

- Л.И. Николаева, Е.А. Лейбман, А.Е. Гришечкин, Г.В. Сапронов, В.А. Кичатова, Т.В. Кожанова, К.К. Кюреган, М.И. Михайлов, А.А. Сарыглар**
Сравнительный анализ однонуклеотидного полиморфизма гена *IL28B* у больных гепатитом С русских и тувинцев58

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- И.Е. Макаренко, О.И. Авдеева, Г.В. Ванатиев, Н.М. Фаустова, И.Н. Уракова, О.Н. Пожарицкая, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, А.Н. Шиков**
Оценка безопасности длительного применения препарата КЛС-073 в качестве инкретиномиметика65
- А.Е. Хомутов, К.А. Пурсанов, О.В. Лушников, З.В. Перепелюк**
Потенцирование гепарином антиноцицептивного действия нейропептида FMRFa на супраспинальном уровне73

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

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

Relaxation transcranial brain stimulation of athletes: the role of serotonergic mechanisms.....4

E.B. Shustov, S.V. Okovitiy

Ex-orphan receptors as targets for potential medicines.....15

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

G.P. Kopylchuk, O.N. Voloshchuk

Modeling of the acetaminophen-induced disturbances of the bile producing liver function under the conditions of alimentary deprivation of protein30

BIOMEDICAL METHODS

A.Yu. Baranov, T.A. Malysheva

Methods of whole body cryotherapy effects research.....37

M.S. Dulya, E.D. Shevchenko, N.V. Petrova

Development of methodology for production of a soluble form of recombinant human N-acetyltransferase-247

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

Regeneration hepatopancreas of crayfish after transplantation of stem cells from mice-donors.....53

GENETIC

L.I. Nikolaeva, E.A. Leybman, A.E. Grischechkin, G.V. Sapronov, V.A. Kichatova, T.V. Kozhanova, K.K. Kyuregyan, M.I. Mikhaylov, A.A. Saryglar

Comparative analysis of single nucleotide polymorphisms of gene *IL28B* in Russian and Tyvinian patients with hepatitis C58

NON-CLINICAL RESEARCHES

I.E. Makarenko, O.I. Avdeyeva, G.V. Vanatiev, N.M. Faustova, I.N. Urakova, O.N. Pozharitskaya, M.N. Makarova, V.G. Makarov, A.N. Shikov

Evaluation of the safety of long-term use of the drug KLS-073 as incretinomimetics65

A.E. Khomutov, K.A. Pursanov, O.V. Lushnikova, Z.V. Perepelyuk

Potentiation of antinociceptive effect of neuropeptide FMRFa by heparin on supraspinal level.....73



Релаксационная транскраниальная стимуляция головного мозга спортсменов: роль серотониновых механизмов

Н.Н. Каркищенко¹, В.Н. Каркищенко¹, Е.Б. Шустов¹, Д.Б. Чайванов²

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

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

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

Настоящее сообщение посвящено поиску физиологических маркеров состояния электросна. Подтверждено, что транскраниальный электросон является искусственно создаваемым с помощью электрического тока аналогом сна естественного. На здоровых волонтерах-спортсменах показано, что состояние электросна сопровождается увеличением значений показателей дыхательной и сердечной деятельности, более характерной для состояния релаксации, чем для состояния естественного сна. Наряду с этим, введение препарата Пароксетин (селективного ингибитора обратного захвата серотонина (СИОЗС)) до тренировки и процедуры электросна способствует изменению динамики и улучшению показателей протекания физиологических процессов. Применение Пароксетина в контролируемом исследовании улучшает сон, способствует включению релаксационных механизмов электросна. Обсуждается роль мелатонина как возможного посредника в процессах релаксации.

Ключевые слова: транскраниальный электросон, серотониновые механизмы, СИОЗС, Пароксетин, дыхательная деятельность, частота, амплитуда и минутный объем дыхания, частота сердечных сокращений, насыщение крови кислородом.

Введение

Состояние электросна считается схожим с состоянием естественного сна [3, 5-9] и рассматривается как появление разлитого торможения, возникающего вследствие действия электрического тока на структуры мозга. Экспериментально было показано сходство внешних проявлений физиологических процессов этих состояний [6]. Естественный сон характеризуется постоянным подъе-

мом плетизмограммы, увеличением амплитуды пульсовых колебаний и улучшением рисунка дыхательных волн, которые становятся более регулярными и равными по амплитуде. При электросне наблюдается некоторое урежение и углубление дыхания, пульс замедляется на 3-5 уд/мин, наполнение пульса улучшается. Электрокардиограмма не изменяется, плетизмограмма указывает на медленное и постепенное расширение

периферических сосудов. На начальных стадиях электросна на электроэнцефалограмме наблюдается угнетение колебаний альфа-ритма, вслед за которым появляются медленные дельта-волны [1, 6, 7]. Дальнейшее действие электрического тока приводит к усилению высокочастотных бета- и гамма-волн в передних отделах коры головного мозга. Авторы отмечают, что результаты этих исследований показывают, во-первых, отсутствие патологических явлений во время электросна, во-вторых, сходство электросна с физиологическим сном.

Ранее нами было показано, что когда селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) связываются с сайтом обратного захвата серотонина, происходит пролонгация действия активного серотонина. При этом происходит прямое ингибирование клеточных тел, в которых осуществляется синтез нейромедиатора серотонина. После селективного ингибирования участков серотонинергической системы происходит компенсаторный отклик, который, в свою очередь, вызывает высвобождение дополнительной порции серотонина в таких структурах головного мозга, как гипоталамус, гиппокамп и кора. Увеличение уровня серотонина приводит к повышению контроля таких поведенческих форм, как агрессия, тревожное возбуждение, тревога, генерализованный аффект, настроение и сон [2]. Показана роль серотонина в регуляции парадоксальных успокаивающих эффектов психостимуляторов при моделировании гиперактивности на животных. Острое введение Флуоксетина (СИОЗС) подавляет проявления гиперактивности, вызванной введением амфетамина или кокаи-

на у мышей-мутантов, используемых в качестве модельных животных [2].

В опытах, проведенных в НЦБМТ ФМБА России на трехмесячных самцах крыс линии WAG/GY, было установлено, что накопление серотонина выразилось в преобладании низких частот в ультразвуковой вокализации (УЗВ) подопытных животных в первые 2 ч после введения, снижении спектральной плотности мощности ультразвука в «диапазоне покоя», повышении высокочастотных УЗВ-колебаний через 4 ч и возвращении вокализации к исходным показателям через 6 ч. Проведенные опыты позволяют считать, что именно серотонину принадлежит решающая роль в формировании характерных УЗВ-откликов, отображающих непосредственную взаимосвязь с поведением животных [4].

Цель исследования. Авторы поставили перед собой задачу, состоящую в определении роли серотониновых рецепторов и метаболизма серотонина в процессе восстановления спортсменов после тренировочного и предсоревновательного процессов, а также их участия в гипногенном действии. Известно, что серотонин регулирует дельта-сон, инициирует фазу быстрого сна. В процессе метаболизма с участием N-ацетилтрансферазы (*NAT3*) серотонин преобразуется в эпифизе в мелатонин, который, в свою очередь, обеспечивает засыпание и регулирует процесс сна [12]. Дефицит серотонина ухудшает процессы восстановления после больших физических и психоэмоциональных нагрузок. Для выяснения этих механизмов в процессе восстановления спортсменов был использован Пароксетин (СИОЗС). Сделана попытка изучения и оценки участия

серотониновых механизмов в процессах инструментального сна и восстановления спортсменов после большой физической нагрузки.

Материалы и методы

Настоящее исследование направлено на сравнение динамики показателей физиологических процессов в спокойном бодрствовании и во время электросна у человека. Исследование проводили в двух группах спортсменов-легкоатлетов в возрасте $22,5 \pm 2,5$ лет, по 8 человек в каждой. Процедуру эксперимента проводили с каждым испытуемым отдельно. Проведению эксперимента предшествовала тренировка (бег на длинную дистанцию – 10 км). Испытуемые принимали Пароксетин (Паксил, производства «Эс.Си.Еврофарм Эс.А») по 20 мг в виде таблеток однократно за 1 ч до исследования. Пароксетин относится к группе СИОЗС – 5НТ. После его приема регистрируются активирующие компоненты психотропного действия, выявляемые при психофизиологическом и инструментальном исследовании пациентов. У здоровых добровольцев он вызывает умеренное изменение артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Применение его в клинических условиях сопровождается психоактивизирующим (стимулирующим), антидепрессивным и протовотревожным действием. Обладает низким аффинитетом к М-холинорецепторам, α - и β -адренорецепторам, 5НТ1- и 5НТ2-подобным дофаминовым и гистаминовым Н1-рецепторам. По данным клинических наблюдений, Пароксетин нарушает процессы засыпания, если принимается во второй половине дня.

В качестве плацебо использовали подобные по внешнему виду таблетки, не содержащие каких бы то ни было фармакологически активных компонентов.

После тренировки все испытуемые подвергались процедуре электросна, продолжительность которого составляла 25 мин и включала 3 серии, во время которых менялись условия воздействия. Во время первой серии, обозначенной как «покой» и длящейся 5 мин, испытуемых просили расслабиться и сидеть с закрытыми глазами. Вторая серия, обозначенная как «электросон (ЭС)», включала воздействие электрическим током в течение 15 мин. В процессе анализа данных вторая серия была подразделена на 3 этапа по 5 мин, каждый из которых был обозначен соответственно ЭС (1 этап), ЭС (2 этап) и ЭС (3 этап). Во время этой серии электрическое воздействие осуществлялось с помощью прибора «Электросон – ЭГСАФ-01», глазнично-затылочным способом, импульсами прямоугольной формы с частотой 6 Гц. Третья серия эксперимента продолжительностью 5 мин была нами обозначена как «пробуждение», т.к. состояла в прекращении воздействия электрического тока на испытуемого.

Изменение физиологических показателей у испытуемых во время всех трех серий эксперимента фиксировали с помощью дыхательных датчиков, электродов сердечной деятельности и датчика для пульсоксиметрии в составе полиграфического блока (ПОЛИ-4) аппаратно-программного комплекса «РЕАКОР» (производства «Медиком МТД»). В результате обработки записанных данных были получены следующие показатели: частота дыхания (ЧД), условный минутный объем дыхания (УМОД), условная

амплитуда дыхания (УАД) дыхания, ЧСС и уровень насыщения крови кислородом (SpO_2).

В ходе обработки полученных данных результаты испытуемых усреднили по группам в зависимости от принятого препарата (группы Пароксетин и Плацебо). Для сравнения данных этих двух групп использовали статистический критерий Манна-Уитни (U), который позволил выявить значимые различия по каждому физиологическому показателю (уровень значимости p не менее 0,982). Далее по каждой группе определили достоверность различий между сериями и этапами эксперимента на основе критерия Фридмана (X_r^2). Оказалось, что для каждой группы эти различия достоверны с уровнем значимости не менее 0,99.

Результаты исследования

Далее, в виде сравнительных диаграмм представлены результаты двух групп испытуемых для полученных по-

казателей: ЧД (рис. 1), УМОД (рис. 2), УАД (рис. 3), ЧСС (рис. 4) и SpO_2 (рис. 5).

Значения показателя частоты дыхания в состоянии покоя перед процедурой электросна были близки в обеих группах испытуемых (15 и 16,8 цикл/мин для группы Пароксетин и Плацебо соответственно). На рис. 1 видно, что частота дыхания у испытуемых группы Пароксетин на первом и третьем этапе электросна ниже, чем в группе Плацебо, а на втором этапе электросна и при пробуждении соотношение меняется, и у испытуемых из группы Плацебо частота дыхания ниже в сравнении с группой Пароксетин. Испытуемые, принявшие стимулирующий препарат, характеризуются постепенным увеличением частоты дыхания при переходе от покоя к первому и второму этапу электросна при дальнейшем снижении ее на третьем этапе электросна с последующим увеличением при пробуждении.

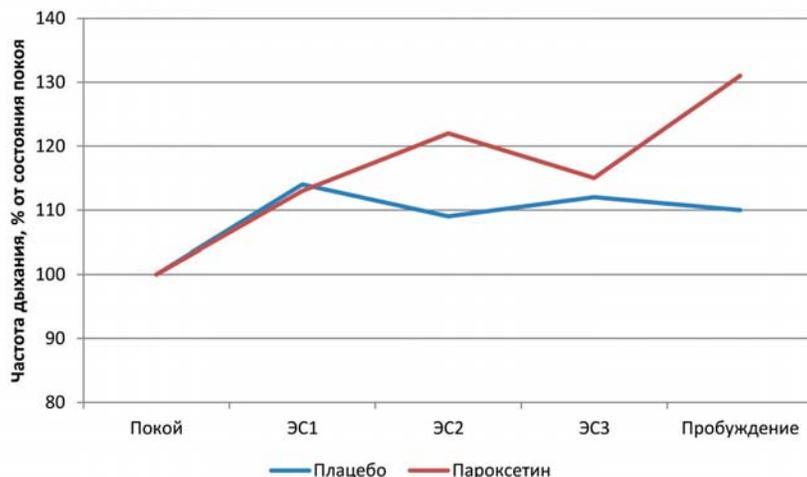


Рис. 1. Динамика частоты дыхания для групп испытуемых Пароксетин и Плацебо в процессе воздействия электросна.

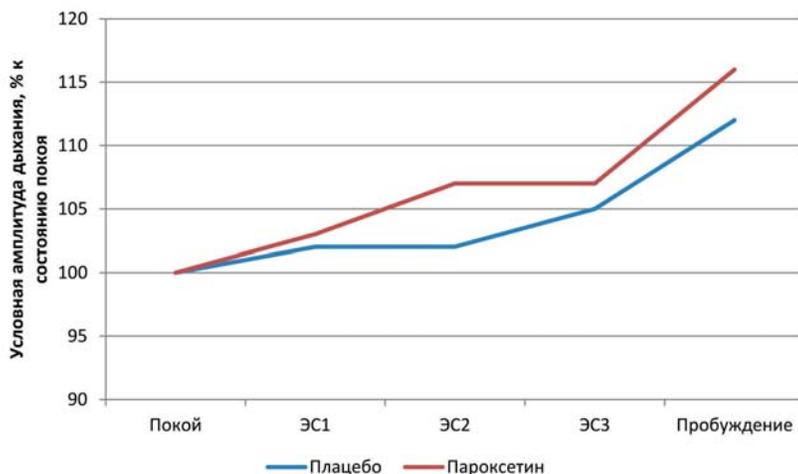


Рис. 2. Динамика условной амплитуды дыхания для групп испытуемых Пароксетин и Плацебо в процессе воздействия электросна.

Частота дыхания испытуемых группы Плацебо отличается несколько иной динамикой. В данном случае ЧД увеличивается более всего при переходе от состояния покоя к первому этапу электросна, дальнейшее продолжение воздействия электросна приводит к снижению частоты дыхания на втором этапе и увеличению на третьем этапе с последующим снижением ее в состоянии пробуждения. Известно, что в покое у здоровых людей частота дыхания составляет 14-20 уд/мин, а во сне – 12-13 уд/мин [3, 8]. В нашем исследовании наблюдается тенденция увеличения частоты дыхания у всех испытуемых во время электросна и пробуждения по сравнению с покоем (значения соответствуют состоянию покоя, а не сна). Это указывает на стимулирующее действие электросна и его дальнейшей отмены. На фоне фармастимулятора Пароксетина электросон приводит к замедлению процесса восстановления дыхания по сравнению с группой Плацебо. Пароксетин вызывает постепенное увеличение ЧД при

действии электросна, так что максимум возникает только на втором этапе ЭС с дальнейшим уменьшением частоты дыхания. В группе испытуемых Плацебо увеличение ЧД наблюдается уже на первом этапе ЭС с ее дальнейшим уменьшением. Похоже, что в группе испытуемых Плацебо динамические изменения ЧД протекают ранее на один пятиминутный этап. На основе этого можно предположить, что прием Пароксетина для улучшения результатов тренировки требует более длительного времени восстановления и проведения более продолжительной процедуры электросна.

Для показателя условной амплитуды дыхания (УАД) для группы испытуемых Пароксетин и Плацебо достоверные различия выявляются уже для состояния покоя перед проведением процедуры электросна (6,1 и 4,3 усл. ед. соответственно). На рис. 2 показана диаграмма изменения условной амплитуды дыхания (УАД) для группы испытуемых Пароксетин и Плацебо. В обеих группах наблюдается постепенное уве-

личение амплитуды дыхания при переходе от покоя к этапам электросна и к пробуждению.

Интересно, что при этом в группе Плацебо различия между этапами эксперимента менее выражены, чем в группе Пароксетин, особенно при прекращении воздействия электросна. В случае с амплитудой дыхания также наблюдается некоторое запаздывание динамических изменений по данному показателю в группе Пароксетин по сравнению с группой Плацебо.

Также, как и для показателя условной амплитуды дыхания, значения показателя условного минутного объема дыхания в состоянии покоя перед процедурой электросна для обеих групп достоверно отличаются (95 и 75,3 усл.ед/мин для групп Пароксетин и Плацебо соответственно). Динамика этого показателя схожа с изменениями частоты дыхания в двух группах (рис. 3). У испытуемых группы Пароксетин наблюдается увеличение минутного объема при переходе

от покоя к первому и затем второму этапам электросна с дальнейшим уменьшением на третьем этапе электросна и значительным увеличением при пробуждении. Для группы Плацебо характерным является увеличение минутного объема дыхания при переходе от состояния покоя к первому этапу электросна, с его дальнейшим снижением на втором этапе электросна. Далее происходит постепенное увеличение минутного объема дыхания при переходе к третьему этапу электросна и пробуждению. Значения минутного объема дыхания у испытуемых группы Пароксетин остаются значительно более высокими, чем у испытуемых группы Плацебо, на протяжении всего исследования.

Изменения показателей частоты сердечных сокращений для двух групп показаны на рис. 4. В динамике ЧСС группы Пароксетин и Плацебо наблюдаются небольшие различия, проявляющиеся в том, что в группе Пароксетин ЧСС увеличивается в два раза: при переходе от

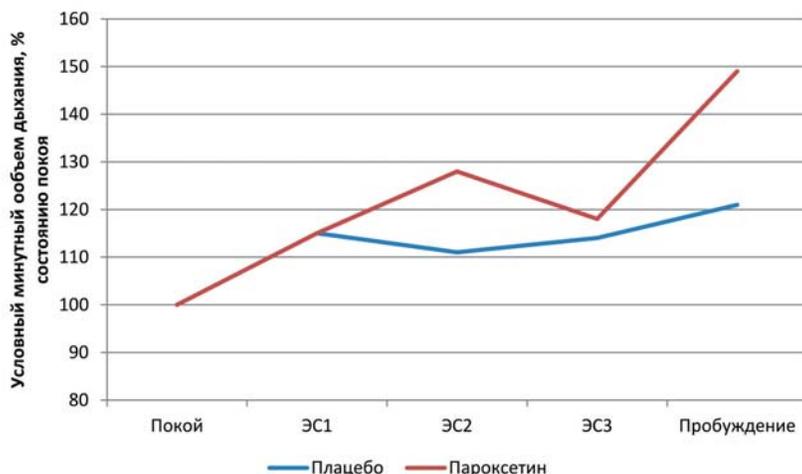


Рис. 3. Динамика условного минутного объема дыхания для групп испытуемых Пароксетин и Плацебо в процессе воздействия электросна.

покоя к первому этапу ЭС и при переходе от третьего этапа ЭС к пробуждению, а в группе Плацебо – один раз: при пробуждении. При этом в группе Пароксетин значения ЧСС выше на всех периодах исследования по сравнению со значениями этого показателя в группе Плацебо. В группе Плацебо наблюдается постепенное снижение ЧСС при переходе от покоя к электросну, которое продолжается в процессе всех трех этапов электросна. Увеличение этого показателя проявляется при отключении воздействия электросна, приводящего к пробуждению. Интересно, что во время электросна в группе Пароксетин ЧСС не становится менее 70 уд/мин, этот показатель принимает самое малое относительное значение на третьем этапе электросна и его значения при пробуждении практически соответствует уровню ЧСС в покое. Испытуемые группы Плацебо характеризуются тем, что у них ЧСС не достигает значения 70 уд/мин ни в состоянии покоя, ни во время этапов электросна, только при пробуждении ЧСС

превышает это значение. Особенности динамики ЧСС у испытуемых группы Плацебо демонстрируют, что электросон оказывает тормозное действие на сердечную активность. Практически такой же эффект, но менее выраженный, наблюдается у испытуемых группы Пароксетин, с разницей в том, что стимулирующее фармакологическое вещество продолжает оказывать активирующий эффект на сердечную деятельность, который слабо компенсируется тормозным влиянием электросна.

На рис. 5 показаны изменения уровня насыщения крови кислородом (SpO_2) у испытуемых двух групп в зависимости от воздействия электросна. В целом, надо отметить, что уровень насыщения крови кислородом в среднем по группам меняется мало. Уровень насыщения крови кислородом в группе Пароксетин выше, чем в группе Плацебо. При практическом равенстве значения этого показателя для обеих групп в состоянии покоя динамика SpO_2 в двух группах наблюдается различная.

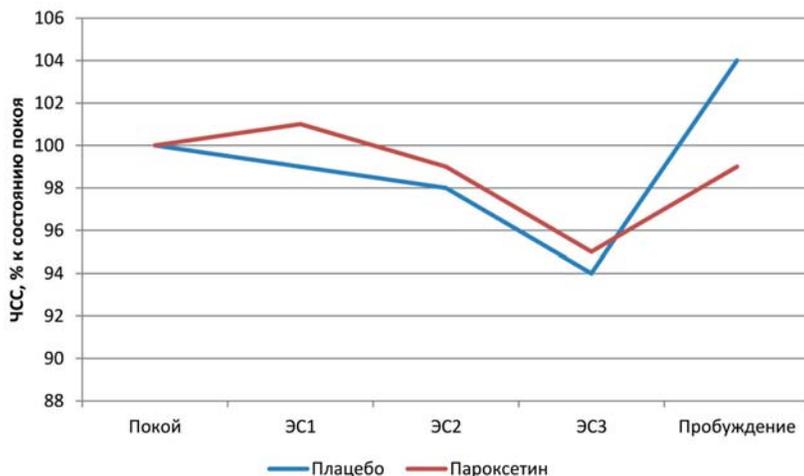


Рис. 4. Динамика ЧСС для групп испытуемых Пароксетин и Плацебо в процессе воздействия электросна.

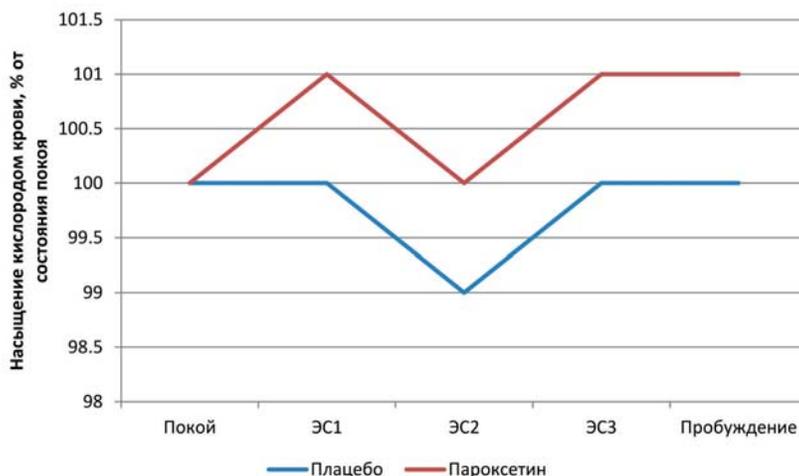


Рис. 5. Динамика уровня насыщения крови кислородом (SpO_2) для групп испытуемых Пароксетин и Плацебо в процессе воздействия электросна.

Для группы Пароксетин характерно увеличение уровня насыщения крови кислородом на первом этапе электросна и при пробуждении, при этом наблюдается снижение на втором и третьем этапах ЭС, а для группы Плацебо – постепенное снижение до второго этапа ЭС с последующим постепенным увеличением значения этого показателя. Очевидно, воздействие электросна на испытуемых группы Плацебо приводит к некоторому уменьшению уровня насыщения крови кислородом, которое сменяется ростом этого уровня на последнем этапе ЭС и при пробуждении. В случае влияния стимулирующего фармакологического препарата наблюдается первоначальное увеличение SpO_2 при включении процедуры электросна, продолжение которой приводит к небольшому снижению SpO_2 и дальнейшему увеличению при пробуждении.

Все приведенные выше данные необходимо рассмотреть в комплексе для понимания возможных механизмов, лежащих в основе динамических изме-

нений физиологических показателей отдельно для групп Плацебо и Пароксетин. Для испытуемых группы Плацебо характерна разная динамика показателей дыхательной и сердечной активности. При постепенном росте амплитуды дыхания наблюдается скачкообразное увеличение, затем уменьшение частоты дыхания. Интересно, что при пробуждении, наряду с уменьшением ЧД, увеличиваются УАД и УМОД. Изменения ЧСС и SpO_2 схожи, но при этом значительное уменьшение уровня насыщения крови кислородом наблюдается в середине процедуры электросна, а уменьшение ЧСС приходится на последний этап электросна. Похоже, что уровень насыщения крови кислородом быстрее реагирует на воздействие электросна по сравнению с ЧСС. Наличие разной направленности изменений ЧСС и УАД, УМОД, а также несинхронности ЧСС и SpO_2 указывает на системное протекание компенсаторных процессов.

Для испытуемых группы Пароксетин разные показатели дыхательной и сер-

дечной деятельности оказываются более синхронизированными. Динамика частоты дыхания, амплитуды дыхания и его минутного объема имеет схожие тенденции, проявляющиеся в росте значений этих показателей до второго этапа электросна с их уменьшением и дальнейшим ростом. Значения показателей ЧСС и SpO_2 сходным образом сначала увеличиваются при переходе от покоя к первому этапу электросна, затем снижаются постепенно на третьем этапе ЭС и увеличиваются при пробуждении. Направленность изменений всех показателей дыхательной и сердечной деятельности, очевидно, является результатом действия стимулирующего фармакологического препарата, которое приводит к изменению взаимодействия компенсаторных процессов. В частности, результатом такого действия являются более высокие показатели амплитуды, минутного объема дыхания, частоты сердечных сокращений и уровня насыщения крови кислородом.

Обсуждение результатов

Биогенный амин серотонин образуется путем гидроксирования и декарбоксихирования из аминокислоты триптофана. В центральной нервной системе (ЦНС) серотонин содержится преимущественно в гипоталамусе, эпифизе и среднем мозге. Рецепторы 5HT₁-5HT₄ действуют через GPCR-белки. Блокада обратного захвата серотонина (СИОЗС) повышает мотивацию, оказывает антидепрессивное, противотревожное, подавляющее аппетит действие и антиэметический эффект. В своем влиянии на ЦНС серотонин воздействует на процессы сна, восприятия, управления движениями, болевую

чувствительность, половую функцию, эндокринную регуляцию и когнитивную деятельность [10, 11].

Серотонин выделяется не только в пресинаптических окончаниях, но и в варикозных расширениях аксонов, т.е. он является и медиатором, и нейромодулятором. Гиперполяризация и снижение сопротивления мембраны, возникающие при активации 5-HT_{1A}-рецепторов, вызваны повышением калиевой проницаемости. Активация 5-HT_{2A}-рецепторов сопровождается медленной калий-зависимой деполяризацией. Активация 5-HT₃-рецепторов вызывает быструю Na^+ - K^+ -зависимую деполяризацию. Эти механизмы объясняют обнаруженный нами феномен улучшения релаксирующих эффектов электросна на фоне накопившегося в мозге серотонина. Низкочастотная ритмическая электростимуляция структур головного мозга реализует свои эффекты через вовлечение K^+ - Na^+ -зависимых процессов.

Доказано, что мощная наработка серотонина происходит во время занятий спортом. Показано, что экстремальные виды спорта и экстремальные нагрузки компенсаторно повышают выработку и мобилизацию серотонина у спортсменов. В свою очередь, накопление серотонина улучшает настроение, ослабляет тревожность и депрессивные компоненты, что ведет к повышению результативности спортивных показателей.

Серотонин является предшественником мелатонина, основного гормона эпифиза. 70% суточной продукции мелатонина приходится на период сна. Эффекты мелатонина обусловлены его действием на рецепторы MT_1 и MT_2 [10] и определяются антиоксидантным действием, способностью предохра-

нять ядерную и митохондриальную ДНК [13]. Мелатонин облегчает засыпание, восстанавливает естественный и циркадный циклы, устраняет дневную сонливость [10, 11], улучшает настроение и психический статус [14, 15]. Он снижает процент жира в комбинации с кальцием [15], омолаживает организм.

Выводы

Полученные в данном исследовании результаты позволяют прийти к следующим заключениям.

Состояние электросна характеризуется значениями показателей дыхательной и сердечной деятельности, типичными для состояния спокойного бодрствования или релаксации. Это позволяет обозначить состояние электросна не как состояние естественного сна, а, скорее, релаксации, или «электрорелаксации».

Выделение пятиминутных этапов ЭС оказалось полезным для уточнения динамики рассмотренных физиологических показателей, что указывает на наличие неоднородных состояний в процессе воздействия транскраниальной низкочастотной ритмической электро-стимуляции.

Изменения работы физиологических систем во время электросна можно фиксировать с помощью рассмотренных нами показателей ЧД, УАД, УМОД, ЧСС и SpO_2 .

Результатом процедуры электросна является улучшение вегетативной регуляции активности организма (на основе показателей физиологических процессов в группе Плацебо).

Применение метода электросна с целью купирования гиперактивации нервной является эффективным при условии

увеличения длительности воздействия низкочастотной ритмической электро-стимуляции, по крайней мере, на 5 мин.

Применение стимулирующего воздействия больших доз кофеина оказало влияние на динамику и величину значений показателей дыхательной и сердечной деятельности испытуемых (на основе показателей физиологических процессов в группе «Кофеин»).

Однократное введение СИОЗС Пароксетина оказывает активирующее действие на основные показатели спортивной деятельности и, вместе с тем, оказывает регулирующее действие на развитие транскраниальной гипнотической релаксации, по-видимому, за счет вовлечения мелатониновых механизмов.

Список литературы

1. *Гиляровский В.А., Ливенцев Н.М., Сегаль Ю.Е., Кириллова З.А.* Электросон. - М.: Медгиз. 1958. 172 с.
2. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 448 с.
3. *Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н.* Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. 2013. № 1. С. 7-17.
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 ее корреляция с поведением животных // Биомедицина. 2011. № 4. С. 8-18.
5. *Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.* Синдромный анализ функциональных состояний в контексте трехмерной векторной модели // Биомедицина. 2014. № 2. С. 25-37.
6. *Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.* Физические методы модуляции (инициации) переходных процессов между устойчивыми функциональными состояни-

- ями нервной системы // Биомедицина. 2014. № 3. С. 54-63.
7. **Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Вартапов А.А.** Методика наведения транскраниальных стимуляторов на заданные мозговые структуры по проекционным таблицам // Биомедицина. 2014. № 4. С. 54-60.
 8. **Ковальзон В.М.** Основы сомнологии: физиология и нейрохимия цикла «бодрствование-сон». - М.: Изд-во «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2012. 239 с.
 9. **Левин Я.И.** Вегетативная нервная система и сон // Сомнология и медицина сна. Избранные лекции / Под ред. Я.И. Левина, М.Г. Полуэктова. - М.: Медфорум. 2013. С. 104-110.
 10. Физиология человека. В 3-х тт. / Под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. - М.: Мир. 1996.
 11. Физиология человека / Под ред. Н.А. Агаджаняна и В.И. Циркина. - СПб. 1998.
 12. **Barrenetxe J., Delagrangre P., Martinez J.** Physiological and metabolic functions of melatonin // J. Physiol. Biochem. 60(1). P. 61-72.
 13. **Boutin J.A., Audriot V., Ferry G., Delagrangre P.** Molecular tools to study melatonin pathways and actions. Trends in Pharmacological sciences. 2005. 26(8): 412-9.
 14. **Busceni N., et al.** Melatonin for treatment of sleep disorders / Agency for healthcare research and quality. 2004.
 15. **Reiter R.J., Acuna-Castoviejo D., Tan D.X., Burkhardt S.** Free radical-mediated molecular damage (mechanisms of melatonin) // Annals of the New York Academy of Science. 2001. 939: 200-15.

Relaxation transcranial brain stimulation of athletes: the role of serotonergic mechanisms

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

The present message is devoted to search of physiological markers of a condition of an electric sleep. Transcranial electric sleep is artificially generated by using the electric current analogue of natural sleep. On healthy volunteers athletes it is shown that the condition of an electric sleep is followed by increase in values of indicators of respiratory and warm activity, more characteristic for a condition of a relaxation, than for a condition of a natural dream. Along with it introduction of a Paroxetine (a selective inhibitor of reuptake of serotonin (SIRS)) before training and procedure of an electric sleep promotes change of dynamics and improvement of indicators of course of physiological processes. Application of a Paroxetine in controlled research improves a sleep, promotes turning on of relaxation mechanisms of an electric sleep. The melatonin role as possible intermediary in processes of a relaxation is discussed.

Key words: transcranial electric sleep, serotonin mechanisms, SIRS, Paroxetine, respiratory activity, frequency, amplitude and respiratory minute volume, heart rate, oxygen saturation of blood.

Экс-орфанные рецепторы как мишени для потенциальных лекарственных средств

Е.Б. Шустов¹, С.В. Оковитый²

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

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

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

Приведен обзор современной литературы по эндогенным лигандам большой группы орфанных рецепторов. Показано, что интермедиаты углеводного, жирового и белкового обменов, цикла трикарбоновых кислот активно участвуют в регуляции обменных процессов, а их синтетические аналоги – лиганды к орфанным рецепторам (как агонисты, так и антагонисты) являются перспективными объектами разработки новых лекарственных средств при широком круге заболеваний (сахарный диабет, ожирение, метаболический синдром, аутоиммунные заболевания, гипертоническая болезнь, ишемия миокарда, гипертрофия миокарда, нейродегенеративные заболевания, иммунодефицитные состояния, болезни печени и т.д.). В отношении ряда экс-орфанных рецепторов представлены потенциально перспективные химические соединения, которые могут выступать в роли лигандов к рецепторам метаболического типа активации.

Ключевые слова: орфанные рецепторы, лиганды, интермедиаты обмена, цикл трикарбоновых кислот.

Введение

Орфанные (или «сиротские») рецепторы – установленные методами молекулярной биологии клеточные рецепторы, эндогенный лиганд которых не определен. Для этой обширной группы во многом загадочных молекулярных объектов установлены влияние на внутриклеточные процессы, передача сигналов межклеточного взаимодействия с помощью серпентинных (пронизывающих цитоплазматическую мембрану несколько раз) белков, регуляция экспрессии отдельных генов. В то же время, из-за отсутствия идентифицированных эндогенных лигандов, их физиологическая роль остается не до конца выяснен-

ной. Идентификация эндогенных лигандов, выполненная в последние годы для многих «бывших» орфанных рецепторов, является важным шагом в теоретическом обосновании и компьютерном дизайне новых, потенциально активных лекарственных средств.

По своей локализации в клетке орфанные рецепторы, также как и другие клеточные рецепторы, могут быть отнесены к суперсемействам мембранных, ядерных и цитозольных рецепторов. Мембранные орфанные рецепторы относятся, в основном, к серпентинным сигнальным рецепторам, сопряженным с ГТФ-связывающими G-белками (GPCR-рецепторы). Их роль связана с

передачей через цитоплазматическую мембрану сигнала о наличии с внешней стороны какого-либо лиганда, и инициализация цепочки внутриклеточных процессов, чаще всего связанных с вторичными мессенджерами (цАМФ, цГМФ, ДАГ, ИФ3, кальцием), активирующими, в свою очередь, зависимые от них протеинкиназы, фосфорилирующие различные белки, вызывающие конечный биологический эффект [3, 4].

Ряд орфанных GPCR-рецепторов способны возбуждаться интермедиатами энергетического метаболизма, такими как жирные кислоты, сахараиды, ацетат, лактат и кетоновые тела. Эти рецепторы могут рассматриваться как сенсоры метаболической активности или уровня энергетических субстратов и использоваться для контроля секреции метаболических гормонов или метаболических процессов в клетках. Особенно важным это становится при развитии патологических процессов, таких как ожирение, сахарный диабет типа 2 или дислипидемии. Играя координирующую роль в различных метаболических процессах, метаболит-чувствительные GPCR-рецепторы могут стать целью направленного синтеза лекарственных средств для борьбы с нарушениями метаболизма. Например, метаболит-чувствительные GPCR-рецепторы на высоком уровне экспрессируются на адипоцитах, что позволяет рассматривать их как целевой объект регулирования липолитических процессов, снижения уровня липидов плазмы при лечении дислипидемий и ожирения. Другие метаболит-чувствительные GPCR-рецепторы экспрессируются на энтероэндокринных клетках (секреция инкретинов, глюкагоноподобного пептида, желудочного

ингибиторного пептида) и β -клетках поджелудочной железы (секреция инсулина) и участвуют в регуляции углеводного обмена, что может быть целью применения действующих на них лекарственных средств при сахарном диабете. Метаболит-чувствительные GPCR-рецепторы на клетках иммунной системы осуществляют связь между метаболической и иммунной системами, что может найти фармакологическое применение для борьбы с воспалительными проявлениями при метаболических нарушениях у пациентов.

Экс-орфанные GPCR-рецепторы

GPR35-рецепторы возбуждаются кинуреновой (лизофосфатидиловой) кислотой, метаболитом кинуренинового пути обмена триптофана. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили обозначение KINA. Рецепторы локализованы в ЦНС и макрофагах. В ЦНС KINA-рецепторы располагаются пресинаптически на глутаматэргических и холинэргических нейронах, в результате их возбуждения снижается высвобождение из пресинаптической терминали возбуждающих медиаторов (аспартата и глутамата) и ацетилхолина в области никотинчувствительных холинорецепторов, снижается активация NMDA-рецепторов и связанных с их гиперактивностью нейродегенеративных процессов. Кинуреновая кислота является конкурентным антагонистом нейротоксичной хинолиновой кислоты [44]. С учетом того, что активация кинуренинового пути обмена триптофана снижает мощность серотонинового пути, предполагается значимость эндогенного лиганда KINA-ре-

цепторов в формировании психических заболеваний (депрессия, шизофрения).

GPR40-рецепторы возбуждаются жирными кислотами с длиной цепи C8-C22, как насыщенными, так и ненасыщенными. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр FFA1. Они сопрягаются с G_q/G_{11} белками. Рецепторы идентифицированы на β -клетках поджелудочной железы, энтероэндокринных клетках, клетках иммунной системы и ЦНС. При возбуждении FFA1-рецепторов на энтероэндокринных клетках происходит секреция глюкагоноподобного пептида и гастроинтестинального пептида, рецепторы на β -клетках поджелудочной железы сопряжены с секрецией инсулина. Известно, что экспрессия FFA1-рецепторов повышается в условиях гипергликемии. Следовательно, эти рецепторы включены в систему глюкозо-индуцированной регуляции секреции инсулина, а их миметики могут быть применены в лечении метаболического синдрома и сахарного диабета, а также ожирения. В доклинических исследованиях [14, 36, 38] показано, что агонисты FFA1-рецепторов усиливают глюкозоиндуцированную секрецию инсулина и показывают высокую эффективность в различных моделях сахарного диабета типа 1. Свойства агонистов FFA1-рецепторов проявляют представители группы пероральных антидиабетических средств тиазолиндионов (Росиглитазон, Троглитазон, Пиоглитазон). Хроническое возбуждение этих рецепторов является фактором, приводящим к развитию сахарного диабета типа 2. Важно отметить, что линия мышей, дефектная по этому типу рецепторов, проявляет повышенную устойчивость к

пищевой гипергликемии и гипертриглицеридемии, стеатозу печени, печеночным выбросам глюкозы, сниженной толерантности к глюкозе [37]. Предположительно, антагонисты FFA1-рецепторов могут найти применение в профилактике сахарного диабета типа 2, ассоциированного с ожирением.

GPR41-рецепторы возбуждаются короткоцепочечными жирными кислотами с длиной цепи C2-C5 (более чувствительны к ацетатам и пропионатам). В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр FFA3. Они сопрягаются с G_i белками, локализованы на энтероэндокринных клетках, на клетках островкового аппарата поджелудочной железы и в симпатических ганглиях. При возбуждении рецепторов происходит секреция пептида УУ (кишечный дипептид тирозин-тирозин, сигнализирующий о достаточном поступлении белковой и жирной пищи, вызывает торможение секреции желудочного и панкреатического соков, замедляет время прохождения пищи по кишечнику, абсорбцию короткоцепочечных жирных кислот в кишечнике, чем снижает их включение в реакции внутripеченочного липогенеза). Исследования на линиях животных с дефицитом FFA3-рецепторов и антагонистами к ним показали, что они вызывают снижение усвоения энергии и пищи и могут применяться в программах снижения веса [12]. За счет локализации рецепторов в ганглиях симпатической системы, FFA3-агонисты могут снижать эффективность симпатической регуляции, уровень норадреналина в плазме крови, частоту сердечных сокращений и насыщение крови кислородом.

GPR43-рецепторы возбуждаются короткоцепочечными жирными кислотами с длиной цепи C2-C5 (более чувствительны к пентаноатам). В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр FFA2. Они сопрягаются с G_q/G_{11} , G_i белками, локализованы на энтероэндокринных клетках, адипоцитах, нейтрофилах, эозинофилах, а также на клетках островкового аппарата поджелудочной железы. При возбуждении рецепторов на энтероэндокринных клетках происходит секреция глюкагоноподобного пептида (глюкозо-индуцированная регуляция секреции инсулина), на гранулоцитах – хемотаксис клеток. Необходимо отметить, что короткоцепочечные жирные кислоты (ацетаты, пальмитаты, бутираты и петаноаты) являются конечными продуктами ферментативного расщепления пищевой клетчатки бактериальной флорой толстого кишечника и, вероятно, сигнализируют организму об эффективности процесса пищеварения, а также регулируют работу иммунных клеток в кишечнике. Оростерическими агонистами FFA2-рецепторов могут быть производные цис-диметилакрилатов, аллостерическими агонистами – производные фенилацетамида [12].

GPR55-рецепторы, ранее известные как канабионидные рецепторы KB1, возбуждаются длинноцепочечным олеилэтаноламидом, сопрягаются с G_s белками, локализованы на энтероэндокринных клетках, играют роль в секреции глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и регуляции глюкозо-стимулированной секреции инсулина [33]. Агонисты этих рецепторов могут найти применение в терапии сахарного диабета типа 2.

GPR70-рецепторы – рецепторы, также обозначавшиеся как T1R1/T1R3, в соответствии с современной номенклатурой, обозначаются как TAS1R1/TAS1R3-рецепторы. Их лигандами являются глутаминовая и некоторые другие неароматические аминокислоты. Рецепторы сопрягаются с G-белками гаструцином и трансдуцином, локализованы во вкусовых сосочках языка и энтероэндокринных клетках [41]. Лиганды к этим рецепторам участвуют в регуляции углеводного обмена и их синтетические аналоги могут найти применение в лечении метаболического синдрома.

GPR80-рецепторы возбуждаются альфа-кетоглутаровой кислотой. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр OXGR1. Они сопрягаются с G_q/G_{11} белками, локализованы в почках и плаценте [21]. Функция пока не определена.

GPR81-рецепторы возбуждаются лактатом. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр HCA1. Они сопрягаются с G_i белками, локализованы на адипоцитах, дифференцированных как 3T3-L1 клетки, а также других тканях (сердце, поджелудочная железа, мозг). GPR81-рецепторы характеризуются высокой гомологией с GPR109a и GPR109b рецепторами, но различаются с ними локализацией и чувствительностью к лактату. Они сопрягаются с G_i/G_0 белками, снижают уровень активности предварительно активированной (например, форсколином) аденилатциклазы и накопления цАМФ в клетках [23].

GPR83-рецепторы возбуждаются лактатом. Сенсором метаболита высту-

пает один из доменов, локализованных на внутренней поверхности мембраны (цитозольный сигнальный домен). В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы значатся как HCA1. Они сопрягаются с G_i белками, локализованы на адипоцитах. При возбуждении воспроизводится антилиполитическое действие инсулина. Предположительно, схема этого эффекта следующая: в жировой ткани под влиянием инсулина усиливается захват глюкозы, которая в адипоцитах метаболизируется до лактата, действует на внутриклеточные HCA1-рецепторы, которые через G_i белки сопряжены с аденилатциклазой и тормозят ее активность, в результате снижения уровня цАМФ происходит торможение липаз и снижается интенсивность липолиза в жировой ткани. Соединения, являющиеся антагонистами HCA1-рецепторов, следовательно, будут ограничивать липогенез на фоне применения препаратов инсулина. Специфическим агонистом HCA1-рецепторов могут быть производные дигидробензойной кислоты, производные имидазолпиридинола [12].

GPR84-рецепторы возбуждаются среднепечечными жирными кислотами с длиной цепи C9-C14. Они сопрягаются с G_i/G_0 белками, локализованы на лейкоцитах, макрофагах, клетках нейроглии. Участвуют в цитокиновом взаимодействии, неспецифическом иммунитете, воспалительных реакциях [12].

GPR91-рецепторы возбуждаются сукцинатом, по своей структуре могут быть отнесены к семейству пуриnergических P2Y-рецепторов. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами,

эти рецепторы получили наименование SUCNR1. Они сопрягаются с G_i , G_q/G_{11} белками, локализованы в жировой ткани, печени, сердце, нейронах сетчатки, кишечнике, селезенке, дендритных клетках, почках, тромбоцитах. В обычных условиях уровень циркулирующего в крови сукцината в 8-10 раз ниже порога срабатывания рецепторов. Накопление внеклеточного сукцината, прежде всего, связано с его утечкой из митохондрий, что встречается при глубоких степенях клеточных повреждений, гипоксии, свободнорадикальных процессах, митохондриальной дисфункции и разобщении окисления-фосфорилирования. Сукцинат накапливается внеклеточно при ишемии и гипергликемии, что позволяет при хроническом воздействии этих патологических состояний превысить уровень чувствительности рецепторов. Следовательно, SUCNR1-рецепторы могут рассматриваться как сенсоры клеточных стресс-индуцированных повреждений и гипоксии [5].

В почках рецепторы выявлены на приносящих артериолах почечных клубочков и в юкстагломерулярном аппарате. Они участвуют в регуляции секреции ренина (а, следовательно, запускают каскад ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, что может привести к повышению артериального давления) и клубочковой фильтрации [26-28, 30, 41]. Экспериментально показано, что при введении экзогенного сукцината может повышаться уровень артериального давления, который нормализуется блокаторами рецепторов ангиотензина. SUCNR1-рецептор в почках при возбуждении запускает механизм внутриклеточной мобилизации кальция, фосфорилирования внеклеточно регулируемой

киназы (ERK)1/2, активизации каскада арахидоновой кислоты с образованием простаглицина и простаглицина E2. Активация почечных рецепторов сукцинатом увеличивает реабсорбцию фосфата и глюкозы, стимулирует глюконеогенез [5].

В сетчатке сукцинатные рецепторы участвуют в гипоксия-индуцированном ангиогенезе, усиливая экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста. В дендритных клетках возбуждение SUCNR1-рецепторов активирует хемотаксис иммунных клеток и продукцию провоспалительных цитокинов [21]. В связи с этим, высказано предположение, что антагонисты SUCNR1 могут быть полезны для профилактики и лечения почечной гипертензии, диабетической нефропатии и диабетической ретинопатии, аутоиммунных заболеваний. В ЦНС сукцинатные рецепторы способствуют повышению нейронального постсинаптического потенциала и растормаживают NMDA-опосредованные механизмы поведения и судорожной активности [30]. В тромбоцитах сукцинатные рецепторы вызывают полноценную активацию и агрегацию независимо по цАМФ- и фосфоинозитол-3-β-киназному пути [22].

В работе [10] показано, что в условиях острой или хронической ишемии миокарда сукцинат посредством GPR91-рецептора запускает фосфорилирование внеклеточного домена сигнал-регулирующей киназы (ERK1/2), повышение внутриклеточного содержания кальция и цАМФ, экспрессию гена кальций-кальмодулин-зависимой протеинкиназы IIδ (CaMKIIδ), транслокации гистондеацетилазы 5 (HDAC5) в цитоплазму, что является внутриклеточным сигналом для запуска процессов гипертрофии ми-

окарда. Этот эффект связан с сигнальной цепью ядерных протеинкиназ PI3K/Akt [42]. Под влиянием сукцината повышается сердечный выброс, при ишемии миокарда рецепторы участвуют в запуске процессов апоптоза [42].

В SUCNR1-позитивных адипоцитах при гипогликемических состояниях сукцинат тормозит индуцированный глюкагоном липолиз, сохраняя пул жирных кислот для энергетического обмена. В печени сукцинатные рецепторы обнаружены на звездчатых клетках, и их активация сопровождается появлением маркеров фибропластических процессов [18]. В гемопоэтических прогениторных клетках сукцинатные рецепторы индуцируют клеточную пролиферацию и защиту от апоптоза. В результате у пациентов с миелодепрессией ускоряется процесс восстановления уровня гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов. Сукцинат стимулирует хемотаксис дендритных клеток и развитие моноцитов, выступая синергистами в отношении провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухолей). Сукцинатные рецепторы участвуют в регуляции секреции эндотелиального сосудистого фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF1-α), что обеспечивает повышение устойчивости тканей к гипоксии [17, 24]. В некоторых исследованиях [11] сукцинату придается ключевая роль в развитии гипертензивных и фиброзных изменений при диабете, формировании диабетической ретинопатии, различных нарушений при метаболическом синдроме. В связи с этим, авторами делается предположение о целесообразности разработки специфических антагонистов SUCNR1-рецепторов.

GPR93-рецепторы возбуждаются пептонами – продуктами частичного гидролиза, пищеварительными ферментами и соляной кислотой желудочного сока пищевых низкомолекулярных белков и полипептидов, относятся к С классу GPCR-рецепторов и функционируют как гомодимерные или гетеродимерные комплексы с большими внеклеточными доменами. В современной номенклатуре рецепторов обозначаются как LAPR5-рецепторы. Они сопрягаются с G_q/G_{11} , G_i , G_s , G_{12}/G_{13} белками (в зависимости от органа), локализованы в желудочно-кишечном тракте, легких, сердце, селезенке, тимусе, коже и печени [34]. Частичными агонистами рецептора являются лизофосфатидная кислота, фарнезил-фосфаты. Участвуют в регуляции белкового обмена в тканях.

GPR99-рецепторы возбуждаются альфа-кетоглутаровой кислотой. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр OXGR2. Они сопрягаются с G_q/G_{11} белками, локализованы в гладких мышцах и яичках [12]. Функция пока не идентифицирована.

GPR104-рецепторы возбуждаются лактатом. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр HCA1. Они сопрягаются с G_i белками, локализованы в скелетных мышцах, печени и почках, бурой жировой ткани. Этот подтип рецепторов обладает более низкой чувствительностью к лактату. Они участвуют в регуляции углеводного обмена, транспорте углеводов через клеточные мембраны, запуске процессов глюконеогенеза в печени и почках [12]. При интенсивных

физических нагрузках в крови происходит накопление лактата, в результате его концентрация возрастает до уровня, достаточного для возбуждения этих рецепторов.

GPR109A-рецепторы (ранее известные как тип 1 рецептора к никотиновой кислоте) возбуждаются кетоновым соединением 3-гидроксibuтиратом. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр HCA2. Они сопрягаются с G_i белками, локализованы в жировой ткани, лимфоцитах, кератинпродуцирующих клетках кожи, кишечном эпителии, эпителии сетчатки. Участвуют в регуляции жирового обмена (при возбуждении воспроизводится антилипидный эффект кетоновых тел), повышении иммунитета, ограничении гиперпродукции кератина, регуляции локальных воспалительных процессов. Одним из соединений, связывающихся с HCA2-рецепторами, является никотиновая кислота и ее производные (аципимокс, ацифран), применяемые для лечения дислипидемий и атеросклероза. Никотиновая кислота через рецепторы HCA2 в адипоцитах индуцирует образование и высвобождение в кровь адипонектина, одного из локальных противовоспалительных регуляторов, который прямо действует на иммунные клетки, экспрессирующие HCA2-рецептор. В результате этого нарушается захват макрофагами липопротеинов, их окисление и пропитывание эндотелия, что тормозит образование атеросклеротической бляшки. В работе [19] показано, что иммунная активация липосахаридами, фактором некроза опухолей и интерлейкином 1 повышает экспрессию HCA2-рецепторов в жи-

ровой ткани, селезенке, на тканевых макрофагах. В механизме нейропротекторного действия НСА2-рецепторов особое значение имеет простагландиновый механизм (стимуляция образования простагландинов группы D) и снижение воспалительной и хемотаксической активности макрофагов [29]. Также агонистом этого типа рецепторов является монометилфумарат. Вероятно, именно связь с рецепторами на кератиноцитах обеспечивает его лечебный эффект при псориазе, а также при рассеянном склерозе. Препарат Фумадерм (Германия), представляющий собой комбинацию диметилфумарата с моноэтилфумаратом, с 1994 г. применяется для лечения псориаза [40].

Диметилфумарат (Текфидера) рекомендован FDA для использования в лечении рассеянного склероза, при этом его доза для длительного курсового (6 мес.) применения составляла 120-240 мг 2 раза в день [16, 43]. В механизме действия диметилфумарата (и монометилфумарата, до которого препарат быстро метаболизируется) важную роль играет его способность активировать транслокацию в ядро рецептора к нуклеарному фактору 2 (Nrf2), регулирующему, в том числе, гены антиоксидантного ответа (гемоксигеназа-1 (HMOX1), НАДФ, хинолиноксидоредуктаза 1 (NQO1) и другие). При воздействии диметилфумарата в цитозоле глиальных клеток, олигодендроцитов и нейронов повышается концентрация Nrf2, за которой следуют иммунные цитопротекторные эффекты, снижение морфологических и клинических проявлений нейродегенеративного процесса у пациентов с рассеянным склерозом. В культуре активированных Т-клеток монометилфумарат (основной

метаболит диметилфумарата) влияет на цитокиновый профиль (интерлейкины ИЛ-4, ИЛ-5) [13, 15]. На мышинных моделях рассеянного склероза показано [17], что применение диметилфумарата сопровождается снижением неврологического дефицита, инфильтрации иммунных клеток, нейтрофильной адгезии к эндотелиальным клеткам, демиелинизации спинальной хорды. В клинической практике подтвержден нейропротекторный эффект диметилфумарата при рассеянном склерозе [32].

GPR109B-рецепторы возбуждаются 3-гидроксиоктаноатом (продуктом β -окисления жирных кислот). В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили шифр НСА3. Аминокислотная последовательность этого рецептора на 95% гомологична НСА2-рецептору, а его гены представлены только у человека и высших приматов. Они сопрягаются с G_i белками, локализованы в жировой ткани, лимфоцитах, эпителии толстого кишечника. Участвуют в регуляции жирового обмена (при возбуждении воспроизводится антилиполитический эффект), повышении иммунитета [12]. Эндогенный лиганд этого рецептора (гидроксиоктаноат), в концентрациях, достаточных для возбуждения рецептора, появляется в организме человека при кетоацидотических состояниях (кетогенная диета, диабетический кетоацидоз, митохондриальные нарушения), и через НСА3-рецепторы на адипоцитах замыкается отрицательная обратная связь в системе регуляции липолиза.

GPR119-рецепторы возбуждаются 2-моноацилглицеролом, лизофосфолипидами и олеилэтаноламидом, близким

по своей структуре к лиганду каннабиноидов – апсидамиду. Они сопрягаются с G_s белками, локализованы в энтероэндокринных клетках (секреция глюкагоноподобного пептида-1, желудочного ингибиторного полипептида) и поджелудочной железе (глюкозо-стимулированное высвобождение инсулина). Агонисты рецептора могут рассматриваться как потенциальные средства лечения сахарного диабета типа 2. GPR119-рецептор, известный также как PRAP α (рецептор активации пролиферации пероксисом-альфа), в жировой ткани в качестве эндогенного лиганда имеет короткоцепочечный олеилэтаноламид [20, 38]. Рецепторы играют роль в секреции глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), подавлении аппетита и регулировании перистальтики кишечника (вне зависимости к активности PPAR α).

GPR120-рецепторы возбуждаются насыщенными жирными кислотами с длиной цепи C14-C18 и ненасыщенными жирными кислотами с длиной цепи C16-C22, и в настоящее время известны как тип 1 рецептора к омега-3-жирным кислотам. Аминокислотная последовательность этих рецепторов только на 10% совпадает со структурой FFA1-рецепторов, что выводит их в самостоятельный тип рецепторов. Они сопрягаются с G_q/G_{11} белками, локализованы на эпителиальных клетках кишечника (особенно в энтероэндокринных клетках), адипоцитах, макрофагах. Эффекты их возбуждения проявляются в секреции глюкагоноподобного пептида (GLP1) и желудочного ингибиторного пептида (GIP), т.е. в регуляции глюкозо-индуцированной секреции инсулина, а также в подавлении секреции провоспалительных цитокинов макрофагами.

Линии животных, дефицитных по этому типу рецепторов, демонстрируют сниженную толерантность к глюкозе. Показано, что именно GPR120-рецепторы макрофагов являются исполнительным механизмом противовоспалительного действия омега-кислот [25]. Агонисты рецепторов омега-3-жирных кислот могут найти применение при широком круге метаболических заболеваний, включая метаболический синдром, ожирение, сахарный диабет. Методами компьютерного моделирования выявлены несколько кандидатов на роль агонистов этих рецепторов, относящихся к химическим классам дигидробензофуранов, тиазоловых производных с ароматическим кольцом, производных изоксазола.

GPR131-рецепторы (также обозначались как TGR5, GPCR19, BG37) возбуждаются желчными кислотами. В современной номенклатуре рецепторов обозначаются как GPBAR1-рецепторы. Они сопрягаются с G_s белками, локализованы в эпителиальных печеночных клетках, гладких мышцах желчного пузыря (расслабление), энтероэндокринных клетках (секреция глюкагоноподобного пептида-1), бурой жировой клетчатке (усиление теплопродукции), скелетной мускулатуре, моноцитах, макрофагах, астроцитах. Игрют роль в регулировании всасывания липидов и желчных кислот в кишечнике, продукции желчных кислот, синтеза холестерина [42]. Действие сопряжено с ядерными гормональными рецепторами (фарнесоид X рецептор, FXR), на высоком уровне экспрессируются в печени и тонком кишечнике, играют важную роль в гомеостазе желчных кислот и их сигнальной функции, синтезе холестерина [34].

GPC6-рецепторы возбуждаются аминокислотами основной группы (глицин, аланин, цистеин, серин). В современной номенклатуре рецепторов обозначаются как GPCR6A-рецепторы. Они сопрягаются с G_q , G_i , G_s белками (в зависимости от органа), локализованы крайне широко (в легких, сердце, селезенке, скелетной мускулатуре, яичках, мозге, слизистой желудка, поджелудочной железе и печени). Свойства частичного агониста проявляют тестостерон и остеокальцин [42].

GPCA2-рецепторы (ранее обозначавшиеся как CaS, CaR, Ca-чувствительные рецепторы) возбуждаются ароматическими аминокислотами (тирозин, фенилаланин). Они сопрягаются с G_q/G_{11} , G_i/G_o , G_{12}/G_{13} белками (в зависимости от органа), локализованы крайне широко (в главных клетках паращитовидной железы, почках, хондроцитах, кардиомиоцитах, адипоцитах, панкреатических β -клетках, энтероэндокринных клетках, центральной нервной системе, кератиноцитах). Свойствами агонистов обладают ионы кальция, спермин, неомидин. Рецепторы участвуют в остеокальцин- и аргинин-индуцированной секреции инсулина. Выполняют роль кальциевого сенсора в паращитовидной железе и почках, регулируют высвобождение парат-гормона и резорбцию кальция и фосфатов в почках. Усиливают работу гастринпродуцирующих клеток слизистой желудка. Ингибируют липолиз в адипоцитах. Снижают интенсивность процесса апоптоза в кардиомиоцитах при ишемии, оказывают кардиопротекторное действие [42].

Сахарочувствительные GPCR-рецепторы **TAS1R2/TAS1R3** (ранее имевшие обозначение T1R2, T1R3) в миллимо-

лярных концентрациях активируются различными моносахарами и олигосахаридами, такими как глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза и лактоза). В низких концентрациях эти рецепторы также возбуждаются различными сахарозаменителями (цикламатами, сахарином, ацесульфамом и аспартамом), которые по своему действию являются активирующими лигандами для этих рецепторов. При этом аспартам выступает ортостерическим агонистом, а цикламат – аллостерическим агонистом. Сахарочувствительные клетки экспрессируют сенсор к сладкому в составе GPCR-рецептора, сопряженного с гаструдином и G_i белком, и с участием фосфолипазы $C\beta 2$ и белка TRPM5 вызывают деполяризацию клеток. Локализованы во вкусовых сосочках типа 2 слизистой языка, кишечнике и поджелудочной железе. В кишечнике сахарочувствительные GPCR-рецепторы экспрессируются на энтероэндокринных клетках и снижают высвобождение глюкагоноподобного пептида (GLP1), обеспечивая регуляторный ответ (усиление секреции инсулина) на пищевые углеводы. Один из проходящих клинические испытания препаратов – Лактизол – является негативным аллостерическим модулятором TAS1R2/TAS1R3-связанного глюкозоиндуцируемого повышения секреции глюкагоноподобного пептида (GLP1) и пептида YY. Под влиянием этих рецепторов находится экспрессия в энтероцитах натрий-зависимого переносчика глюкозы (SLC5A1). Под контролем TAS1R2/TAS1R3-рецепторов в поджелудочной железе находится также фруктозо-опосредованное усиление постпрандиальной (возникающей после приема пищи) глюкозо-стимулированной секреции

инсулина [12]. Позитивные аллостерические и ортостерические модуляторы TAS1R2/TAS1R3-рецепторов могут выступать как новые синтетические сахарозаменители, применяемые в целях снижения калорийности пищи в программах борьбы с ожирением.

Грелин, пептид длиной 28 аминокислот с уникальной октаноильной модификацией в положении Ser-3, был идентифицирован как эндогенный лиганд рецептора типа 1a, стимулирующий гормон роста (**GHS-R 1a**) и представляющий собой рецептор, связанный с G-белком. Грелин оказывает свое действие независимо от соматотропин-рилизинг гормона, и его рецепторы ранее считались орфанными (ССГР – стимулирующий секрецию гормона роста). Кроме гормона роста, под влиянием грелина стимулируется секреция АКТГ, пролактина, кортизола, альдостерона и адреналина. В настоящее время создаются грелиномиметики – производные триазолов [2].

Каннабиноидные рецепторы – класс клеточных рецепторов, принадлежащих семейству G-протеинсвязанных мембранных рецепторов и связывающихся с эндогенными (анандамидом и 2-арахидонилглицерином) и экзогенными лигандами (собственно каннабиноидами и их синтетическими аналогами). На кардиомиоцитах присутствуют рецепторы КБ1, посредством которых ингибируется активность аденилатциклазы, снижается приток кальция. В результате при активации КБ1-рецепторов наблюдается отрицательный инотропный эффект. В естественном состоянии данные рецепторы активируются анандамидами и способствуют торможению гиперактивности, вызванной избытком дофамина [7].

АРJ-рецепторы – G-протеинсвязанные мембранные рецепторы класса А, подобные по своей структуре рецепторам к ангиотензину, но не возбуждаемые им. Рецепторы высокоафинно связываются и возбуждаются пептидными лигандами семейства апелинов (апелин – препробелок, выделенный из слизистой оболочки быков, легко расщепляется на фрагменты в процессе тканевого процессинга различными эндопептидазами и ангиотензин-превращающим ферментом), наиболее активными являются апелин-12 и апелин-13 (индексы показывают длину аминокислотной цепочки), выступают в качестве механизма регуляции миграции клеток мезодермального происхождения в процессе формирования сердца в эмбриогенезе, избыточная возбужденность рецепторов играет роль предрасположенности к инфаркту миокарда, у взрослых людей гипервозбуждение АРJ-рецепторов может приводить к внезапной остановке сердца. Апелины усиливают дифференциацию клеток миокарда, ускоряют протекание постинфарктного периода [1]. АРJ-рецепторы после связывания с лигандом способны к интернализации и оптимизируют гликолитические и энергопродуцирующие механизмы в ишемизированном миокарде [6], в наибольшей степени это присуще апелину-12. Апелин-13 – самый мощный эндогенный агент инотропного действия. При использовании апелина-13 в зрелых кардиомиоцитах было зафиксировано увеличение сократимости саркомера в 1,4 раза, в результате чего повышалась сократимость всего сердца крысы. В то же время, линии животных, дефицитных по АРJ-рецепторам, были менее подвержены гипертрофии миокарда, сердечной

недостаточности, гипертонии. Предполагают, что стабильные структурные аналоги апелина-12 могут найти применение как цитопротекторные средства при ишемической болезни сердца [6], а апелина-13 – как инотропные средства для лечения хронической сердечной недостаточности. Блокаторы APJ-рецепторов могут быть перспективными для изучения как средства профилактического применения у лиц с высоким генетически обусловленным риском развития патологии миокарда.

Иммуно-ингибирующий **рецептор LILRB2** человека обнаружен на поверхности раковых клеток и стволовых клеток костного мозга. Этот рецептор участвует в торможении дифференцировки клеток, стимулируется ангиопоэтически-подобными белками (в семейство входит семь белков, участвующих в процессе воспаления, поддержании активности стволовых клеток, расщеплении жиров в крови и прорастании кровеносных сосудов в развивающейся опухоли), что обеспечивает для стволовых клеток их способность оставаться стволовыми [46].

Ядерные орфанные рецепторы

Ядерные орфанные рецепторы чаще всего относятся к III подтипу суперсемейства стероид/тироидных рецепторов (I подтип – «классические», или «стероидные» – это рецепторы прогестин (PR), эстрогенов (ER), андрогенов (AR), глюкокортикоидов (GR) и минералокортикоидов (MR); II подтип – рецепторы тиреоидного гормона (TR), полностью транс-ретиноевой кислоты (RAR), 9-цис-ретиноевой кислоты (RXR) и витамина D₃ (VDR); III подтип – рецепторы с неустановленными лигандами,

связываются с акцепторным элементом на ДНК в виде мономера и работают лиганд-независимо).

Рецептор печеночного ядерного фактора 4a (HNF-4a, TCF14) относится к суперсемейству стероид/тироидных рецепторов. Рецептор локализуется в цитозоле клеток, после взаимодействия с лигандом транслоцируется в ядро и включается в регуляцию процессов экспрессии генов и их транскрипции. Рецепторы возбуждаются желчными кислотами и их метаболитами. Участвуют в регуляции различных функций печени (образование и экскреция желчи, протеинсинтетические процессы в печени) и углеводного обмена (мутации в гене этого ядерного фактора ведут к формированию сахарного диабета типа MODY-1 (подтип 1 сахарного диабета взрослого типа у молодых) [8]. Это же семейство орфанных рецепторов в печени сопряжено с индукцией синтеза цитохрома P-450, влияющего на биотрансформацию как ксенобиотиков (в т.ч. лекарственных средств), так и эндогенных регуляторов (например, метаболизм тиреоидных гормонов). Именно через них оказывают влияние на цитохромы такие лекарственные препараты, как Рифампицин, Фенитоин, Карбамазепин, барбитураты [9]. Предполагают, что синтетические лиганды (аналоги урсохолоевой кислоты) к этому рецептору могут обладать гепатопротекторными свойствами, а также применяться при метаболическом синдроме у молодых людей.

ROR α и ROR γ T – ядерные рецепторы, сопряженные с ретиноевой кислотой, участвуют в дифференцировке T-клеток в TH17-тип, участвующий в формировании аутоиммунного поражения β -клеток

поджелудочной железы при сахарном диабете. Этот тип рецепторов находится непосредственно на нуклеиновых кислотах в комплексе с супрессорными белками. Взаимодействие с лигандом (аналогами ретиноевой кислоты) ведет к диссоциации комплекса, высвобождению рецептора и инициацию процесса транскрипции. Соединение SR1001, селективный обратный агонист этих рецепторов, который уменьшает их отклик, в модели диабета типа 1 на мышах значительно снижало частоту диабета и инсулинита у животных [35].

Заключение

Интермедиаты углеводного, жирового и белкового обменов, цикла трикарбоновых кислот, в качестве эндогенных лигандов к большой группе экс-орфанных рецепторов, активно участвуют в регуляции обменных процессов, а их синтетические аналоги – как агонисты, так и антагонисты – могут являться перспективными объектами разработки новых лекарственных средств при широком круге заболеваний (сахарный диабет, ожирение, метаболический синдром, аутоиммунные заболевания, гипертоническая болезнь, ишемия миокарда, гипертрофия миокарда, нервнодегенеративные заболевания, иммунодефицитные состояния, болезни печени и т.д.).

Список литературы

1. Аелин и дифференцировка эмбриональных стволовых клеток [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://surgeryzone.net/news/apelin-i-differencirovka-embriionalnyx-stvolovyx-kletok.html>, свободный. - Загл. с экрана. - Яз. рус.
2. *Беглен Д., Деманж Л., Мартине Ж., Мулен А., Перриссод Д., Ференц Ж-А.* Способ лечения или профилактики физиологических и/или патофизиологических состояний, опо-

средуемых рецепторами, стимулирующими секрецию гормона роста, триазолы и фармацевтическая композиция на их основе. – Патент РФ 2415134.

3. *Каркищенко Н.Н.* Инновационные лекарства и нелетальные технологии XXI века // Биомедицина. 2006. № 3. С. 5-21.
4. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармако-токсикологии. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 448 с.
5. *Оковитый С.В., Суханов Д.С., Заплутанов В.А., Смагина А.Н.* Применение антигипоксантов в клинической практике [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.critical.ru/actual/IT/antihypo.htm>, свободный. – Загл. с экрана. – Яз. рус.
6. *Пелогейкина Ю.А.* Регуляция метаболизма ишемизированного сердца структурными аналогами пептида апелина-12: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - М. 2015. 28 с.
7. *Раевнева Т.Г., Артюшевская Н.И., Савченко А.А.* Цирротическая кардиомиопатия // Вестник Белорусского государственного медицинского университета. 2014. Вып. 6 «В помощь практикующему врачу». С. 119-124.
8. Сахарный диабет MODY-типа [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://medkarta.com/?cat=article&id=26225>, свободный. – Загл. с экрана. – Яз. рус.
9. *Стокист Д.Р.* Влияние лекарственных препаратов на функцию житовидной железы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://bono-esse.ru/blizzard/A/Posobie/AFG/GVS/glandula_thyroidea_f_sostojanie_lab_ls.html, свободный. – Загл. с экрана. Яз. рус.
10. *Aguilar C.J.* Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation // Cell Communication and Signaling. 2014. №12:78 - DOI 10.1186/s12964-014-0078-2.
11. *Ariza A.C., Meinardus P., Robben D., Robben J.H.* The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions // Frontiers in endocrinology. 2012. V. 3. Art. 22.
12. *Blad C.C., Tang C., Offermanns S.* G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets // Nature reviews - Drug discovery. 2012. V. 11. P. 603-619.
13. *Bomprezzi R.* Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: an overview // Ther. Adv. Neurol. Disord. 2015. V. 8. № 1. DOI: 10.1177/1756285614564152. P. 20-30.

14. *Briscoe C.P.* Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules // *Br. J. Pharmacol.* 2006. V. 148. P. 619-628.
15. *Burness C.B., Deeks E.D.* Dimethyl Fumarate: A review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis // *CNS Drugs.* 2014. V. 28:373–387 DOI 10.1007/s40263-014-0155-5.
16. Center for drug evaluation and research: medical review(s), application number:204063orig1s000. 2013.
17. *Chen H., Assmann J.C., Krenz A., Rahman M., Grimm M., Karsten C.M., Köhl J., Offermanns S., Wettschureck N., Schwaninger M.* Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE // *The J. of Clinical investigation.* 2014. V. 124. N 5. P. 2188-2192.
18. *Deen P.M.T., Robben J.H.* Succinate Receptors in the Kidney // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011. V. 22. P. 1416-1422.
19. *Feingold K.R., Moser A., Shigenaga J.K., Grunfeld C.* Inflammation stimulates niacin receptor (GPR109A/HCA2) expression in adipose tissue and macrophages // *J. of Lipid research.* 2014. V. 55. P. 2501-2508.
20. *Fu J.* Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha // *Nature.* 2003. V. 411. P. 284-293.
21. *He W., Miao F.J.-P., Lin D.C.-H., Schwandner R.T., Wang Z., Gao J., Chen J.-L., Tian H., Ling L.* Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors // *Nature.* 2004. V. 429. P. 188-193.
22. *Högberg C., Gidlöf O., Tan C., Svensson S., Nilsson-Öhman J., Erlinge D., Olde B.* Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase-β signaling // *J. Thromb. Haemost.* 2011. V. 9. № 2. P. 361-372. DOI 10.1111/j.1538-7836.2010.04158.x.
23. *Liu C., Wu J., Zhu J., Kuei C., Yu J., Shelton J., Sutton S.W., Li X., Yun S.J., Mirzadegan T., Mazur C., Kamme F., Lovenberg T.W.* Lactate Inhibits Lipolysis in Fat Cells through Activation of an Orphan G-protein-coupled Receptor, GPR81 // *The J. of biological chemistry.* 2009. V. 284. N. 5. P. 2811-2822.
24. *Lukianova L.D.* Current issues of adaptation to hypoxia. Signal mechanisms and their role in system regulation // *Pathol. phiziol. exp. ter.* 2011. V. 1. P. 3-19.
25. *Oh D.Y.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects // *Cell.* 2010. V. 142. P. 687-698.
26. *Peti-Peterdi J.* High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91 // *Kidney Int.* 2010. V. 78. № 12:1214-1217. DOI: 10.1038/ki.2010.333.
27. *Peti-Peterdi J.* Mitochondrial TCA cycle intermediates regulate body fluid and acid-base balance // *J. Clin. invest.* 2013; 123(7):2788-2790. DOI:10.1172/JCI68095.
28. *Peti-Peterdi J., Gevorgyan H., Lam L., Riquier-Brison A.* Metabolic control of renin secretion // *Pflugers. Arch.* 2013. V. 465. № 1:53-8. DOI: 10.1007/s00424-012-1130-y.
29. *Rahman M., Muhammad S., Khan M., Chen H., Ridder D.A., Müller-Fielitz H., Pokornar B., Vollbrandt T., Stoëlting I., Nadrowitz R., Okun J.G., Offermanns S., Schwaninger M.* The b-hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages // *Nature communications.* 2014. V. 5. P. 3944. DOI: 10.1038/ncomms4944.
30. *Robben J.H., Fenton R.A., Vargas S.L., Schweer H., Peti-Peterdi J., Deen P.M.T., Milligan G.* Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells // *Kidney International.* 2009. V. 76. P. 1258-1267.
31. *Roehrs C., Garrido-Sanabria E.R., Da Silva A.C., Faria L.C., Sinhoro V.D., Marques R.H., Priel M.R., Rubin M.A., Cavalheiro E.A., Mello C.F.* Succinate increases neuronal post-synaptic excitatory potentials in vitro and induces convulsive behavior through N-methyl-d-aspartate-mediated mechanisms // *Neuroscience.* 2004. V. 125. № 4. P. 965-971.
32. *Ruggieri S., Tortorella C., Gasperini C.* Pharmacology and clinical efficacy of dimethyl fumarate (BG-12) for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis // *Therapeutics and clinical risk management.* 2014. V.10. P. 229-239.
33. *Ryberg E.* The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor // *Br. J. Pharmacol.* 2007. N 24. P. 116-127.
34. *Smith N.J.* Low affinity GPCRs for metabolic intermediates: challenges for pharmacologists // *Frontiers in Endocrinology.* 2012. V.3. № 1. Art.1. DOI: 10.3389/fendo.2012/00001.

35. *Solt L.A., Banerjee S., Campbell S., Kamenecka T.M., Burris T.P.* ROR inverse agonist suppresses insulinitis and prevents hyperglycemia in a mouse model of type 1 diabetes // *Endocrinology*. 2015. V. 156. №3. P. 869-81. DOI: 10.1210/en.2014-1677.
36. *Song F.* Synthesis and biological evaluation of 3-aryl-3-(4-phenoxy)-propionic acid as a novel series of G protein-coupled receptor 40 agonists // *J. Med. chem.* 2007. V. 50. P. 2807-2817.
37. *Steneberg P., Rubins N., Bartoov-Shifman R., Walker M.D., Edlund H.* The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse // *Cell. Metab.* 2005. V. 1. P. 245-258.
38. *Stone V.M.* The cytoprotective effects of oleoylethanolamide in insulin-secreting cells do not require activation of GPR119 // *Br. J. Pharmacol.* 2012. V. 110. P. 346-350.
39. *Tan C.P.* Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice // *Diabetes*. 2008. V. 57. P. 2211-2219.
40. *Tang H., Lu J.Y.-L., Zheng X., Yang Y., Reagan J.D.* The psoriasis drug monomethylfumarate is a potent nicotinic acid receptor agonist // *Biochemical and biophysical research communications*. 2008. V. 375. P. 562-565.
41. *Toma I., Kang J.J., Sipos A., Vargas S., Bansal E., Hanner F., Meer E., Peti-Peterdi J.* Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney // *The J. of Clinical investigation*. 2008. V. 118. № 7. P. 2526-2534.
42. *Tonack S., Tang C., Offermanns S.* Endogenous metabolites as ligands for G protein-coupled receptors modulating risk factors for metabolic and cardiovascular disease // *Am. J. Physiol. heart circ. physiol.* 2013. V. 304. P. H501-H513.
43. *Venci J.V., Gandhi M.A.* Dimethyl fumarate (tecfidera): A new oral agent for multiple sclerosis // *Annals of Pharmacotherapy*. 2013. V. 47. № 12. P. 1697-1702.
44. *Wang J., Simonavicius N., Wu X., Swaminath G., Reagan J., Tian H., Ling L.* Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35 // *J. Biol. chem.* 2006. V. 281. № 31. P. 22021-22028. DOI: 10.1074/jbc.M603503200.
45. *Yang L., Yu D., Fan H.-H., Feng Y., Hu L., Zhang W.-Y., Zhou K., Mo X.-M.* Triggering the succinate receptor GPR91 enhances pressure overload-induced right ventricular hypertrophy // *Int. J. Clin. exp. pathol.* 2014. V. 7. № 9. P. 5415-5428.
46. *Zheng J., Umikawa M., Cui C., Li J., Chen X., Zhang C., Hyunh H.D., Kang X., Silvany R., Wan X., Ye J., Cantó A.P., Chen S.-H., Wang H.-Y., Ward E.S., Zhang C.C.* Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development // *Nature*. 2012. V. 485(7400). P. 656. DOI: 10.1038/nature11095.

Ex-orphan receptors as targets for potential medicines

E.B. Shustov, S.V. Okovityi

The orphan receptors are brought the review of modern literature on endogenous ligands of large group. It is shown that intermediates of carbohydrate, fatty and protein metabolism, a cycle the three-carbonic acids actively participate in regulation of exchange processes, and their synthetic analogs – ligands to orphan receptors (both agonist, and antagonists) are perspective objects of development new drugs at a wide range of diseases (diabetes, obesity, a metabolic syndrome, autoimmune diseases, a hypertensive illness, myocardium ischemia, a myocardium hypertrophy, neurodegenerative diseases, immunodeficiency, liver diseases, etc.). Concerning several ex-orphan receptors potentially perspective chemical compounds which can act as ligands to receptors of metabolic type of activation are presented.

Key words: orphan receptors, ligands, exchange intermediate, cycle three-carbon acids.



Моделирование ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени в условиях алиментарной депривации протеина

Г.П. Копыльчук, О.Н. Волощук

Черновицкий национальный университет, институт биологии, химии и биоресурсов, Черновцы, Украина

Контактная информация: Волощук Оксана Николаевна, oxbm@mail.ru

В работе представлены данные экспериментального моделирования ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени на крысах, содержащихся в различных режимах белкового питания. Показано, что алиментарная депривация протеина является критическим фактором, усугубляющим течение ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени. Использованный метод введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении двух дней после четырехнедельного содержания крыс в условиях алиментарной депривации протеина позволяет получить модель дисфункции желчеобразования в печени.

Ключевые слова: моделирование, ацетаминофен, печень, желчеобразующая функция, алиментарная депривация протеина

Введение

Оценка состояния основных функций печени при гепатопатологии является необходимой для понимания биохимических механизмов нарушения ее функционирования, разработки критериев ранней диагностики гепатопатологических состояний и поиска эффективных гепатопротекторных препаратов. В современной гепатологии активно развиваются представления о биохимических механизмах формирования лекарственной гепатотоксичности [6, 11, 15, 17]. Именно поэтому моделирование токсических повреждений печени является чрезвычайно важной задачей в диагностическом, терапевтическом и профилактическом аспекте. При гепатопатологических процессах одной из первых нарушается желчеобразующая функция печени, поэтому для диагностики деструктивных нарушений при токсических повреждениях печени актуальным является исследование состояния ее желчеобразующей функции. На сегодня также остается открытым вопрос последовательности биохимических процессов, определяющих развитие и реализацию на-

сических повреждений печени является чрезвычайно важной задачей в диагностическом, терапевтическом и профилактическом аспекте. При гепатопатологических процессах одной из первых нарушается желчеобразующая функция печени, поэтому для диагностики деструктивных нарушений при токсических повреждениях печени актуальным является исследование состояния ее желчеобразующей функции. На сегодня также остается открытым вопрос последовательности биохимических процессов, определяющих развитие и реализацию на-

рушений желчеобразующей функции печени в условиях ограниченного поступления белков в организм.

Целью работы стало моделирование ацетаминофен-индуцированного повреждения печени в условиях алиментарной депривации протеина и изучение состояния желчеобразующей функции печени, биохимическими маркерами которой является содержание желчных кислот, холестерина и билирубина в желчи [10].

Материалы и методы

Исследования проводили на 36 белых нелинейных крысах-самцах массой 90-100 г в возрасте 2-2,5 мес. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Крыс содержали в виварии по одной в пластмассовых клетках с песчаной подстилкой, доступ к воде осуществлялся *ad libitum*. Нормирование суточного рациона проводили с учетом принципа парного питания.

Животные были разделены на группы: I – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе (Г); II – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина (НПР+Г); III – контроль (К). Животные I-й и III-й групп получали рацион, содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 76% углеводов, сбалансированный по всем нутриентам [2]. Животные II-й группы получали рацион, включающий 4,7% белка, 10% жиров и 85,3% углеводов.

После четырехнедельного содержания крыс на экспериментальной диете моделирование ацетаминофен-индуцированного нарушения желчеобразующей функции печени осуществляли путем введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении 2 дней с помощью специального зонда. Цервикальную дислокацию крыс под легким эфирным наркозом осуществляли на 31-е сутки эксперимента.

Для получения желчи после вскрытия брюшной полости желчные протоки перевязывали шелковой нитью и отделяли желчный пузырь. После механического измельчения желчного пузыря желчь разбавляли 96% этанолом в 20 раз, центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин и супернатант отбирали в чистые пробирки [13].

Концентрацию желчных кислот и холестерина определяли фотоколориметрическим методом, в основе которого лежит способность охлажденного раствора хлорного железа в ледяной уксусной кислоте, предварительно смешанного с концентрированной серной кислотой в соотношении 1:1, образовывать окрашенные комплексы с желчными кислотами и холестерином, имеющие максимум поглощения при 385 нм и 480 нм соответственно [2]. Концентрацию общего билирубина определяли ферментативным методом, базирующемся на взаимодействии диазотированной сульфаниловой кислоты в присутствии кофеинового реактива с билирубином, образующем азобилирубин, концентрация которого прямо пропорциональна концентрации билирубина в пробе. Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Разнообразие функций печени является причиной нарушения ряда метаболических процессов, протекающих в организме в условиях гепатопатологии. Адекватной моделью, используемой с целью изучения биохимических механизмов нарушения функций печени, является модель фармакологических или токсических гепатитов [16]. Классическим индуктором токсического повреждения печени является ненаркотический анальгетик Ацетаминофен, метаболизирующейся в гепатоцитах [8]. Ацетаминофен проникает через мембрану гепатоцита путем диффузии из синусоидов, связывается со специфическими внутриклеточными белками, транспортирующими лекарственные препараты в эндоплазматический ретикулум, где происходят основные процессы его метаболизма, а также в желчные каналцы, транспортные белки которых задействованы в экскреции метаболитов ацетаминофена в желчь. Нами ранее было показано, что введение *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении 2 дней крысам, содержащимся в условиях полноценного сбалансированного питания, позволяет моделировать гепатоцеллюлярный или цитолитический тип повреждения печени. В то же время, у крыс, содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, развивался смешанный тип лекарственного повреждения печени, характеризующийся цитолизом гепатоцитов и холестазом [1]. Следует отметить, что комплексное исследование желчеобразующей функции печени в условиях ацетаминофен-индуцированного повреждения печени не проводилось.

Результаты наших исследований показали, что в желчи животных с моделированным токсическим гепатитом наблюдается повышение содержания холестерина в 5 раз по сравнению с показателями контроля (рис. 1), что свидетельствует о проявлениях застоя желчи. В то же время, у животных с токсическим гепатитом, содержащихся в условиях белковой недостаточности, содержание холестерина почти в 20 раз превышает показатели контроля. Накопление нерастворимого в воде холестерина будет сопровождаться его кристаллизацией с последующим литогенезом в желчных протоках и желчном пузыре [5]. В свою очередь, повышение литогенных свойств желчи сопровождается нарушением способности гепатоцитов к формированию желчной мицеллы. Кроме того, застой желчи рассматривается как триггер воспалительных изменений желчных протоков [4].

Из холестерина в печени синтезируются «первичные» желчные кислоты, включающиеся в гепатоэнтральную циркуляцию [3]. Результаты наших исследований показали, что в условиях ацетаминофен-моделированного гепатита наблюдается тенденция к снижению содержания желчных кислот в желчи (рис. 2). Вероятно, установленный нами факт можно объяснить либо нарушением секреции гепатоцитами желчных кислот, либо нарушением синтеза желчных кислот вследствие снижения активности микросомального фермента холестерол-7 α -гидроксилазы [7]. В то же время, в желчи крыс с моделированным гепатитом, содержащихся в условиях белковой недостаточности, наблюдается

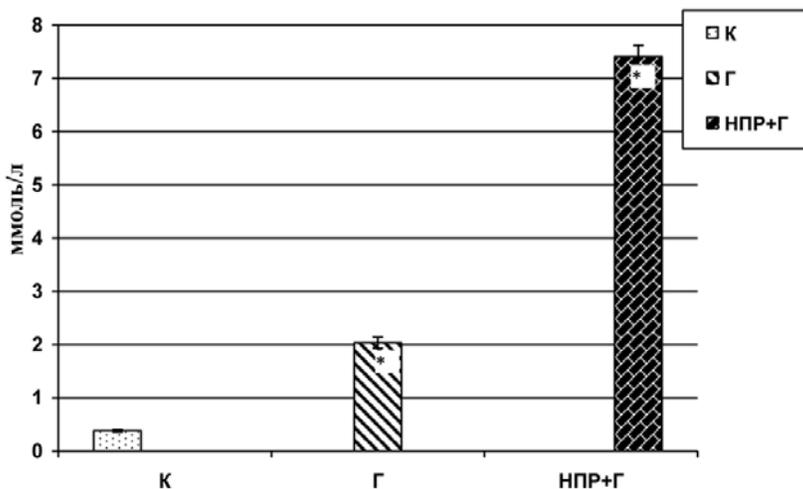


Рис. 1. Содержание холестерина в желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

Примечание (тут и далее):

К – контроль;

Г – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе;

НПР+Г – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина;

* – достоверная разница по сравнению с контролем.

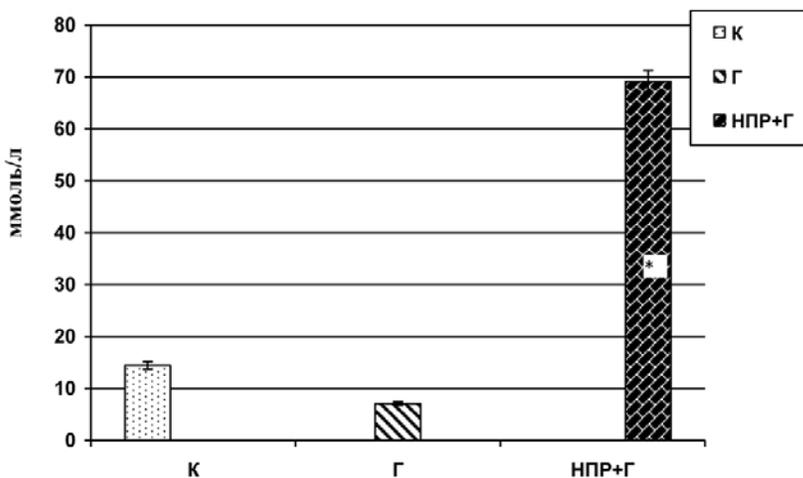


Рис. 2. Содержание желчных кислот в желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

резкое увеличение содержания желчных кислот в желчи, что свидетельствует о прогрессирующем нарушении оттока желчи из желчного пузыря в условиях алиментарной белковой недостаточности. Зарегистрированные изменения, вероятно, являются следствием воспалительного процесса с последующим нарушением коллоидно-осмотической стабильности желчи, концентрирующей и выделительной функции желчного пузыря. Нарушение оттока желчи может существенно нарушать процессы переваривания и всасывания, приводить к глубоким морфо-функциональным нарушениям пищеварительной системы [12]. Таким образом, белковая недостаточность является критическим фактором, усугубляющим течение ацетаминофен-индуцированного повреждения печени.

Следует отметить, что в обеих исследуемых группах наблюдается снижение холато-холестеринового

коэффициента, указывающего на соотношение в желчи между желчными кислотами и холестерином, достигая значений меньше 10-ти (рис. 3). В норме холато-холестериновый коэффициент больше 10-ти, а его снижение является индикатором склонности к образованию камней в желчевыводительной системе [14, 9]. Также следует отметить, что в обеих исследуемых группах животных наблюдается повышение общего билирубина в желчи (рис. 4), являющееся информативным тестом, указывающим на застой и сгущение желчи.

Итак, достоверное повышение по сравнению с контролем концентрации билирубина и холестерина на фоне снижения холато-холестеринового коэффициента свидетельствует о нарушении коллоидных свойств желчи и желчеобразующей функции печени в условиях моделирования ацетаминофен-индуцированного повреждения печени.

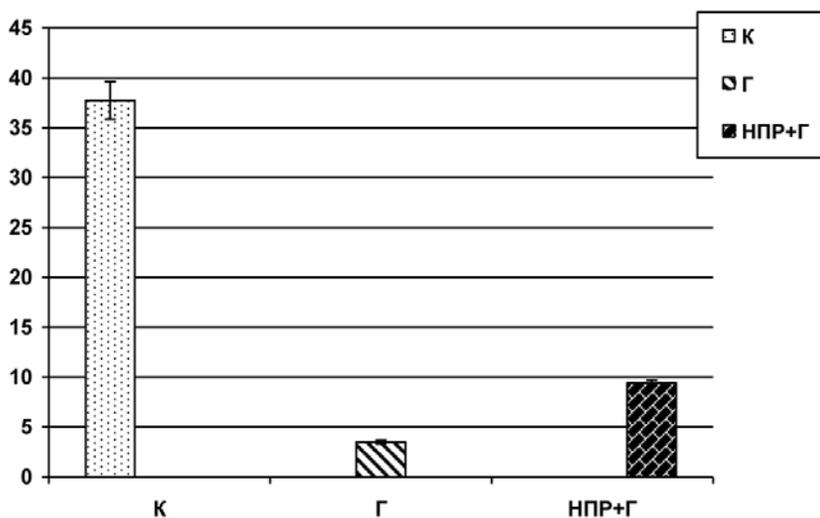


Рис. 3. Холато-холестериновый коэффициент желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

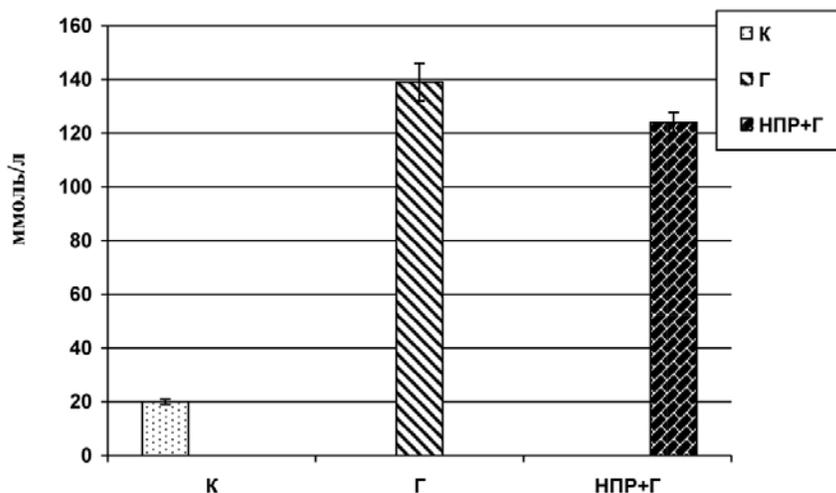


Рис. 4. Содержание общего билирубина в желчи крыс с ацетаминофен-индуцированным повреждением печени в условиях различных режимов белкового питания.

Выводы

Использованный метод введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении двух дней после четырехнедельного содержания крыс в условиях алиментарной депривации протеина позволяет получить модель дисфункции желчеобразования в печени. Предложенная модель может быть использована для разработки терапевтических подходов к устранению и коррекции последствий лекарственного повреждения печени.

Список литературы

1. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П., Бучковская И.М. Активность маркерных ферментов печени при токсическом гепатите в условиях алиментарной депривации протеина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014. 108 (8). С. 96-100.
2. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П., Кадайская Т.Г. Состояние системы энергообеспечения митохондрий печени в условиях алиментарной депривации протеина // Вопр. питания. 2014. № 3. С. 12-16.
3. Громашевська Л.Л., Мишунін І.Ф., Вовк А.Д. Сульфатовані жовчні кислоти у сечі при гепатобілярній патології // Інфекційні хвороби. 2003. № 1. С. 52-55.
4. Єлосва З.В. Діагностичне значення реологічних властивостей жовчі при вірусних гепатитах у дітей // Педіатрія. 2001. № 3. С.79-81.
5. Єлосва З.В. Значення складу жовчі для діагностики холестатичних варіантів вірусного гепатиту А у дітей // Современная педиатрия. 2011. № 6(40). С. 132-134.
6. Еремينا Е.Ю. Лекарственные поражения печени // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2012. № 1. С. 6-25.
7. Ильченко А.А. Желчные кислоты в норме и при патологии // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. 2010. № 4. С. 3-13.
8. Левина О.А., Гончарова И.А., Филатова Т.Г. и др. Влияние стимуляции и депрессии макрофагов на развитие острого токсического гепатита у крыс, вызванного парацетамолом // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2003. Т. 66. № 1. С. 57-59.
9. Маркидонова А.А., Белобородова Э.И., Бурковская В.А. Состояние желчевыводящей системы и литогенность желчи у больных воспалительными заболеваниями кишечника // Бюллетень сибирской медицины. 2013. Т. 12. № 6. С. 112-119.

10. *Неронов В.А.* Диагностика синдрома билиарной недостаточности у больных хроническими вирусными гепатитами // Человек и его здоровье. 2010. № 1. С. 86-90.
11. *Ревякин А.О., Капанадзе Г.Д., Касинская Н.В., Степанова О.И., Баранова О.В.* Моделирование лекарственного токсического гепатита на крысах // Биомедицина. 2014. № 1. С. 52-53.
12. *Соломенцова Т.А.* Билиарная недостаточность в клинической практике врача-терапевта // Здоров'я України. 2009. № 9. С. 48-50.
13. *Стефанов О.В.* Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). - К.: Авіцена. 2001. 528 с.
14. *Banzaraksheev V.G.* Experimental evaluation of influence of multicomponent phytotherapy on liver's morphofunctional condition // Fundamental research. 2012. № 4. P. 406-409.
15. *Borlak J., Chatterji B., Londhe K.B., Watkins P.B.* Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury // Genome Medicine. 2013. Vol. 5 (86). P. 2-14.
16. *Kuvandik G., Duru M., Nacar A.* Effects of erdosteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats // Toxicologic. pathology. 2008. Vol. 36. P. 714-719.
17. *Somanawat K., Thong-Ngam D., Klaikeaw N.* Curcumin attenuated paracetamol overdose induced hepatitis // World J. Gastroenterol. 2013. Vol. 19 (12). P. 1962-1967.

Modeling of the acetaminophen-induced disturbances of the bile producing liver function under the conditions of alimentary deprivation of protein

G.P. Kopylchuk, O.N. Voloshchuk

Data of the experimental modeling of acetaminophen-induced disturbances of the bile producing liver function in rats, maintained under the different regimen of the protein nutrition are submitted. It is shown, that alimentary deprivation of protein is the critical factor, aggravating the course of the acetaminophen-induced disturbance of the bile producing liver function. The used method of per os administration of acetaminophen in a starch suspension at dose 1 g/kg of body weight during 2 days after the 4-weeks maintenance of rats under the conditions of alimentary deprivation of protein, allows to obtain the model of the disfunction of a bile production by liver.

Key words: modeling, acetaminophen, liver, bile producing liver function, alimentary deprivation of protein.



О выборе методики исследования эффектов общего криотерапевтического воздействия

А.Ю. Баранов, Т.А. Малышева

Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, институт холода и биотехнологий, Санкт-Петербург

Контактная информация: Малышева Татьяна Алексеевна, тел.: 8(931)256-99-39, e-mail: mtab1@yandex.ru

Исследования эффектов общего криотерапевтического воздействия (ОКВ) направлены на увеличение сбора новых научных данных о позитивных и негативных результатах лечения холодом. ОКВ основано на контакте тела пациента с газом, охлажденным до температуры -130°C . Низкая температура газа воспринимается врачами и учеными как потенциальная угроза здоровью пациента. Для того чтобы снизить риск, многие ученые предлагают начинать исследования эффектов ОКВ на лабораторных животных. В качестве таких животных предполагается использовать крыс или мышей. Кроме этого, надо понять, какую научную и практическую ценность будут иметь результаты таких исследований.

Ключевые слова: общее криотерапевтическое воздействие, лабораторное животное, численный эксперимент, компьютерное моделирование.

Введение

Условия проведения экспериментов на лабораторных животных

Эксперименты на лабораторных животных (ЛЖ) активно проводились в XX в. Основная цель таких экспериментов – сбор предварительных результатов о действии на живой организм новых лекарственных форм, вредоносных организмов и опасных физических факторов, т.е. выявление потенциальной угрозы, которую новые лечебные методы могут создать для здоровья человека.

Во время общего криотерапевтического воздействия (ОКВ) пациент ока-

зывается в условиях экстремально низких температур, что может представлять потенциальную опасность. Из-за этого использование экспериментов с лабораторными животными на первый взгляд вполне оправдано. Физиологические эксперименты на животных обеспечивают сбор большого объема статистической информации, расширяют возможный спектр методов анализа и исследований. Допустимо даже вскрытие животных для анатомического изучения последствий эксперимента. Практически все достижения медицины XX в. каким-либо образом зависели от опытов на животных.

Современное общественное мнение неоднозначно относится к подобным экспериментам. Наиболее современным представляется мнение ученых Академии наук США. Указывается, что *над животными возможны любые эксперименты, если доказана их научная необходимость.*

Современный термин «модельные животные» показывает, что в экспериментах следует использовать только те живые организмы, которые способны достоверно моделировать реакцию человеческого тела на конкретное внешнее воздействие.

Важно оценить, сможет ли эксперимент с модельным животным получить данные, пригодные для оценки реакции человеческого организма. До организации экспериментов по оценке эффективности общей криотерапии на ЛЖ целесообразно определить последствия криогенного охлаждения поверхности тела животного в численном эксперименте. Для постановки такого эксперимента необходимо построить физическую и математическую модель тела крысы.

Математическая модель поможет решить исследовательские задачи с соблюдением современных гуманитарных требований. При постановке математического эксперимента основными аспектами моделирования являются достоверное описание внешних условий охлаждения, структуры и тепловой инерции тела ЛЖ.

Физическая модель тела лабораторного животного

При постановке численных экспериментов, связанных с исследованием тепловых процессов в биологических объектах, необходимо помнить о том,

что достоверность полученных результатов в значительной степени будет зависеть от адекватности физической модели. Объект охлаждения представляет собой тело сложной формы, образованное из тканей с разными физическими свойствами, в т.ч. содержащими внутренние источники теплоты [1]. Подробное физическое описание структуры такой сложности потребует колоссальных затрат времени. Без существенного упрощения формы объекта нельзя сформулировать его компактное математическое описание. Следует отметить, что разрабатываемая модель направлена на изучение тепловых процессов, возникающих в теле ЛЖ во время пребывания в криогенном газе с температурой ниже -100°C . Ни одно из живых существ не сможет пережить воздействие криогенным газом без дополнительных мер безопасности, направленных на защиту конечностей от обморожения. Поэтому надо описать объект охлаждения в том состоянии, в котором он будет находиться во время физического эксперимента.

Суть таких мер можно пояснить на примере наиболее распространенного вида модельных животных – лабораторной крысе. Лапы и хвост крысы не способны выдержать контакт с криогенным газом без повреждения, так как имеют малую тепловую инерцию. Хвост крысы является органом терморегуляции [6], поэтому почти лишен волосяного покрова и содержит большое количество кровеносных сосудов. Для защиты от обморожения хвост и лапы животного необходимо плотно прижать к телу. Это можно сделать при помощи сетчатого чехла, надетого на тело крысы. После этого форма тела животного становится симметричной и с достаточной точно-

стью может рассматриваться как тело вращения. Надо отметить, что при проведении экспериментов по моделированию ОКВ в качестве охлаждающего газа используются пары жидкого азота, которые не пригодны для дыхания, поэтому органы дыхания должны быть защищены от контакта с криогенным газом-теплоносителем. Наиболее простым решением представляется размещение крысы в таком положении, чтобы она дышала атмосферным воздухом. Для этого объект следует поместить в вертикальную камеру с открытым верхним сечением. Выполнение этого требования позволит защитить поверхность дыхательных путей от обморожения. В результате криогенный газ будет охлаждать только туловище животного, которое после фиксации конечностей и хвоста по форме приблизится к цилиндру.

Упрощение геометрической формы объекта охлаждения позволяет определить характеристические размеры цилиндра, который в ходе численного эксперимента будет имитировать тело модельного животного. Длина тела взрослой лабораторной крысы составляет не более $L=0,15$ м, масса тела до $G=0,5$ кг. Полагая эффективную плотность тела равной $\rho^*=1000$ кг/м³, можно определить эффективные значения объема и диаметра моделируемого цилиндра:

$$V^* = \frac{G}{\rho^*}, d^* = \sqrt{\frac{4G}{\rho\pi L}}$$

Эффективный диаметр тела крысы составит $d^*=0,065$ м. Длина объекта значительно больше диаметра, поэтому процесс переноса теплоты от центра тела животного к периферии можно рассматривать в радиальной системе координат (рис. 1).

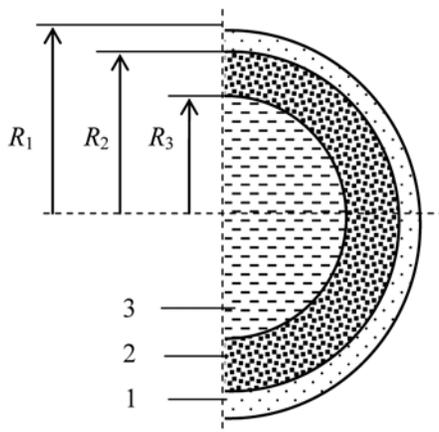


Рис. 1. Геометрическая схема тела модельного животного. 1 – мех, 2 – оболочка, 3 – ядро.

Объект представляет собой систему из нескольких коаксиальных цилиндров с различными физическими свойствами. Наружный слой меха (1) защищает тело от переохлаждения. Толщина меха зависит от вида модельного животного. Толщина мехового слоя $\Delta_{\text{мех}}$ лабораторной крысы может быть принята равной 0,2 мм [6]. Слой 2 состоит из тканей, способных без ущерба переносить переохлаждение. Центральная часть тела, слой 3, состоит из тканей и органов, не приспособленных к переохлаждению. В физиологии [5] центральную часть тела называют «ядром», а периферийный слой 2 – «оболочкой» тела. Считается, что масса оболочки составляет 30% от массы всего тела. Это позволяет определить вес слоев 2 и 3. По весу слоя 3 можно определить диаметр границы между оболочкой и ядром тела:

$$d_3^* = \sqrt{\frac{4G_3}{\rho\pi L}} = 0,055 \text{ м.}$$

Толщина слоя 2: $\Delta_2 = 0,5(d^* - d_3^*)$.

Для лабораторной крысы диаметр ядра и толщина оболочки составляют: $d_3^* = 0,055$ мм, $\Delta_2 \approx 0,005$ мм. Наружный диаметр объекта охлаждения определяется с учетом толщины мехового слоя: $d = d^* + 2\Delta_m$.

Полученные аналитические зависимости позволяют создать теплофизическую модель любого ЛЖ и организовать математический эксперимент, направленный на исследование тепловых процессов, которые возникают в теле животного при охлаждении криогенным газом. Определение границы между оболочкой и ядром тела позволяет определить допустимую продолжительность охлаждения. В соответствии с тепловой теорией ОКВ [1, 7], продолжительность воздействия криогенным газом подбирается таким образом, чтобы исключить обморожение поверхности оболочки. Переохлаждение ядра недопустимо. Эти ограничения получили название «условия гипотермической безопасности пациента». Недопустимо снижение температуры поверхности оболочки (T_2) до температуры начала необратимых холодовых поражений эпителиальной ткани ($T_{терм} \approx -2,5^\circ\text{C}$), а также снижение температуры тканей ядра (T_3) более чем на 1°C . При постановке эксперимен-

та, необходимо соблюдать эти условия: $T_2 > T_{терм} \approx -2,5^\circ\text{C}$ и $T_3 > T_{3\text{ норм}} \approx -1^\circ\text{C}$. Температура ядра тела животных разная: у человека $T_{3\text{ норм}} = 37^\circ\text{C}$, а у крысы $T_{3\text{ норм}} = 35,5^\circ\text{C}$. При проведении экспериментов выбор номинального значения температуры ядра имеет принципиальное значение, так как, учитывая наличие мехового покрова, можно предположить, что в нормальных условиях температура тканей оболочки близка к температуре тканей ядра: $T_2 = T_{3\text{ норм}} - 2 = 33,5^\circ\text{C}$. Учитывая низкую теплопроводность меха, в пределах слоя 3 температура снижается до уровня окружающей среды $T_{oc} \leq T_1 \leq T_3$. До начала охлаждения криогенным газом объект находится в тепловом равновесии с окружающей средой, поэтому температура мехового слоя меняется по линейной зависимости:

$$T_{1x} = T_{oc} + \frac{(T_3 - T_{oc})x}{\Delta_m},$$

где x – удаление от поверхности объекта охлаждения.

Скорость распространения зоны переохлаждения вглубь тела ЛЖ определяется физическими свойствами слоев (табл. 1) [5]. Ткани оболочки и ядра обладают теплопроводной способностью.

Таблица 1

Теплофизические свойства слоев объекта охлаждения

Название слоя	Мех	Оболочка	Ядро
Номер слоя	1	2	3
Плотность, кг/м ³	100	1017	1041
Влагосодержание, %	0	48	69
Теплоемкость, Дж/кг·К	2000	2186	3458
Теплопроводность, Вт/м·К	0,05	0,29	0,439
Удельное тепловыделение, Вт/кг	0	19,2	19,2

Принимаем допущение, что источники теплоты равномерно распределены по объему тела, тогда удельная теплотворная способность тканей может быть определена по калорийности суточного рациона взрослой лабораторной крысы. Энергетическая ценность суточного рациона лабораторной крысы составляет $Q_c = 830$ кДж [6]. Удельная теплотворная способность тканей тела модельного животного составит:

$$q_g = \frac{Q_c}{G \cdot 3600 \cdot 24}, q_g = 19,2 \frac{Bm}{кг}$$

Математическая модель тела лабораторного животного

Для проведения численного эксперимента по оценке последствий криогенного охлаждения тела модельного животного необходимо создавать математическую модель объекта охлаждения, которая позволит разработать программное обеспечение эксперимента. С физической точки зрения ОКВ представляет собой процесс конвективного охлаждения поверхности тела с целью раздражения холодовых, пороговых рецепторов кожного покрова [1, 3]. Для математического описания процессов переноса теплоты в материальных объектах обычно используют дифференциальное уравнение энергии:

$$\rho \frac{\partial h}{\partial \tau} = - \left(\frac{\partial q_x}{\partial x} + \frac{\partial q_y}{\partial y} + \frac{\partial q_z}{\partial z} \right) + q_v,$$

или

$$\rho \frac{\partial h}{\partial \tau} = - \text{div} \vec{q} + q_v,$$

где h, ρ – энтальпия и плотность материала; q_v – количество теплоты, выделяемое внутренними источниками в единице объема объекта.

В экспериментах, посвященных исследованию тепловых процессов в обо-

лочке человеческого тела, используют упрощенную одномерную запись уравнения энергии:

$$\rho \frac{\partial h}{\partial \tau} = - \left(\frac{\partial q_x}{\partial x} \right) + q_v.$$

Такое упрощение оправдано тем, что толщина оболочки тела человека составляет всего 0,016 м, в то время как эффективный диаметр тела составляет не менее 0,4 м.

Условия гипотермической безопасности ОКВ ограничивают глубину распространения поля температуры человеческого тела пределами его оболочки, поэтому одномерная запись уравнения энергии описывает процесс с достаточной точностью [4].

При моделировании процессов в теле модельного животного соотношение толщины оболочки и диаметра объекта иное. Кроме того, слои объекта охлаждения имеют выраженную кривизну. Для построения математической модели необходимо использовать одномерную запись уравнения энергии, в радиальной системе координат:

$$\rho \frac{\partial h}{\partial \tau} = - \frac{\partial q}{\partial R} + q_v,$$

где q – тепловой поток вдоль радиуса объекта.

Уравнение энергии аппроксимируется конечно-разностными приближениями:

$$|(h'_1 - h_i) \cdot V \cdot \rho = (q_{i+1} + q_{i+1} + q_v) \cdot \Delta \tau,$$

где h_i, h'_i – соответственно текущее и последующее значение энтальпии вещества в элементарном объеме; q_{i+1}, q_{i-1} – соответственно тепловой поток от предыдущего и последующего слоев.

Тепловой поток от смежных участков рассчитываются с учетом текущих значений температуры и теплопроводности элементов:

$$q_{i+1} = \frac{2\pi\lambda(T_{i+1}-T_i)}{\ln(R_{i+1}/R_i)}, q_{i+1} = \frac{2\pi\lambda(T_i-T_{i-1})}{\ln(R_i/R_{i-1})}$$

Тепловой поток с наружной поверхности объекта определяется конвекцией криогенного газа: при $i=n_i$ $q_{i+1}=a \cdot f(T_{ni}-T_i)$ Для центрального элемента математической модели: при $i=1$ $q_{i-1}=0$.

Для выполнения численного эксперимента объект разбивается на большее число элементарных цилиндров. Учитывая малые размеры моделируемого объекта, шаг изменения радиуса цилиндров составляет 0,25 мм. Отсчет индексов цилиндров ведется от центра к периферии. Так как переохлаждение центральной части объекта охлаждения недопустимо по условиям гипотермической безопасности, в центре объекта размещен цилиндр с радиусом $R_{i=1} = 5$ мм, в пределах которого температура будет меняться по одинаковому закону.

Материалы и методы

Компьютерное моделирование процесса криотерапевтического воздействия на организм лабораторного животного

Для предварительной оценки последствий ОКВ на организм модельных животных было проведено компьютерное моделирование процесса охлаждения.

Исследовалось изменение температуры тканей животного при контакте с газом температурой от -190°C до -110°C . Экспозиция охлаждения составляла 300 с. Значительное увеличение экспозиции преследовало цель изучить процессы, протекающие в теле ЛЖ при значительном переохлажде-

нии тканей оболочки тела. Такое переохлаждение сопровождается неизбежным снижением температуры ядра, что создает угрозу здоровью животного, поэтому следовало проанализировать, какие результаты можно получить при максимальной продолжительности контакта тела с криогенной газовой средой.

Целью криотерапии является переохлаждение поверхности кожи объекта криоодействия до температуры в интервале от -2 до $+2^{\circ}\text{C}$ [7]. Безопасность объекта от переохлаждения основана на ограничении допустимого изменения температуры тканей на границе «ядра» и «оболочки» тела. Для человека допустимое изменение температуры составляет не более 1°C . Как показано выше, средняя теплотворная способность тканей крысы почти в 4 раза выше, чем у человека. Можно предположить, что «ядро» тела животного способно лучше противостоять переохлаждению, однако в любом случае изменение температуры на границе «ядра» и «оболочки» тела не должно быть существенным, так как иначе могут пострадать органы, расположенные близко к поверхности тела, прежде всего – легкие.

Результаты и их обсуждение

В табл. 2 приведены результаты моделирования процесса охлаждения тела ЛЖ при температуре газа $-190^{\circ} \leq T_{\text{газ}} \leq -110^{\circ}\text{C}$. Основной массив данных представляет собой температуру тканей тела на разных уровнях: в центре тела – $T_{\text{я}}$, на границе «ядра» и «оболочки» – $T_{\text{я-о}}$, на поверхности «оболочки» – $T_{\text{о}}$, на поверхности мехового слоя – $T_{\text{мех}}$. Кроме этого рассчитаны и приведены значения теплового потока с поверхности тела $q_{\text{мех}}$ в момент $\tau=300$ с и количества отведенной от объекта охлаждения теплоты $Q_{\text{мех}}$.

Таблица 2

Результаты компьютерного моделирования процесса ОКВ на тело лабораторного животного при толщине мехового слоя 2 мм

Температура, °С					$q_{\text{мех}}$, Вт	$Q_{\text{мех}}$, кДж
$T_{\text{газ}}$	$T_{\text{я}}$	$T_{\text{я-о}}$	$T_{\text{о}}$	$T_{\text{мех}}$		
-110	35,5	25	9,3	-26,8	66	21,2
-120	35,5	24,5	8,2	-29,4	68	22,1
-130	35,5	24,4	7,6	-31,4	71	22,4
-140	35,5	24,2	7,2	-31,7	71	22,8
-150	35,5	23,9	6,5	-33,4	73	23,4
-160	35,5	24	6,6	-33,6	73	23,2
-170	35,5	23,7	6,1	-34,5	74	23,7
-180	35,5	23,7	6	-34,7	74	23,7
-190	35,5	23,6	5,9	-35	74	23,8

Из данных табл. 2 видно, что несмотря на значительное превышение традиционной экспозиции ОКВ ($\tau=180\text{с}$), ни в одном из рассмотренных вариантов не удалось добиться снижения температуры поверхности «оболочки» $T_{\text{о}}$ до уровня от -2 до $+2^{\circ}\text{C}$, при котором возникает криогенная стимуляция пороговых холодовых рецепторов кожи. При этом температура центра «ядра» тела $T_{\text{я}}$ осталась неизменной во всех вариантах, но температура тканей на границе «ядра» и «оболочки» $T_{\text{я-о}}$ опустилась до уровня менее $+25^{\circ}\text{C}$, т.е. почти на 10°C , что не может не вызвать необратимых последствий для организма животного. По условиям защиты «ядра» тела от переохлаждения процесс криовоздействия нужно было бы прекратить значительно раньше. Если считать, что допустимое изменение температуры границы «ядра» и «оболочки» составляет 5°C , то процесс криовоздействия при температуре газа -180°C должен был быть прекращен

уже через 133 с (рис. 2), когда температура $T_{\text{я-о}}$ опустилась до уровня 30°C . К этому моменту температура поверхности «оболочки» тела опустилась только до $12,7^{\circ}\text{C}$. При такой температуре холодовые рецепторы кожи не активируются, и получение криотерапевтического эффекта невозможно.

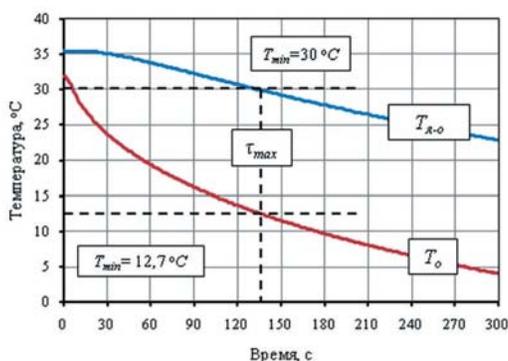


Рис. 2. Изменение температуры наружной границы «ядра» ($T_{\text{я-о}}$) и «оболочки» ($T_{\text{о}}$) тела животного при температуре газа -180°C .

Учитывая то, что объект имеет цилиндрическую форму, в зону переменной температуры попадает значительная по массе часть «ядра», которая составляет около 74%. Можно утверждать, что переохлаждению в той или иной степени подверглись все внутренние органы животного. При таких условиях переохлаждение тканей «ядра» может стать причиной целого ряда негативных последствий, которые полностью исключены при реализации технологии криотерапевтического воздействия на человека. Несмотря на общее переохлаждение тела животного, поверхность «оболочки» тела так и не достигла температуры «криотерапевтического» диапазона (от -2 до +2°C), эксперименты по исследованию криотерапевтических эффектов на ЛЖ следует признать бесполезными.

Высказывается мнение о том, что основным препятствием переохлаждению поверхности оболочки до оптимального температурного уровня является слой меха, который достаточно эффективно препятствует отводу теплоты. Учитывая многочисленные предложения уменьшить толщину мехового слоя ЛЖ или вовсе удалить волосяной покров с поверхности тела механически, следует смоделировать ход процесса ОКВ при меньшей толщине «теплоизоляционного» слоя тела. По изложенной выше методике было выполнено еще два численных эксперимента, в которых толщина мехового слоя составляла 1,5 и 1,0 мм. Основные результаты повторных экспериментов приведены в табл. 3.

На первый взгляд, изменения в физической модели тела ЛЖ обеспечили достижение желательного результата.

Таблица 3

Результаты численного эксперимента по моделированию процесса ОКВ на тело лабораторного животного при различной толщине мехового слоя

$T_{газ}, °C$	Толщина мехового слоя 1,5 мм						Толщина мехового слоя 1,0 мм					
	$T_{я}, °C$	$T_{я-о}, °C$	$T_o, °C$	$T_{мех}, °C$	$q_{мех}, Вт$	$Q_{мех}, кДж$	$T_{я}, °C$	$T_{я-о}, °C$	$T_o, °C$	$T_{мех}, °C$	$q_{мех}, Вт$	$Q_{мех}, кДж$
-110	35,5	24	7	-20,9	70	22,8	35,5	22,4	3	-10,1	80	25,4
-120	35,5	23,5	5,9	-23,1	73	23,7	35,5	22	2,7	-10,3	79	26
-130	35,5	23,6	5,9	-23,5	74	23,5	35,5	21,6	1,5	-11,7	82	26,9
-140	35,5	23,1	4,9	-25	76	24,4	35,5	21,7	1,4	-12	83	26,7
-150	35,5	23,1	4,7	-25,7	77	24,4	35,5	21,2	0,6	-13	84	27,5
-160	35,5	22,8	4,2	-26,4	77	24,9	35,5	21,2	0,4	-13,3	86	27,5
-170	35,5	22,8	3,9	-27	78	25	35,5	21	0	-13,9	86	28
-180	35,5	22,7	3,9	-27,3	78	25,2	35,5	20,9	-0,1	-14,1	87	28
-190	35,5	22,7	3,7	-27,5	79	25,3	35,5	20,9	-0,2	-14,2	87	28,1

Температура поверхности «оболочки» тела T_o существенно уменьшилась. При этом минимальное значение T_o составило 3,7°C (табл. 3). Дальнейшее уменьшение толщины мехового слоя позволило получить на поверхности оболочки отрицательные температуры. Однако снижение температуры поверхности сопровождалось дальнейшим переохлаждением тканей «ядра» тела. При снижении толщины меха доля тканей «ядра», переохлажденных более чем на 1°C, увеличилась до 81%. Для обеспечения защиты животного от переохлаждения криотерапевтическое воздействие следовало бы прервать уже через 117 с, когда температура наружной границы «ядра» опустилась до уровня 30°C. В этот момент температура поверхности оболочки составляла не ниже 10°C, что полностью исключает проявление криогенной стимуляции холодовых рецепторов.

Выводы

1. Результаты экспериментальных исследований показывают, что из-за малой массы и размеров тела крысы невозможно создать внешние условия, при которых поверхность тела охладится до уровня, обеспечивающего получение криотерапевтического эффекта.

2. Физический эксперимент на лабораторной крысе не целесообразен, т.к. приводит к безусловной гибели животного и не обеспечивает получения необходимой информации.

3. Исследование эффектов общей криотерапии на лабораторных крысах невозможно, так как результаты ОКВ на тело крысы принципиально отличаются от последствий криотерапевтических процедур для человека.

4. Основной объем исследований в области криотерапевтического воздействия может быть выполнен в режиме численного эксперимента на математической модели объекта ОКВ.

5. Математическое моделирование позволяет определить условия охлаждения, обеспечивающие полную безопасность пациента во время процедур ОКВ.

6. Клиническая практика общей криотерапии составляет более 35 лет. Все возможные причины негативного воздействия на человеческий организм исключены на основе практического опыта.

7. Информацию о лечебных эффектах криотерапии следует собирать во время лечебных или профилактических сеансов ОКВ при четком соблюдении условий безопасности охлаждения, установленных в рамках математического эксперимента.

Список литературы

1. Баранов А.Ю., Малышева Т.А. Моделирование нестационарного теплообмена в криомедицине // Вестник Международной академии холода. 2000. № 2. С. 38-41.
2. Баранов А.Ю., Малышева Т.А., Савельева А.В., Сидорова А.Ю. Выбор схемы общего криотерапевтического воздействия // Вестник Международной академии холода. 2012. № 4. С. 40-44.
3. Баранов А.Ю., Малышева Т.А., Савельева А.В., Сидорова А.Ю. Перенос теплоты в объекте общего криотерапевтического воздействия // Вестник Международной академии холода. 2012. № 2. С.35-40.
4. Баранов А.Ю., Баранов В.А., Малышева Т.А. Энергетические основы эффективности криотерапевтической аппаратуры // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2005. № 2. - М.: Медицина. С. 29-31.

5. *Бартон А., Эндхолм О.* Человек в условиях холода. - М.: Издательство иностранной литературы. 1959. 280 с.
6. *Сахаров П.П., Метелкин А.И., Гудкова Е.И.* Лабораторные животные. - М.: Государственное издательство медицинской литературы. 1952. 316 с.
7. *Шиман А.Г., Кирьянова В.В., Максимов А.В., Баранов А.Ю.* Клинико-физиологические аспекты применения криотерапии // Вестник Государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. – СПб. 2001. № 1. 27 с.

Methods of whole body cryotherapy effects research

A.Yu. Baranov, T.A. Malysheva

Whole body cryotherapy (WBC) effects researches are organized to reveal and collect new clinical results on negative and positive aspects of cold therapy. WBC is a method of body exposing to low temperatures. Nitrogen gas is cooled to -130 C, which lowers the patient's skin surface temperature. Some scientists and doctors see a potential health menace in low temperature use. They suggest starting clinical practice on laboratory animals to minimize the risk of WBC. It is advised to start experiments on rats and mice. It is also necessary to understand what scientific and practical value these studies will have and how these findings can be applied.

Key words: cryotherapy effect, laboratory animal, numeral experiment, computer model.

Разработка методологии получения растворимой формы рекомбинантной N-ацетилтрансферазы-2 человека

М.С. Дуля, Е.Д. Шевченко, Н.В. Петрова

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

Контактная информация: Дуля Максим Сергеевич, mdulya@gmail.com

В статье представлена разработка методологии и оптимизация условий получения рекомбинантной N-ацетилтрансферазы-2 человека (*hNAT2*), найдены оптимальные параметры наработки фермента в растворимой форме и в достаточном количестве для *in vitro* биоаналитических экспериментов. Приводятся данные о дизайне генетической конструкции для эффективной экспрессии рекомбинантного фермента N-ацетилтрансферазы-2 человека, методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях подтверждается молекулярная масса белка (34-35 кДа), указывается количественное содержание фермента (3,14 мг/мл).

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза-2 (*NAT2*), фермент, гель-электрофорез, человек.

Введение

Биотрансформация ксенобиотиков и лекарственных средств в подавляющем большинстве случаев осуществляется под контролем ферментов. Ферменты, участвующие в метаболизме ксенобиотиков, локализованы главным образом в печени, хотя немаловажную роль могут играть ферменты кишечника, лёгких, почек, кожи и других тканей.

Внимание нашего исследования посвящено условиям экспрессии ферментов второй фазы биотрансформации – N-ацетилтрансфераз. Ацетилирование эволюционно является одним из ранних механизмов адаптации, т.к. эта реакция необходима для синтеза жирных кислот, стероидов, функционирования цикла Кребса, метаболизма ксенобиотиков (лекарственных препаратов, бытовых и промышленных ядов). Процессы фер-

ментативного ацетилирования арилгидразинов и ариламинов – как у прокариот, так и у эукариот – осуществляются с помощью NAT.

У человека известно три гена NAT, один из которых является псевдогеном. Два экспрессирующихся гена *NAT1* и *NAT2* расположены на одной хромосоме и кодируют N-ацетилтрансферазу-1 (*NAT1*) и N-ацетилтрансферазу-2 (*NAT2*), которые имеют 81% идентичности, и оба проявляют генетический полиморфизм. В настоящее время известно четыре изоформы NAT: *NAT1*, *NAT2*, *NAT3*, *NAT4* соответственно. У изоформ *NAT1* и *NAT2* было обнаружено большое разнообразие аллельных вариантов [1]. Данные об аллельном полиморфизме генов *NAT1* и *NAT2* позволили выделить в человеческой популяции носителей мутаций, обладающих фенотипом мед-

ленных и быстрых ацетиляторов [2]. Соотношение «быстрых» и «медленных» ацетиляторов значительно варьирует в популяциях с различным этническим и географическим происхождением.

Также установлена ассоциация полиморфизма гена *NAT2* с различными заболеваниями и различной чувствительностью к лекарственным препаратам [4]. Так, например, наличие «медленного» фенотипа ацетилирования является фактором риска развития рака молочной железы и рака мочевого пузыря. Кроме того, генетический полиморфизм *NAT2* может определять токсикологическое и фармакологическое действие лекарственных препаратов, которые подвергаются N-ацетилированию посредством данного фермента [3]. Например, «медленные» ацетиляторы характеризуются более продолжительным фармакологическим эффектом и, в то же время, обнаруживают повышенную чувствительность к некоторым лекарственным препаратам и побочным иммуноотоксическим эффектам ариламинов и гидразинов.

Процессы ацетилирования N-ацетилтрансферазами сосредоточены главным образом в печени, но также этот фермент обнаруживают в легких, толстом кишечнике, почках, мочевом пузыре и даже в головном мозге.

Оба фермента играют важную роль в нейтрализации ксенобиотиков, катализируя перенос ацетильной группы с ацетил-кофермента А (ацетил CoA) на концевой атом азота арилгидразинов и арилзамин-содержащих лекарственных препаратов и канцерогенов. Типичными примерами лекарственных средств, подвергающихся катаболизму N-ацетилтрансферазами, являются сульфанила-

миды, противотуберкулёзные средства, транквилизаторы, психостимуляторы и многие другие. Число новых субстратов NAT постоянно растёт. Единственным известным на сегодняшний день эндогенным субстратом *NAT1* является п-аминобензоилглутамат – продукт катаболизма фолиевой кислоты.

Активность ферментов NAT может быть управляема субстратоспецифичными агентами (селективно для *NAT1* и *NAT2*) в каскадах реакций ацетилирования субстратов, приводящих к ацетилированным промежуточным интермедиатам и конечным метаболитам. Ингибирующее действие на фермент определяется фермент-субстратной реакцией и зависит от аффинности связывания с активным центром фермента ковалентными или нековалентными взаимодействиями.

Считается, что *NAT2* обладает меньшей специфичностью и метаболизирует более широкий круг веществ, чем и привлекает наше внимание.

Подробное изучение субстратной специфичности и лекарственной биоактивации, как и другие исследования, требуют большого количества очищенного NAT. Первоначально этот фермент получали из животных источников, но из человеческих и животных тканей получать *NAT2* в достаточном объёме невозможно.

Целью исследования стала разработка методологии и оптимизация условий получения рекомбинантного *NAT2* человека в растворимом биологически активном виде в достаточном количестве для дальнейших исследований.

Материалы и методы

В работе по получению рекомби-

нантного белка N-ацетилтрансферазы-2 человека (*hNAT2*) были использованы следующие методы:

- молекулярное клонирование фрагмента гена *NAT2*;
- моделирование и конструирование экспрессионного вектора;
- трансформация компетентных клеток, отбор клонов;
- выращивание культуры в селективных условиях;
- выделение и очистка целевого белка.

В качестве реципиентных клеток использовали бактерии *E. Coli* компании «NewEnglandBioLabs». Генотип штамма: *fhuA2 Δ(arg-lacZ)U169 phoAglNv44 φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1*

endA1 thi-1 hsdR17. Штамм с чувствительностью к ампициллину, канамицину, стрептомицину, спектиномицину, тетрациклину, хлорамфениколу и нитрофурантиону.

Для экспрессии *hNAT2* в бактериальной культуре была сконструирована экспрессионная плаزمида (рис. 1).

Плазмида pET-30 (b) *hNAT2* сконструирована с целью выделения нативного белка *NAT2* совместно со всем пулом бактериальных белков *E. Coli* и последующего очищения с помощью гель-хроматографии. Для этого вектор *NAT2* клонировали в полилинкер по сайтам рестрикции KpnI и BamHI под контроль экспрессии лактозного оперона. Также плазмида несёт селективный маркер-ген устойчивости к канамицину.

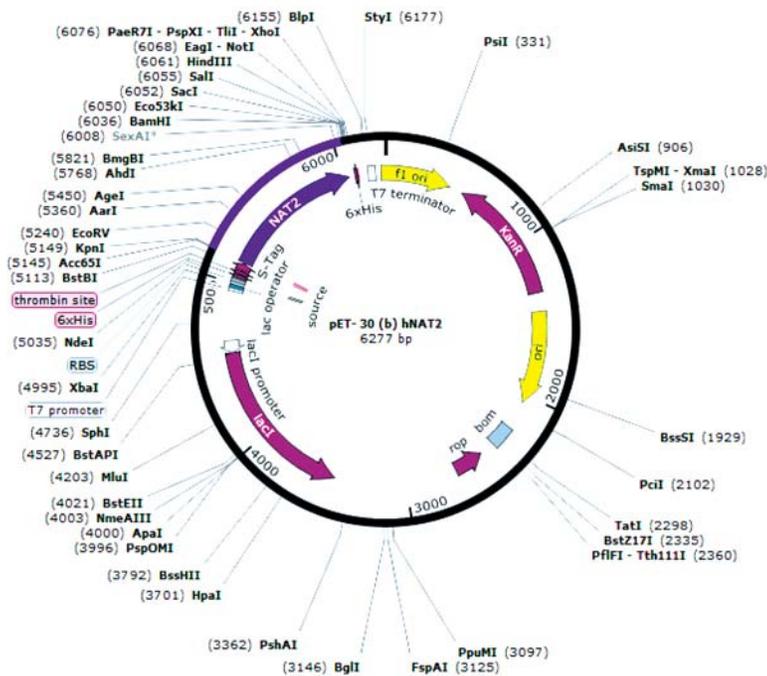


Рис. 1. Кольцевая карта плазмиды pET-30 (b), содержащая цельноразмерный ген *hNAT2*, 887 п.о. (фиолетовый цвет). Показаны основные рестриктазы, для которых имеются сайты узнавания на плазмиде.

Работа выполнена совместно с ЗАО «Евроген».

Следующим этапом работы являлась трансформация клеток экспрессионной плазмидой. Для этого использовали метод нагрева-оттаивания. Бактериальные клетки (100 мкл) в смеси с рекомбинантной плазмидой (5 мкг/мл) подвергали непродолжительному нагреву на водяной бане при 42°C в течение 1 мин, затем последующему выдерживанию во льду в течение 5 мин и инкубированию при 37°C в течение 1 ч с добавлением питательной среды SOC до конечного объёма 1 мл.

После стадии восстановления клетки разводят в 100 раз средой SOC и высевают либо на твёрдую среду, содержащую антибиотик, агарозу и индуктор экспрессии, либо в жидкую среду, также содержащую антибиотик и индуктор экспрессии. Бактериальные клетки культивируют при температуре 37°C.

Выбор индуктора и его оптимальная концентрация была найдена в следующем эксперименте. В культуры трансформированных клеток были добавлены

два индуктора IPTG и лактоза в разных концентрациях (рис. 2), культивирование проходило 16 ч, после чего была замерена оптическая плотность (OD_{600}) во всех образцах (Multiscan GO, Thermo Scientific).

По результату эксперимента в качестве индуктора было решено использовать IPTG с концентрацией 0,1 mM.

Бактериальные клетки культивировали при 37°C и непрерывном перемешивании до $OD_{600}=0,8-1$. Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3700 об/мин в течение 10 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в буфере TBS (6,06 гТрис и 8,76 гNaCl). Процедуру повторяли 3 раза, с каждым разом уменьшая объём отмывочного буфера. Пробирки с клетками помещали в ледяную баню и обрабатывали ультразвуком в течение 3 мин. Затем центрифугировали образцы на максимальной скорости при 4°C, супернатант отбирали и замораживали.

Далее из клеточного лизата выделяли плазмидную ДНК и белковую

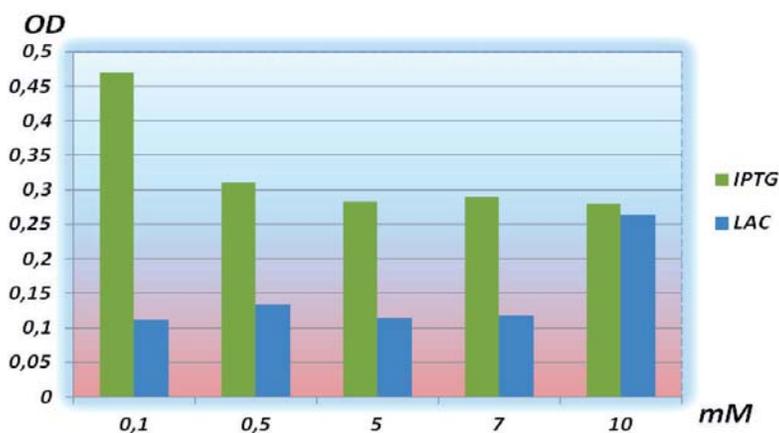


Рис. 2. Зависимость оптической плотности бактериальных клеток в жидкой питательной среде от концентрации индуктора (лактозы и IPTG).

фракцию. Выделение плазмидной ДНК проводили двумя независимыми способами: методом щелочной экстракции и с помощью набора «ДНК-Сорб» («АмплиСенс»). Для выделения бактериальных плазмид методом щелочной экстракции готовили растворы буферов для ресуспендирования и лизиса. Вторым методом выделения бактериальной плазмиды был осуществлён с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб» («АмплиСенс») в соответствии с протоколом производителя.

Измерение концентрации суммарной ДНК проводили на флуориметре Quibit 3,0 LifeTechnologies в соответствии с протоколом производителя. После процедуры выделения плазмидной ДНК концентрация ДНК в образцах, выделенных по протоколу щелочной экстракции, составила 19680 нг/мл и 53600 нг/мл по протоколу набора «ДНК-Сорб».

Для оценки уровня экспрессии гена *hNAT2* и локализации белка из лизированных клеток выделяли белковую фракцию. Для этого лизат центрифугировали при 4000 об/мин для отделения растворимой фракции от фракции, содержащей белок в тельцах включений, и подвергали очистке на мембранном катридже 30 кДа.

Для визуализации качественного и количественного состава белковой фракции образцы наносили на 12% гель для белкового электрофореза в системе ДСД-ПААГ (Mini-Protean Tetra, «Bio-Rad»).

Оценку количественного состава белковых фракций на геле проводили с помощью программы ImageLab («Bio-Rad») в соответствии с интенсивностью представленных полос белковых компонентов на электрофореграмме.

Результаты исследований

Электрофореграммы разделения белкового пула представлены на рис. 3 и 4.

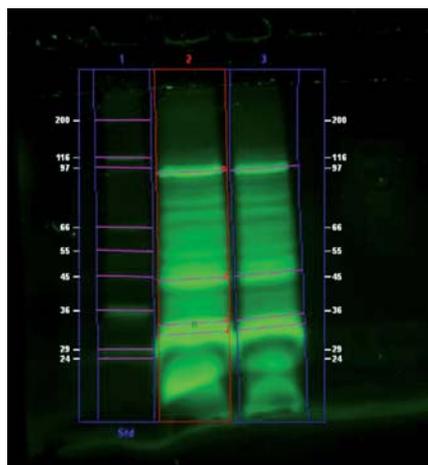


Рис. 3. Анализ продукции белка *hNAT2* методом электрофореза в полиакриламидном геле. Детекция в камере Gel/ChemiDoc («Bio-Rad»). 1-я дорожка – маркеры молекулярных масс; 2-я,3-я дорожки – неочищенная на мембране растворимая фракция белков после лизирования бактериальных клеток *E. Coli*.

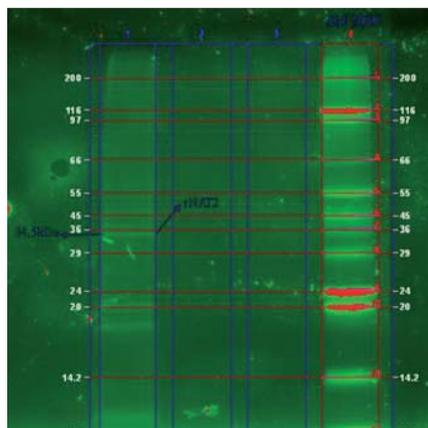


Рис. 4. Анализ продукции белка *hNAT2* методом электрофореза в полиакриламидном геле. Детекция в камере Gel/ChemiDoc («Bio-Rad»). 1-я дорожка – очищенная на мембране 10 кДа фракция белка клеток *E. coli*; 2-я, 3-я дорожки – без нагрузки образцами; 4-я дорожка – маркеры молекулярных масс.

Область молекулярной массы целового белка *hNAT2* имеет выраженную интенсивность флуоресценции и выделена в области 34-35 кДа.

Из 6,29 г бактериальной культуры удалось выделить белковую фракцию с концентрацией 3,14 мг/мл общего белка.

Анализ белковой фракции *hNAT2* электрофорезом в полиакриламидном геле показал, что очищенная фракция была неоднородна по составу и содержала набор белков с молекулярной массой ~45 кДа, ~20 кДа, ~17 кДа, ~10 кДа.

Выводы

В ходе исследования по разработке методологии и оптимизации условий получения рекомбинантного *NAT2* человека найдены оптимальные параметры наработки фермента в растворимой форме и достаточном количестве для биоаналитических *in vitro* экспериментов.

Данные результаты позволят использовать рекомбинантный фермент *hNAT2* в серии постановок для оценки сравнительной ферментативной активности *in vitro*, а также проводить сравнительную оценку активности видоспецифичных

выделенных ферментов NAT-семейства лабораторных животных (мыши, крысы, мини-свиньи) с активностью полученного рекомбинантным способом фермента *NAT2* человека.

Предварительно очищенная методами препаративной гель-проникающей и металл-аффинной хроматографии белковая фракция *hNAT2* позволит проводить скрининговую оценку молекул-кандидатов в последующих исследованиях регуляции активности *NAT2* человека (ингибиторов, активаторов).

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных // Биомедицина. 2014. № 2. С. 4-16.
2. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. - М.: Реафарм. 2004. 144 с.
3. Grant D.M., Blum M., Meyers U.A. Polymorphisms of N-acetyltransferase genes // Xenobiotica. 1992. № 22. P. 1073-1081.
4. Hein D.W. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis // Mutation Research. 2002. № 506-507. P. 65-77.

Development of methodology for production of a soluble form of recombinant human N-acetyltransferase-2

M.S. Dulya, E.D. Shevchenko, N.V. Petrova

The paper presents the development of a methodology and optimization of recombinant N-acetyltransferase-2 of human (*hNAT2*), found the optimal parameters of use of the enzyme in a soluble form and in sufficient quantity for the *in vitro* bioanalytical experiments. Presents data on the design of genetic constructs for efficient expression of recombinant enzyme human N-acetyltransferase 2, by the method of SDS-PAGE electrophoresis confirmed the molecular weight of the protein (34-35 kDa), indicated quantitative content of enzyme (3.14 mg/ml).

Key words: N-acetyltransferase-2 (NAT2), enzyme, method of SDS-PAGE electrophoresis, human.

Регенерация гепатопанкреаса речных раков после трансплантации клеток костного мозга мышей-доноров

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

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

² – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства», Московская область

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

Эксперимент показал успешную регенерацию гепатопанкреаса речных раков после ксенотрансплантации им стволовых клеток мышей-доноров.

Ключевые слова: стволовые клетки, гидробионты, речные раки, гепатопанкреас.

Введение

Регенеративная терапия с использованием своих или чужих стволовых клеток на сегодняшний день уже стала реальностью. Выявлено, что стволовые клетки обладают высокой миграционной и регенеративной способностью. Принцип действия стволовых клеток заключается в их уникальных свойствах: стимулирование ангиогенеза, способность к практически бесконечному воспроизведению себе подобных, возможность дифференцироваться в зависимости от микроокружения.

В основном, источником стволовых клеток является костный мозг и пуповинная кровь. Проллиферативный потенциал эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и способность к дифференцировке делает их уникальными. Вместе с ЭСК появилась возможность изучения процессов дифференцировки клеток на ранних этапах развития эмбрионов, внесения генетических изменений в развивающийся организм, создания модель-

ных животных для разработки методов лечения различных заболеваний. Впервые эмбриональные стволовые клетки человека были получены в работе [10]. Дифференцированные производные ЭСК человека могут быть использованы для восстановления функциональности тканей при широком спектре заболеваний, связанных с утратой клетками возможности нормально функционировать. Сюда относятся нейродегенеративные заболевания, повреждения ЦНС, заболевания сердца, диабет и другие [7, 9, 3].

Выявлено, что у беспозвоночных животных с бесполом размножением стволовые клетки тотипотентны и, тем самым, подобны половым. Подобны их общая морфология, включая и ультраструктурный уровень (герминальные тела), экспрессия гена *vasa*, активность щелочной фосфатазы и, вероятно, теломеразная активность, обеспечивающие тотипотентность и потенциальное бессмертие этих клеток. Активность теломеразы показана для самообновляющихся

клеток колониальной асцидии *Botryllus schlosseri* [5, 6]. Получены свидетельства общности и эволюционного консерватизма морфологических и функциональных характеристик тотипотентных стволовых клеток представителей различных таксонов многоклеточных животных: книдарии, турбеллярии, корнеголовые ракообразные и млекопитающие [8, 4, 1].

Целью нашей работы являлось моделирование патологии у альтернативных биомоделей – беспозвоночных гидробионтов, выявление возможности межвидовой трансплантации клеток костного мозга (ККМ) мышей пойкилотермным гидробионтам, а также коррекция патологии гепатопанкреаса речных раков с помощью стволовых клеток.

Решение проблемы межвидовой трансплантации стволовых клеток систематически отдаленных видов позволит в перспективе найти другие источники стволовых клеток, такие как циркулирующие жидкости пойкилотермных гидробионтов.

Материалы и методы

Объектами настоящего эксперимента являлись длиннопалые речные раки *Pontastacus leptodactylus*.

Раки содержались в аквариумах объемом 160 л, с принудительной аэрацией и водоочисткой. Температура воды находилась в пределах 16-17°C; pH – 6,9-7,1. Кормление раков производилось личинками хирономид по поедаемости.

Мечение раков проводили лаком для ногтей (рис. 1).



Рис. 1. Речной рак с метками на карапаксе.

Раки были распределены на 4 группы (см. табл. 1).

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных – 30-40 мин). Исследовали жизнеспособность клеток гемопоэтической и стромальной фракций 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 (1 мл и 2 мл) 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 рас-

Таблица 1

Группы речных раков в эксперименте

Группа 1 n=7	Группа 2 n=12	Группа 3 n=12	Группа 4 n=12
Интактный контроль	Без патологии	С искусственно вызванной патологией гепатопанкреаса (однократное введение Аллоксана в дозе 50 мг/кг)	
	Введение стволовых клеток в дозе 10 млн ККМ	Без введения ККМ	

чета 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 НЕРЕС; 0,58 г/л глутамина; 100 мкг/л гентамицина; 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA); 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO₂-инкубаторе, атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности в течение 3-х суток [2].

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 мышей-доноров вводилась в вентральный синус речных раков в дозе 8-10 млн ККМ на 15-е сутки после создания модели патологии гепатопанкреаса.

Вскрытие опытных объектов производилось под хлороформным наркозом на 7-й, 14-й и 21-й дни после введения ККМ.

Индекс гепатопанкреаса рассчитывали как отношение массы органа к массе тела и выражали в процентах.

Гистологические исследования проводили с помощью цифровой микроскопии препаратов, которые готовили следующим образом. 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.

Результаты и их обсуждение

На 9-14-й день после введения аллоксана (группы 3 и 4) погибли 4 рака (1 самец и 3 самки). Консистенция гепатопанкреаса – от плотной до дряблой, цвет светло-коричневый или желто-коричневый (рис. 2А, Б).

При плановом вскрытии раков (рис. 2В, Г) обнаружено, что цвет гепатопанкреаса в разных группах был различным. Индексы гепатопанкреаса в опытных группах не имели достоверных отличий от контроля (табл. 2).



Рис. 2. Вскрытие речных раков. А – самка, гонады буро-серого цвета; Б – самка, гепатопанкреас желто-коричневый; В – самка, гонады светло-коричневые, гепатопанкреас болотно-зеленого цвета; Г – самец, гонады белые, гепатопанкреас коричневый.

Показатели гепатопанкреаса в эксперименте

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Цвет органа	Зелено-серый	Зелено-серый	Темно-зеленый, коричневатый, в одном случае с желтоватыми очагами	Темно-зеленый, иногда с черными очагами или ярко-желтый
Индекс, %	4,24±1,06	4,26±1,64	4,34±0,20	4,19±0,14

Гистологические исследования показали, что при моделировании патологии аллоксаном в дозе 50 мг/кг в гепатопанкреасе речных раков происходят следующие изменения: усиление вакуолизации R-клеток, местами некроз групп этих клеток вплоть до некроза единичных трубочек. F- и B-клетки просматриваются плохо, либо вообще не дифференцируются; инфильтра-

ция гемоцитами интертубулярной стромы (от незначительной до умеренной). Отек стромы (от умеренного до выраженного). На 14-е сутки после введения аллоксана гепатопанкреас представлен отдельно расположенными трубочками, выстланными уплощенными эпителиальными клетками, просвет резко расширен, заполнены густым секретом (рис. 3).

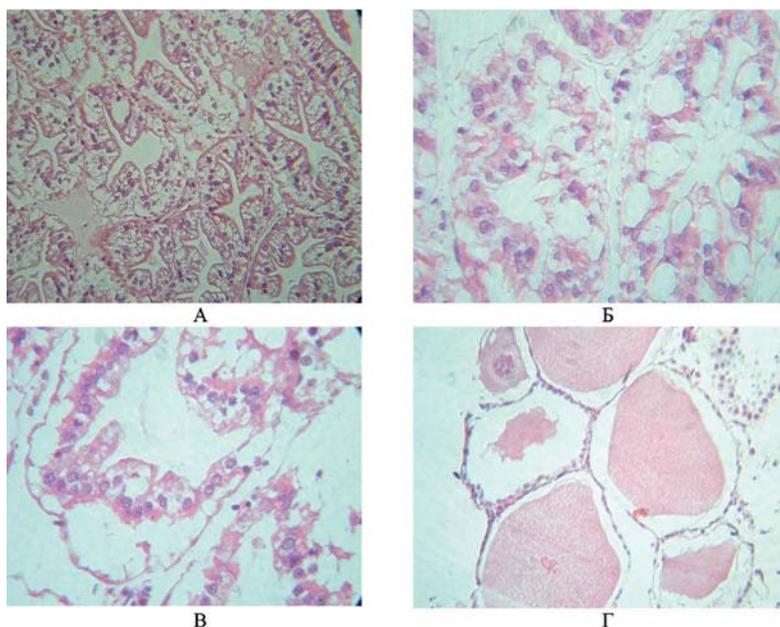


Рис. 3. Гистологические исследования.

А – выраженная вакуолизация R-клеток, снижение количества B-клеток, отек интратубулярной стромы. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x200.

Б – вакуолизация R-клеток, местами разрушение стенок B-клеток. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x400.

В – выраженная вакуолизация R-клеток, B-клетки единичные, отек интратубулярной стромы. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x400.

Г – гепатопанкреас рака на 14-е сутки после введения аллоксана. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x200.

Регенерация

После введения стволовых клеток речным ракам (через 14 суток) мы наблюдали картину восстановления гепатопанкреаса: вакуолизация цитоплазмы R-клеток уменьшалась (большинство вакуолей мелкие). Форма и положение ядра не изменены. Местами отек (от незначительного до умеренного) интертубулярной стромы с неравномерно выраженной, преимущественно незначительной инфильтрацией рыхло расположенными гемоцитами. F-клетки просматриваются плохо. Просветы трубочек в большинстве полей зрения свободны (рис. 4).

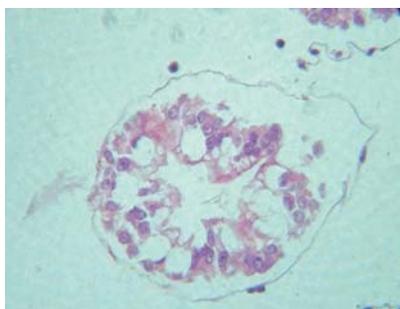


Рис. 4. Признаки регенерации патологически измененного гепатопанкреаса речного рака. Снижение вакуолизации R-клеток (снижение как количества, так и величины вакуолей). В-клетки хорошо просматриваются, их количество не уменьшено. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x400.

Заключение

Таким образом, после введения клеток костного мозга мышей в организме речных раков с искусственно вызванной аллоксаном патологией происходит восстановление гепатопанкреаса.

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. *Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Кapanадзе Г.Д., Ревякин А.О., Денгина С.Е.* Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // Биомедицина. 2011. № 2. С. 30-34.
3. *Прыжкова М.В., Лазарькова М.А.* Стволовые клетки: современные тенденции исследований // Онтогенез. 2004. № 6. Т. 35. С. 473-475.
4. *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.). P. 752.
5. *Federico Quaini M.D., Konrad Urbanek M.D., Antonio P., Beltrami M.D., Nicoletta Finato M.D., Carlo A. Beltrami M.D., Bernardo Nadal-Ginard M.D., Ph.D. Jan Kajstura Ph.D. Annarosa Leri M.D., Piero Anversa M.D.* Chimerism of the Transplanted Heart // N. Engl. J. Med. 2002; 346:5-15.
6. *Laird D.J., Weissman I.L.* Telomerase maintained in self-renewing tissues during serial regeneration of the urochordate *Botryllus schlosseri* // Develop. Biol. 2004. Vol. 273. P. 185-194.
7. *Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001. 414: 105-111.
8. *Rybakov A.V., Shukalyuk A.I.* Thylacoplethus 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.
9. *Stojkovic M., Lako M., Strachan T., Murdoch A.* Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells // Reproduction. 2004. N. 128. P. 259-267.
10. *Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. 1998. N. 282. P. 1145-1147.

Regeneration hepatopancreas of crayfish after transplantation of stem cells from mice-donors

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

The experiment showed successful regeneration of hepatopancreas of crayfishes after a xenotransplantation of stem cells from mice-donors.

Key words: stem cells, hydrobionts, crayfishes, hepatopancreas.



Сравнительный анализ однонуклеотидного полиморфизма гена *IL28B* у больных гепатитом С русских и тувинцев

Л.И. Николаева¹, Е.А. Лейбман^{1,2}, А.Е. Гришечкин¹, Г.В. Сапронов³,
В.А. Кичатова⁴, Т.В. Кожанова⁴, К.К. Кюрегян⁴, М.И. Михайлов⁴,
А.А. Сарыглар⁵

¹ – ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

² – ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва

³ – ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», Москва

⁴ – ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва

⁵ – ГУЧ «Инфекционная больница» Министерства здравоохранения Республики Тыва, г. Кызыл

Контактная информация: д.б.н. Николаева Людмила Ивановна, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16; тел.: (499)190-30-50; e-mail: L.I.Nikolaeva@mail.ru

Целью исследования явилось определение прогностически значимых для стандартной двойной терапии однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) около гена *IL28B* по двум локусам rs12979860 (C>T) и rs8099917 (T>G) у пациентов с хроническим гепатитом С русской (европеоиды) и тувинской (монголоиды) национальности. Определение ОНП выполняли методом ПЦР в режиме реального времени. В локусе rs12979860 достоверно чаще у тувинцев выявлялся С-аллель, а у русских – Т-аллель ($p=0,0466$). Статистически значимых различий по Т- и G-аллелям локуса rs8099917 не выявлено. Генотип С/С по локусу rs1297960 достоверно чаще определялся у тувинцев ($p=0,0231$), а генотип С/Т – у русских ($p=0,0425$). Генотип Т/Т по локусу rs8099917 достоверно чаще выявляется у тувинцев ($p=0,0259$), а генотип Т/G – у русских ($p=0,0188$). С учетом двух полиморфных локусов, у тувинских пациентов достоверно чаще ($p=0,0203$) выявлялся генотип С/С (rs12979860) – Т/Т (rs8099917), что дает лучший прогноз на успешное завершение терапии.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, ген *IL28B*, гепатит С, этногенетические различия.

Введение

До настоящего времени гепатит С остается одной из актуальных проблем гепатологии во всем мире. В нашей стра-

не сохраняются относительно высокими показатели впервые диагностированного хронического гепатита С (ХГС). В 2000 г. было выявлено 22,2 случая ХГС

на 100 тыс. населения, в 2014 г. – 39,94 случаев [5]. Специфическая терапия гепатита С в последние годы совершенствуется, появились препараты прямого противовирусного действия. Однако в нашей стране пока наиболее доступна двойная терапия пегилированным интерфероном-альфа-2а/б в сочетании с рибавирином. Применение такой терапии позволяет достичь устойчивого вирусологического ответа (УВО) у 50-60% пациентов с ХГС с небольшими колебаниями в зависимости от генотипа вируса [1]. Известно, что не только генотип вируса влияет на достижение УВО, но и генетические факторы пациента, среди которых наиболее значимым для больных гепатитом С является однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) около гена интерлейкина-28В (*IL28B*).

В 2009 г. три независимые группы исследователей при проведении полногеномных исследований установили ассоциацию полиморфизма около гена *IL28B* в локусе rs12979860 (С>Т), который расположен выше промоторной области гена, с достижением УВО при двойной терапии пациентов с ХГС [7, 13, 14]. Генотип С/С в этом локусе в 2 раза чаще встречался у пациентов, достигших УВО. Генотипы С/Т и Т/Т достоверно чаще обнаруживались у лиц, не достигших УВО. Вскоре Я. Танака (Y. Tanaka) и соавт. установили для больных ХГС из Японии, а В. Сяппиах (V. Supriah) и соавт. – для пациентов из Европы, что еще один ОНП около гена *IL28B* в локусе rs8099917 (Т>G), расположенном ниже гена, влияет на эффективность двойной терапии [13, 14]. Возможно, что последний полиморфизм несколько большую роль играет у пациентов монголоидного происхождения

[14, 12]. Установлена также связь генотипа С/С в локусе rs12979860 с самопроизвольной элиминацией вируса гепатита С (ВГС) при острой инфекции у европейцев и афроамериканцев [15].

Д.Л. Томас (D.L. Thomas) и соавт. выявили закономерность распространения С- и Т-аллелей (локус rs12979860) у здоровых людей по континентам [15]. Чаще всего генотип С/С встречается у жителей Восточной Азии, почти в 2 раза реже он определяется у коренных жителей Африки. Промежуточное положение по частоте обнаружения аллельной пары С/С занимают коренные жители Европы и Америки.

Ген *IL28B* локализован в 19-ой хромосоме в зоне 19q13.13 [7]. Он кодирует недавно открытый интерферон-λ3 (ИФН-λ3), который по многим биологическим эффектам похож на интерферон-α (ИФН-α). Установлено, что ИФН-λ3 ингибирует репликацию ВГС в зависимости от дозы и времени воздействия, усиливает экспрессию генов *ISG* (interferon stimulated genes) и повышает противовирусную активность ИФН-α [11]. На поверхности клеток ИФН-λ3 взаимодействует со своим специфическим рецептором IFNλR1 и стимулирует противовирусный путь JAK-STAT, который приводит к активации генов *ISG* [11, 6]. Молекулярный механизм влияния отдельных генотипов в локусах rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B* на элиминацию ВГС пока дискутируется [6, 16]. Недавно выявлен еще один полиморфный локус около гена *IL28B*, значение которого изучается [8].

Данные по особенностям распространения отдельных генотипов по локусам rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B* у жителей нашей страны и паци-

ентов больных ХГС с учетом этноса малочисленные и представлены публикациями, где исследовали небольшие группы людей [15, 2-4].

Учитывая прогностическую роль отдельных аллельных вариантов полиморфных локусов гена *IL28B* для оценки эффективности двойной терапии ХГС, в данной работе были установлены частоты встречаемости различных аллелей, аллельных пар и гаплотипов в группах русских (европеоиды) и тувинских (монголоиды) пациентов с ХГС.

Материалы и методы

Группа пациентов с ХГС русской национальности была представлена 122 взрослыми (средний возраст – $39,07 \pm 2,05$ лет) и 23 детьми (средний возраст – $9,54 \pm 1,01$ лет). Доля лиц мужского пола – 43,1%, доля женского – 56,9%. Группу пациентов тувинской национальности составили 161 взрослый человек, средний возраст – $47,2 \pm 1,9$ лет. Доля лиц мужского пола составила 31,2%, доля женского – 68,8%. В обеих группах преобладали женщины. Принадлежность к русской или тувинской национальности определяли по паспортным данным пациента и национальности родителей. Пациенты из группы русской национальности проживали в г. Москва, группы тувинской национальности – в г. Кызыл.

В больницах, где выполняли забор крови, были соблюдены этические требования, было получено разрешение этических комитетов на проведение данного исследования. Пациенты, родители или опекуны были информированы о цели забора крови и дали согласие на проведение генетических анализов.

ДНК из цельной крови пациентов

выделяли, используя набор реактивов «Проба-рапид-генетика» («ДНК-технология», Россия). ДНК из сухой капли крови (для пациентов из Тувы) выделяли, используя набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I с помощью автоматической станции MagNa Pure Compact («Roche Diagnostics GmbH», Германия). Первичный внешний лизис сухой капли с диска фильтровальной бумаги диаметром 1 см проводили с помощью буфера MagNa Pure DNA Tissue Lysis Buffer («Roche Diagnostics GmbH», Германия) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем лизаты загружали в автоматическую станцию и проводили выделение ДНК по протоколу производителя.

Генотипы пациентов по двум локусам rs12979860 и rs8099917 устанавливали методом ПЦР в режиме реального времени, используя методику и набор реактивов «Иммуногенетика IL28B», а также детектирующий амплификатор ДТлайт от производителя «ДНК-технология» (Россия).

Достоверность различий ($p < 0,05$) в группах пациентов устанавливали с помощью критерия хи-квадрат, используя пакет программ Statistica 10 (StatSoft, Inc. Tulsa, USA).

Результаты и их обсуждение

Распределение С- и Т-аллелей по локусу rs12979860 и Т- и G-аллелей по локусу rs8099917 гена *IL28B* в двух группах пациентов представлено на рис. 1. С-аллель локуса rs12979860 достоверно чаще определялся у тувинцев ($p = 0,0466$; $\chi^2 = 3,96$), а Т-аллель – у русских пациентов ($p = 0,0466$; $\chi^2 = 3,96$). Достоверных различий в частоте обнаружения Т- и

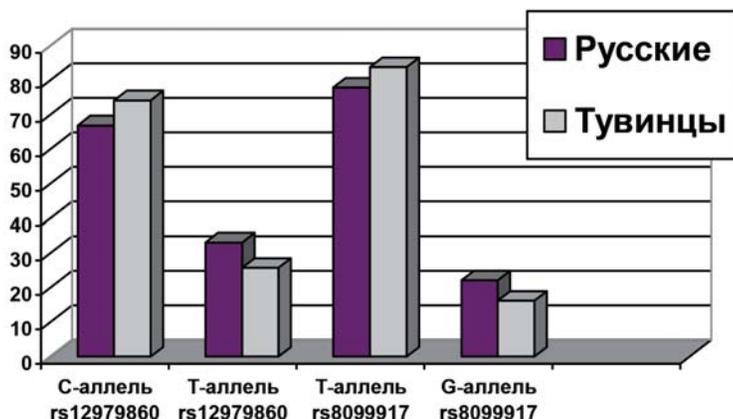


Рис. 1. Частота обнаружения С- и Т-аллелей в локусе rs12979860 и Т- и G-аллелей в локусе rs8099917 в сравниваемых группах русских и тувинцев.

G-аллелей по локусу rs8099917 не установлено. Ранее показано преобладание С-аллеля в локусе rs12979860 у коренных жителей Азии [15], к которым также относятся тувинцы, этнически очень близкие монголам. Однако данных по частоте выявления С-аллеля ни у монголов, ни у тувинцев пока не опубликовано. В одной из первых публикаций в 2009 г. по 32 образцам от русских людей (восточные славяне) определена частота С-аллеля в 64,1% [15]. В нашем исследо-

вании она составила 66,9%. У коренных жителей Польши (западные славяне) распространенность С-аллеля составила 68,2% [9]. По данным Д.Л. Томаса и соавт., у коренных жителей Южной Кореи, Китая и Японии доля С-аллеля составляет более 90,5% [15], что выше, чем у тувинцев в нашем исследовании.

Распределение аллельных пар по двум полиморфным локусам гена *IL28B* у пациентов русской и тувинской национальности представлено в таблице.

Таблица
Частота встречаемости отдельных аллелей в локусах rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B* у пациентов русской и тувинской национальности

Генотипы (локус)	Тувинцы (n=161)	Русские (n=145)	Величины p (хи-квадрат)
C/C (rs12979860)	57,14 (n=92)	44,14 (n=64)	p=0,0231 (5,16)
C/T (rs12979860)	34,16 (n=55)	45,52 (n=66)	p=0,0425 (4,12)
T/T (rs12979860)	8,70 (n=14)	10,34 (n=15)	p=0,0623 (0,24)
T/T (rs8099917)	72,05 (n=116)	60,00 (n=87)	p=0,0259 (4,96)
T/G (rs8099917)	23,60 (n=38)	35,86 (n=52)	p=0,0188 (5,52)
G/G (rs8099917)	4,35 (n=7)	4,14 (n=6)	p=0,0927 (0,01)

У тувинцев достоверно чаще определялись генотипы С/С в локусе rs12979860 и Т/Т в локусе rs8099917. У русских пациентов преобладали генотипы С/Т и Т/Г в этих же локусах. Преобладание гетерозиготных генотипов по данным локусам ранее было обнаружено у здоровых лиц и больных пациентов европеоидного происхождения по сравнению с пациентами монголоидного происхождения, проживающими в г. Санкт-Петербург, Иркутск и Улан-Удэ [3, 2].

Статистически достоверных различий в частоте обнаружения отдельных гаплотипов в сравниваемых группах пациентов не обнаружено. Наиболее часто определялся гаплотип С (rs12979860) – Т (rs8099917). У тувинцев его доля составила 78,24% и у русских – 71,84%. Следующим по частоте обнаружения был гаплотип Т (rs12979860) – Т (rs8099917): у русских он составил 17,48% и у тувинцев – 13,36%. Два других гаплотипа Т (rs12979860) – G (rs8099917) и С (rs12979860) – G (rs8099917) вы-

являлись с невысокой частотой: 6,87% (тувинцы) и 8,74% (русские); 1,53% (тувинцы) и 1,94% (русские) соответственно. Следует отметить высокое выявление рекомбинантного гаплотипа Т (rs12979860) – Т (rs8099917) по сравнению с другим рекомбинантным гаплотипом С (rs12979860) – G (rs8099917).

Частота обнаружения в двух группах больных различных вариантов генотипов по двум локусам гена *IL28B* представлена на рис. 2. Генотип С/С (rs12979860) – Т/Т (rs8099917) чаще определялся в группе тувинских пациентов ($p=0,0203$; $\chi^2=5,39$), а генотип С/Т-Т/Г – в группе русских пациентов ($p=0,0334$; $\chi^2=4,53$). Статистически значимых различий в частоте обнаружения других вариантов генотипов не обнаружено.

Учитывая более частое обнаружение генотипов С/С (rs12979860) – Т/Т (rs8099917) у тувинцев, следует ожидать большую вероятность достижения УВО при двойной терапии у этих пациентов, чем у больных ХГС, имеющих русскую

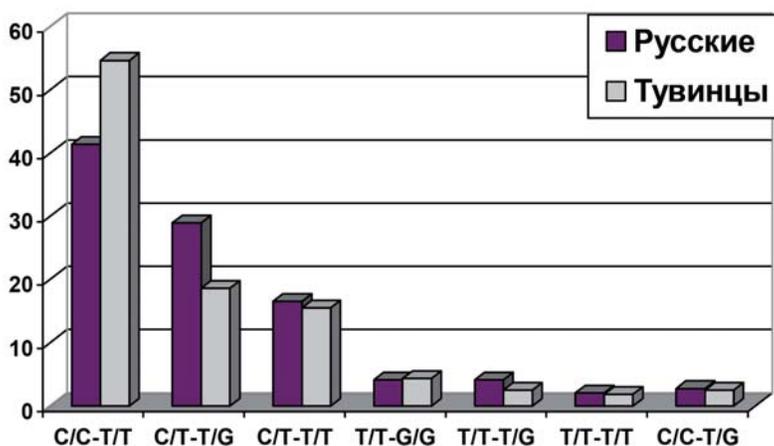


Рис. 2. Частота обнаружения различных вариантов генотипов с учетом двух полиморфных локусов гена *IL28B* в сравниваемых группах русских и тувинцев.

национальность. Однако достижение УВО определяется не только благоприятным генотипом по гену *IL28B*, но и зависит от ряда других факторов организма больного и свойств вируса: от длительности ХГС, возраста, стадии поражения печени и интенсивности мутирования вируса. Тем не менее, ряд исследователей предлагают рассматривать генотип C/C (rs12979860) - T/T (rs8099917) гена *IL28B* как независимый предиктор эффективности двойной терапии гепатита С [10].

Заключение

В группах русских и тувинских пациентов обнаружены различия в частоте выявления С- и Т-аллелей в локусе rs12979860 (C>T). В этом локусе в группе тувинцев достоверно чаще выявлялся С-аллель, а у русских – Т-аллель. Статистически значимых различий по Т- и G-аллелям локуса rs8099917 не обнаружено. Генотип C/C по локусу rs12979860 и вариант T/T по локусу rs8099917 достоверно чаще определялся у тувинцев, а генотип C/T и T/G в соответствующих локусах – у русских. С учетом двух полиморфных локусов, у русских пациентов достоверно чаще выявлялся генотип C/T (rs1297960) - T/G (rs8099917), а у тувинцев – C/C (rs1297960) - T/T (rs8099917), который чаще ассоциируется с достижением УВО при двойной терапии.

Список литературы

1. *Абдурахманов Д.Т.* Перспективы в лечении хронического гепатита С // Клиническая гепатология. 2010. № 15. С. 50-53.
2. *Арсентьева Н.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В.* Полиморфизм гена *IL28B* у здоровых и больных хроническим вирусным гепатитом С жителей Санкт-Пе-

тербурга // Сб. мат-лов конф. «Молекулярная диагностика-2014». – М. 2014. Т. 1. С. 120.

3. *Заматкина Л.Ф., Малов С.И., Суханова Е.В., Санжеева Д.Н., Хойкова О.Ч., Бимбаева Э.С.* Результаты исследования полиморфизма гена интерлейкина-28В при хроническом гепатите С // Сб. мат-лов конф. «Молекулярная диагностика-2014». – М. 2014. Т. 1. С. 136-137.
4. *Николаева Л.И., Колотвин А.В., Самоходская Л.М., Макашова В.В., Токмалаев А.К., Самохвалов Е.И., Альховский С.В.* Генетический полиморфизм и эффективность противовирусной терапии при хроническом вирусном гепатите С // Вестник Российского Университета дружбы народов. Серия «Медицина». 2012. № 2. С. 81-88.
5. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Российской Федерации [Электронный ресурс] / Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в Российской Федерации. – Режим доступа: <http://75.gospotrebnadzor.ru>, свободный. Загл. с экрана. – Яз. рус.
6. *Asselah T.J., Bieche I., Narguet S., Sabbagh A., Laurendeau I., Ripault M.P., Boyer N., Martinot-Peignoux M., Valla D., Vidaud M., Marcellin P.* Liver gene expression signature is predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C // Gut. 2008. V. 57. P. 516-524.
7. *Ge D., Fellay J., Thompson A.J., Simon J.S., Shianna K.V., Urban T.J., Heinzen E.L., Qiu P., Bertelsen A.H., Muir A.J., Sulkowski M., McHutchison J.G., Goldstein D.B.* Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance // Nature. 2009. V. 461. P. 399-401.
8. *Hiramine S., Sugiyama M., Furusyo N., Uto H., Ido A., Tsubouchi H., Watanabe H., Ueno Y., Korenaga M., Murata K., Masaki N., Hayashi J., Thomas D.L., Mizokami M.* A thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism near *IL28B* is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus // J. Gastroenterol. 2015. (PubMed information – до выхода в печать).
9. *Kaczor M.P., Seczyńska M., Szczeklik W., Sanak M.* *IL28B* polymorphism (rs12979860) associated with clearance of HCV infection in Poland: Systematic review of its prevalence in chronic hepatitis C patients and general popula-

- tion frequency // *Pharmacol. Rep.* 2015. V. 67. P. 260-266.
10. Li S., Hu P., Zhang Q.Q., Liu Y.H., Hu H.D., Zhang D.Z., Ren H. Single nucleotide polymorphisms of the IL28B and sustained virologic response of patients with chronic hepatitis C to PEG-interferon/ribavirin therapy: A meta-analysis: Meta-analysis of IL28B // *Hepat. Mon.* 2011. V. 11. P. 163-172.
 11. Marcello T., Grakoui A., Barba-Spaeth G., Machlin E.S., Kotenko S.V., MacDonald M.R., Rice C.M. Interferon alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics // *Gastroenterology.* 2006. V. 131. P. 1887-1898.
 12. Sinn D.H., Kim Y.L., Lee S.T., Gwak G.Y., Choi M.S., Lee J.H., Koh K.C., Yoo B.C., Paik S.W. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C virus in Asian patients // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. V. 26. P. 1374-1349.
 13. Suppiah V., Moldovan M., Ahlenstied G., Berg T., Weltman M., Abate M.L., et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. P. 1100-1104.
 14. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M., Matsuura K., Sakamoto N., Nakagawa M., Korenaga M., Hino K., Hige S., Ito Y., Mita E., Tanaka E., Mochida S., Murawaki Y., Honda M., Sakai A., Hiasa Y., Nishiguchi S., Koike A., Sakaida I., Imamura M., Ito K., Yano K., Masaki N., Sugauchi F., Izumi N., Tokunaga K., Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. P. 1105-1109.
 15. Thomas D.L., Thio C.L., Martin M.P., Qi Y., Ge D., O'Huigin C., Kidd J., Kidd K., Khakoo S.I., Alexander G., Goedert J.J., Kirk G.D., Donfield S.M., Rosen H.R., Tobler L.H., Busch M.P., McHutchison J.G., Goldstein D.B., Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus // *Nature.* 2009. V. 461. P. 798-801.
 16. Younossi Z.M., Bireddinc A., Ester M., Stepanova M., Afendy A., Baranova A. The impact of IL28B genotype on the gene expression profile of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha and ribavirin // *J. Translational Medicine.* 2012. V. 10. P. 25-35.

Comparative analysis of single nucleotide polymorphisms of gene *IL28B* in Russian and Tyvinian patients with hepatitis C

L.I. Nikolaeva, E.A. Leybman, A.E. Grishechkin, G.V. Saproinov,
V.A. Kichatova, T.V. Kozhanova, K.K. Kyuregyan, M.I. Mikhaylov,
A.A. Sarygлар

The aim of the study was to detect single nucleotide polymorphisms (SNP) near gene *IL28B* on locus rs12979860 (C>T) and locus rs8099917 (T>G), which are prognostically significant for standard dual therapy in patients with chronic hepatitis C of Russian (European) and Tyvinian (Mongoloid) ethnicity. The SNP were discovered by real-time PCA. The Tyvinian patients more frequency showed the C-allele, and Russian patients more frequency displayed T-allele (p=0.0466). There were no differences in T- and G-alleles on locus rs8099917. The Tyvinian patients more often showed genotype C/C (p=0.0231) and Russian patients more frequency displayed genotype C/T (p=0.0425) on locus rs1297960. Genotype T/T on locus rs8099917 significantly often detected in Tyvinian patients (p=0.0259) and genotype T/G more frequently detected in Russian patients (p=0.0188). When take in account two polymorphic loci, genotype C/C (rs12979860) – T/T (rs8099917) significantly often detected in Tyvinian patients (p=0.0203), this genotype is associated with more ability to get sustained virologic response.

Key words: single nucleotide polymorphisms, gene *IL28B*, hepatitis C, ethno-genetic differences.



Оценка безопасности длительного применения препарата КЛС-073 в качестве инкретиномиметика

И.Е. Макаренко¹, О.И. Авдеева², Г.В. Ванатиев^{1,2}, Н.М. Фаустова²,
И.Н. Уракова², О.Н. Пожарицкая², М.Н. Макарова², В.Г. Макаров²,
А.Н. Шиков^{1,2}

¹ – Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

² – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Ленинградская область

Контактная информация: Макаренко Игорь Евгеньевич, makarenko2909@gmail.com

В ходе данной работы было изучено влияние нового инкретиномиметика природного происхождения (ингибитор ДПП-4, препарат КЛС-073) на основные биохимические показатели при его длительном (12 мес.) применении. Эксперимент был проведен на беспородных лабораторных мышах обоего пола. Введение препарата осуществлялось на протяжении 12 мес. в трех дозах: высшей терапевтической (ВТД) (2 мг/кг), 5 ВТД (10 мг/кг) и 10 ВТД (20 мг/кг). В качестве критериев оценки использовали оценку общих биохимических и гематологических показателей, а также гистологическое исследование щитовидной и поджелудочной железы в динамике (31-й, 91-й, 181-й и 361-й дни). По результатам исследования не было выявлено отличий в биохимических показателях и строении щитовидной и поджелудочной желез интактных животных и животных, получавших исследуемый препарат КЛС-073.

Ключевые слова: дипептидидипептидаза 4, инкретиномиметики, КЛС-073, комплекс из гонад морских ежей, *S. Droebachiensis*.

Введение

Терапия, основанная на инкретинах, является перспективной для лечения сахарного диабета второго типа (СД 2) и метаболического синдрома. Несмотря на то, что данный класс соединений был открыт более 100 лет назад, их клиническое применение началось относительно недавно. Так, первый ингибитор дипептидилпептидазы четвертого типа (ДПП-4) (ситаглиптин) был зарегистри-

рован в качестве лекарственного средства только в конце 2006 г. [17]. Исходя из этого, в настоящее время недостаточно данных для проведения мета-анализа безопасности применения данных препаратов, что делает важной оценку их безопасности на животных моделях в условиях длительного применения.

Одним из основных типов терапии, основанной на инкретинах, является применение ингибиторов ди-

пептидилпептидазы четвертого типа (ДПП-4). ДПП-4 (ЕС 3.4.14.5; CD26) – сериновая протеаза, фермент, отвечающий за быструю инактивацию инкретиновых гормонов, в результате чего снижается их антидиабетическое действие.

Считается, что применение ингибиторов ДПП-4 может способствовать развитию онкологических заболеваний – в первую очередь, новообразований щитовидной железы [16], хотя в эксперименте это не доказано.

Поскольку ингибиторы ДПП-4 применяются пожизненно, особо важна оценка их профиля безопасности при долгосрочном применении.

В предыдущих исследованиях нами было установлено наличие у липидного экстракта гонад морских ежей (препарат КЛС-073) умеренного сахароснижающего и гипотензивного эффектов [9]. Данные эффекты обусловлены комплексным действием, в т.ч. и ингибированием ДПП-4 [3].

В связи с вышеизложенным, **целью** настоящего исследования явилось изучение основных биохимических показателей при длительном (12 мес.) применении инкретиномиметика (ингибитор ДПП-4, препарат КЛС-073).

Материалы и методы

Исследуемый препарат

Исследуемый препарат КЛС-073 – комплекс из гонад морских ежей *S. droebachiensis*, предварительно очищенных от балластных веществ смесью хлороформа и этанола, выделен экстракцией этанолом при комнатной температуре с последующим высушиванием. КЛС-073 содержит

природные биологически активные вещества в следующих количествах: сложные липиды, свободные жирные кислоты и стерины – 45-70%, из них фосфолипидов – 8-20%; пептидов и аминокислот – 25-40%; каротиноидов и токоферолов – около 2,0% [14, 15].

Дизайн исследования

Исследования были проведены на аутбредных мышах (самцах и самках) массой на начало исследования 18-22 г, полученных из питомника РАМН «Рапполово». Животные содержались в стандартных условиях вивария на полнорационном сбалансированном пищевом рационе для лабораторных животных. Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам [4, 1], Правилам надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009) и одобрены на заседании биоэтической комиссии Санкт-Петербургского института фармации.

Для проведения исследования животные были разделены на 4 экспериментальные группы по 40 особей обоего пола в каждой: 1-я группа – контрольная (животным вводилось плацебо (кукурузное масло)); 2-я группа – животные, получавшие исследуемый препарат КЛС-073 в высшей терапевтической дозе (ВТД) – 2 мг/кг; 3-я группа – препарат в дозе 5 ВТД – 10 мг/кг; 4-я группа – препарат в дозе 10 ВТД – 20 мг/кг.

Введение препарата осуществлялось внутривентрикулярно в первой половине дня на протяжении 12 мес., как это рекомендовано для препаратов, предназначенных для пожизненного применения

[4]. Объемы для введения соответствовали физиологическим для данного вида животных [2] и составили 25 мл/кг.

На 31-й, 91-й, 181-й и 361-й дни исследования 25% животных из каждой группы (по 10 каждого пола) подвергали эвтаназии. Эвтаназия осуществлялась с помощью CO₂-камеры. Непосредственно после эвтаназии у животных производился забор крови из сердца для проведения гематологических и биохимических исследований, при некропсии забирали щитовидную и поджелудочную железы для гистологического исследования.

Гематологические показатели определяли в цельной крови с антикоагулянтом на гематологическом анализаторе «ABACUS juniorvet» (Австрия).

Определяемые показатели: гемоглобин (г/дл); гематокрит (%); эритроциты (10¹²/л); лейкоциты (10⁹/л); гранулоциты (%); MID (моноциты, эозинофилы) (%); лимфоциты (%); тромбоциты (10⁹/л); коагулограмма (ПВ и АЧТВ) (сек.).

Биохимические показатели крови определяли на биохимическом анализаторе «А-25» (Испания) с использованием реагентов фирмы «BioSystems» (Испания) в сыворотке крови без следов гемолиза. Определяемые показатели: аминотрансферазы (АЛТ и АСТ), билирубин, щелочная фосфатаза, креатинин, мочевины, общий белок, альбумин, холестерин, триглицериды, глюкоза.

Для гистологической обработки ткани внутренних органов очищали, заливали в парафин, нарезают, окрашивали гематоксилином и эозином и микроскопировали.

Статистическая обработка

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормальному распределения с помощью критерия

Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением *n* представлены в итоговых таблицах. В случаях несоответствия данных нормальному распределению были рассчитаны медиана и квартильный размах. Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, – критерий Краскела-Уоллиса. Различия были определены при 0,05 уровне значимости.

Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

ДПП-4 экспрессируются на поверхности клеток многих органов и тканей: почек, легких, печени, селезенки, кожи, сердца, поджелудочной железы [10]. Помимо инактивации инкретиновых гормонов, ДПП-4 играет важную роль в регуляции иммунитета: например, экспрессия этого фермента значительно увеличивается при антигенной или митогенной стимуляции по интерлейкин-12-зависимому механизму [7], также он активирует внутриклеточный сигнальный фосфолипазы С-γ и митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) [8], усиливая созревание и миграцию Т-лимфоцитов, секрецию цитокинов, производство антител и активацию цитотоксических Т-клеток [8]. Кроме того, в плазме крови ДПП-4 связывается с ман-

нозо-6-фосфат-рецептором, поглощаются CD14-моноцитами, тем самым увеличивая их антиген-представляющую активность и пролиферацию Т-клеток [12, 11]. В связи с вышперечисленным, при применении ингибиторов ДПП-4 следует контролировать морфологические, биохимические и гематологические показатели, связанные с иммунной системой.

Гематологические и биохимические показатели плазмы крови экспериментальных животных определяли на 31-й, 91-й, 181-й и 361-й дни исследования. Поскольку отличий с контрольной и опытными группами по определяемым показателям не наблюдали, для наглядности приведены результаты определения на 361-й день исследования. Данные предоставлены в табл. 1-4.

Таблица 1

Влияние препарата КЛС-073 на гематологические показатели крови мышей-самцов при исследовании на 361-й день, (M±m, n=10)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	КЛС-073, мг/кг		
		2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
WBC лейкоциты, 10 ⁹ /л	3,3±0,3	3,2±0,2	3,1±0,3	3,0±0,2
GRA гранулоциты, %	73,3±1,5	71,5±1,9	72,6±1,8	72,6±1,3
MID моноциты/эозинофилы, %	2,4±0,1	2,7±0,2	2,4±0,1	2,5±0,2
LYM лимфоциты, %	24,3±1,4	25,8±2,0	25,0±1,7	24,9±1,3
RBC эритроциты, 10 ¹² /л	8,1±0,3	8,4±0,2	8,4±0,3	8,7±0,3
HGB гемоглобин, г/л	128,4±3,4	127,4±1,6	129,3±3,6	129,7±4,1
HCT гематокрит, %	38,2±1,1	35,8±1,0	37,6±2,2	39,5±2,3
PLT тромбоциты, 10 ⁹ /л	509,6±21,1	516,3±16,1	514,5±18,3	516,6±25,4
ПВ, сек	9,8±0,3	9,8±0,3	9,7±0,2	9,6±0,2
АЧТВ,сек	24,1±1,2	25,2±1,0	22,6±0,6	24,3±0,9

Таблица 2

Влияние препарата КЛС-073 на гематологические показатели крови мышей-самок при исследовании на 361-й день, (M±m, n=10)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	КЛС-073, мг/кг		
		2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
WBC лейкоциты, 10 ⁹ /л	3,2±0,2	3,3±0,2	3,4±0,3	2,9±0,2
GRA гранулоциты, %	73,0±1,5	74,3±1,6	70,9±2,4	71,8±2,1
MID моноциты/эозинофилы, %	2,6±0,2	2,5±0,1	2,6±0,2	2,5±0,2
LYM лимфоциты, %	24,4±1,5	23,3±1,6	26,5±2,4	25,7±2,0
RBC эритроциты, 10 ¹² /л	8,0±0,2	8,2±0,2	8,4±0,2	8,3±0,2
HGB гемоглобин, г/л	125,0±1,9	126,2±2,4	127,5±2,0	127,3±2,1
HCT гематокрит, %	38,2±1,1	37,2±1,6	38,4±1,4	39,8±1,1
PLT тромбоциты, 10 ⁹ /л	512,0±16,7	507,0±25,8	511,9±22,4	510,1±16,2
ПВ, сек	9,3±0,2	9,2±0,2	9,3±0,4	9,0±0,2
АЧТВ,сек	23,1±0,8	23,6±1,0	25,1±0,9	23,1±1,8

Таблица 3

Влияние препарата КЛС-073 на основные биохимические показатели периферической крови мышей-самцов на 361-й день исследования, ($M \pm m$, $n=10$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза, мг/кг		
		2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
Креатинин, мг/дл	0,33±0,03	0,36±0,03	0,34±0,03	0,35±0,02
Мочевина, ммоль/л	6,7±0,2	7,0±0,3	6,4±0,3	6,6±0,3
Аспаратаминотрансфераза, Е/л	137,1±6,0	134,5±5,5	133,4±4,5	138,2±4,7
Аланинаминотрансфераза, Е/л	63,2±2,6	66,0±3,4	63,1±2,6	64,6±3,9
Щелочная фосфатаза, Е/л	131,0±6,0	126,7±4,3	130,9±4,8	130,6±5,5
Билирубин общий, мг/дл	3,5±0,2	3,5±0,2	3,5±0,2	3,6±0,2
Холестерин, ммоль/л	2,3±0,1	2,4±0,2	2,4±0,1	2,3±0,2
Триглицериды, ммоль/л	1,12±0,07	1,15±0,06	1,16±0,05	1,10±0,06
Общий белок, г/л	60,7±1,7	61,9±1,2	58,3±2,0	60,8±1,8
Альбумин (А), г/л	17,3±0,5	17,6±0,4	17,0±0,4	17,6±0,5
Глобулины (G), г/л	43,4±1,5	44,3±0,9	41,4±1,6	43,2±1,7
Отношение А/G	0,40±0,01	0,40±0,01	0,41±0,01	0,41±0,02
Глюкоза, мг/дл	140,3±5,2	138,8±4,9	137,0±4,5	137,1±3,8

Таблица 4

Влияние препарата КЛС-073 на основные биохимические показатели периферической крови мышей-самок на 361-й день исследования, ($M \pm m$, $n=10$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза, мг/кг		
		2 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
Креатинин, мг/дл	0,34±0,03	0,38±0,04	0,36±0,04	0,33±0,03
Мочевина, ммоль/л	6,2±0,3	6,5±0,3	6,8±0,3	6,5±0,3
Аспаратаминотрансфераза, Е/л	144,7±3,5	145,4±4,3	143,3±4,9	142,8±6,7
Аланинаминотрансфераза, Е/л	63,5±3,0	63,8±2,8	63,6±2,3	64,5±3,0
Щелочная фосфатаза, Е/л	131,6±4,6	128,8±5,7	129,9±7,5	134,2±5,4
Билирубин общий, мг/дл	3,4±0,2	3,6±0,2	3,4±0,2	3,6±0,2
Холестерин, ммоль/л	2,4±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1	2,5±0,1
Триглицериды, ммоль/л	1,23±0,04	1,14±0,04	1,17±0,05	1,25±0,04
Общий белок, г/л	57,8±1,9	58,6±2,4	61,0±1,4	59,1±1,7
Альбумин (А), г/л	17,0±0,5	17,0±0,5	17,2±0,5	16,8±0,5
Глобулины (G), г/л	40,8±1,4	41,6±2,0	43,8±1,0	42,3±1,3
Отношение А/G	0,42±0,01	0,41±0,01	0,39±0,01	0,40±0,01
Глюкоза, мг/дл	144,6±4,9	148,6±4,1	141,2±4,3	145,5±4,2

Анализ гематологических показателей периферической крови экспериментальных животных показал отсутствие различий между всеми экспериментальными группами (ANOVA, $p>0,05$). Все показатели находились в пределах физиологических норм [5].

Анализ биохимических показателей периферической крови показал отсутствие статистически значимых различий между контрольной группой и группами, получавшими исследуемый препарат во всех дозах (ANOVA, $p < 0,05$). Все биохимические показатели находились в пределах физиологических норм [16]. Важно отметить, что на фоне применения 10 ВТД препарата КЛС-073 не было отмечено случаев гипогликемии, свойственных для стандартной на сегодняшний день терапии препаратами сульфонилмочевины [6].

Кроме того, не было отмечено случаев аллопеции, тромбоцитопении, ретикулоцитопении, что свойственно для неселективных ингибиторов ДПП-4 [13].

Считается, что при длительной терапии, основанной на инкретинах, возрастает риск развития воспалительных и онкологических заболеваний поджелудочной и щитовидной желез [2, 17]. По причине этого, важна оценка функции данных органов при применении ингибиторов ДПП-4. С этой целью было проведено гистологическое исследование поджелудочной и щитовидной желез экспериментальных животных.

Щитовидная железа

Фолликулы щитовидной железы заполнены небольшим количеством оксифильного, слабо вакуолизированного коллоида. Эпителий фолликулов обычной высоты, ядра четкие. Сосуды стромы умеренно полнокровные. Строение подчелюстных желез нарушений не представляет. Эпителиальные клетки концевых отделов и выводных протоков с четкими ядрами, деструкции клеток нет (рис. 1, 2).

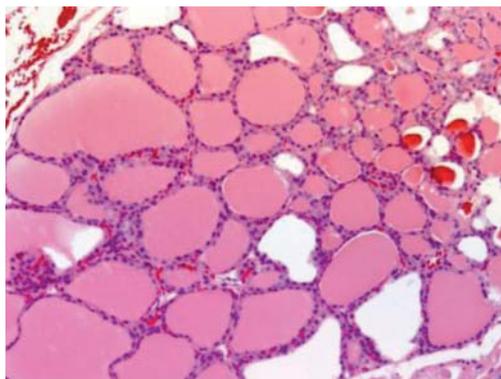


Рис. 1. Срез щитовидной железы мыши контрольной группы. Ув. $\times 100$. Окраска гематоксилин-эозином.

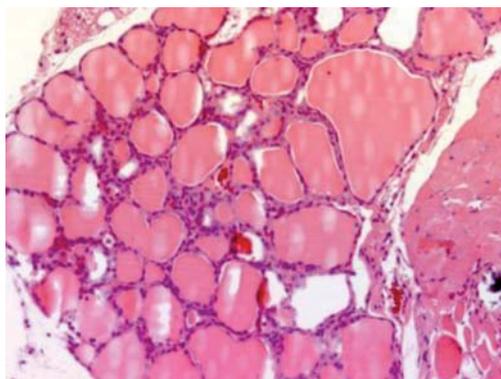


Рис. 2. Срез щитовидной железы мыши, получавшей исследуемый препарат КЛС-073 в дозе 20 мг/кг в течение 360 дней. Ув. $\times 100$. Окраска гематоксилин-эозином.

Поджелудочная железа

Дольчатое строение поджелудочной железы сохранено. Клетки островков Лангерганса содержат светлые, четкие ядра, цитоплазма слабо оксифильная. Эпителиальные клетки внешнесекреторной части железы базофильные, ядра, расположенные в средней части, четкие, с достаточным количеством хроматина. Сосуды стромы поджелудочной железы умеренно полнокровные (рис. 3, 4).

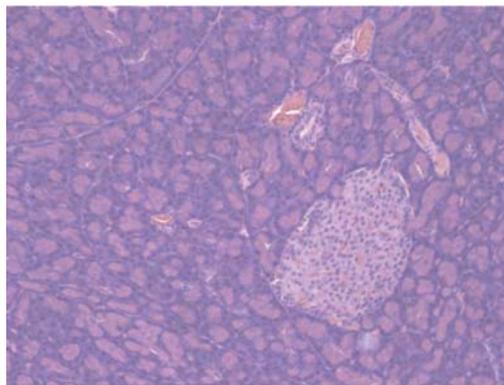


Рис. 3. Срез поджелудочной железы мыши контрольной группы. Ув. x100. Окраска гематоксилин-эозином.

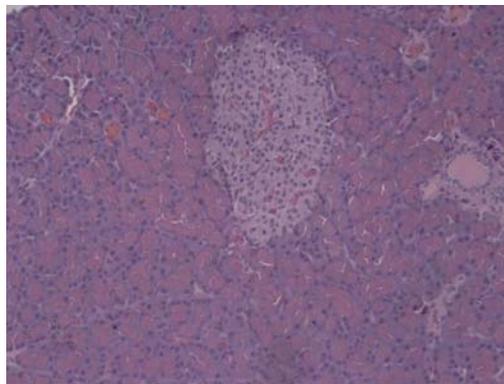


Рис. 4. Срез поджелудочной железы мыши, получавшей исследуемый препарат КЛС-073 в дозе 20 мг/кг в течение 360 дней. Ув. x100. Окраска гематоксилин-эозином.

Таким образом, по результатам исследования был сделан вывод о том, что исследуемый препарат КЛС-073 при длительном (360 дней) применении не оказывает негативного воздействия на щитовидную и поджелудочную железы экспериментальных животных.

Выводы

В ходе данного исследования препарат КЛС-073 вводился на протяжении 12 мес. в потенциально токсических дозах (5 и 10 ВТД). В результате экспери-

мента не было обнаружено негативного влияния исследуемого препарата на поджелудочную и щитовидную железы. При анализе гематологических и биохимических показателей крови животных, получавших КЛС-073, не было выявлено отличий от контрольной группы.

Таким образом, на основании отсутствия токсических эффектов в условиях хронического (12 мес.) токсикологического эксперимента, препарат КЛС-073 следует признать перспективным с точки зрения установленного долгосрочного профиля безопасности.

Список литературы

1. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб. 2012. 48 с.
2. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В., Рыбакова А.В., Ходько С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным // Международный вестник ветеринарии. 2013. № 3. С. 78-84.
3. Макаренко И.Е., Фаустова Н.М., Ванатиев Г.В., Уракова И.Н., Пожарицкая О.Н., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Шиков А.Н. Оценка эффективности препарата из гонад морских ежей // Фармация. 2015. № 2. С. 47-50.
4. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. - ФГБУ «НЦЭМСП». 2012. Т. 1. 942 с.
5. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных: Справочник / Под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. – СПб: ООО «Издательство «ЛЕМА». 2013. 116 с.
6. *Ahrén B.* Are sulfonylureas less desirable than DPP-4 inhibitors as add-on to metformin in the treatment of type 2 diabetes? // Current diabetes reports. 2011. № 2. Т. 11. P. 83-90.
7. *Fox D.A., et al.* Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody // The Journal of Immunology. 1984. № 3. Т. 133. P. 1250-1256.

8. *Gorrell M.D., Gysbers V., McCaughan G.W.* CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes // *Scand. J. Immunol.* 2001;54:249-264.
9. *Makarenko I.E., et al.* Effects of lipid extract of sea urchins gonads in metabolic syndrome animal model // *Planta Medica.* 2013. № 13. Т. 79. P. PB44.
10. *Mentlein R.* Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides // *Regulatory peptides.* 1999. № 1. Т. 85. P. 9-24.
11. *Ohnuma K., et al.* Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1 // *J. Biol. Chemistry.* 2007. № 13. Т. 282. P. 10117-10131.
12. *Ohnuma K., et al.* CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004. № 39. Т. 101. P. 14186-14191.
13. *Sato Y., Kamada T., Yamauchi A.* The role of DPP 4 in the preservation of renal function: DPP4 involvement in hemoglobin expression // *J. Endocrinology.* 2014. P. JOE-14-0016.
14. *Shikov A.N., et al.* Composition of fatty oil of sea urchin eggs from Barents Sea // *Planta Medica.* 2011. № 12. Т. 77. P. PH4.
15. *Shikov A.N., et al.* Phospholipids and amino-acid composition of eggs of sea urchin from Barents Sea // *Planta Medica.* 2012. № 11. Т. 78. P. PI8.
16. *Vangoitsenhoven R., Mathieu C., Van der Schueren B.* GLP1 and cancer: friend or foe? // *Endocrine-related cancer.* 2012. № 5. Т. 19. P. F77-F88.
17. FDA. Электронный ресурс: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108770.htm> (дата обращения: 09.2014).

Evaluation of the safety of long-term use of the drug KLS-073 as incretinomimetics

I.E. Makarenko, O.I. Avdeyeva, G.V. Vanatiev, N.M. Faustova,
I.N. Urakova, O.N. Pozharitskaya, M.N. Makarova, V.G. Makarov,
A.N. Shikov

During this work it was studied the influence of the new entretenimiento of natural origin (DPP-4 inhibitor, the drug KLS-073) on basic biochemical parameters for a long period (12 months) of application. The experiment was carried out on outbred mice of both sexes. The introduction of the drug was carried out during 12 months in three doses: higher therapeutic (ITD) (2 mg/kg), 5 ITD (10 mg/kg) and 10 ITD (20 mg/kg). As of the evaluation criteria in the assessment we used overall biochemical and hematological parameters and histological examination of the thyroid and the pancreas over time (the 31st, the 91st, 181st and 361 th days). According to the results, the study showed no differences in biochemical parameters and structure of the thyroid and pancreas glands of intact animals and animals treated with the study drug KLS-073.

Key words: dipeptidylpeptidase 4, incretinomimetics, KLS-073, a complex of gonads of sea urchins, *S. Droebachiensis*.

Потенцирование гепарином антиноцицептивного действия нейропептида FMRFa на супраспинальном уровне

А.Е. Хомутов, К.А. Пурсанов, О.В. Лушникова, З.В. Перепелюк

ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»,
Нижегород

Контактная информация: д.б.н. Хомутов Александр Евгеньевич, kfg@bio.unn.ru

В опытах на крысах с использованием теста «горячей пластины» («hot plate») и регистрацией латентного периода реакции облизывания лапок установлено потенцирующее действие гепарина на антиноцицептивный эффект нейропептида FMRFa. Протамина сульфат, Налоксон и Обзидан снижали антиноцицептивный эффект FMRFa. Гепарин блокировал антианальгетическое действие Протамина сульфата, Налоксона и Обзидана.

Ключевые слова: нейропептид FMRFa, гепарин, Протамина сульфат, Налоксон, Обзидан.

Введение

Нейропептид FMRFa отнесен к семейству опиоидных пептидов группы параопиоидов, в которую входят также около двух десятков представителей. Регуляторные пептиды семейства FMRFамида активно исследуются уже более трёх десятилетий, однако данные относительно механизма их действия у млекопитающих весьма противоречивы [18]. Некоторые авторы приписывают пептидам этого семейства способность активировать симпатическую нервную систему, также было показано, что симпатомиметические эффекты FMRFa при системном введении обусловлены его способностью взаимодействовать с периферическими α - и β -адренорецепторами [12]. С другой стороны, FMRFамиды способны взаимодействовать с опиатными рецепторами, причем их действие зависит от уров-

ня, на котором рассматривается система. Так, на простых тест-системах (активность ферментов) у них проявляются антагонистические свойства, на более сложных тест-системах FMRFамиды могут вести себя как агонисты или антагонисты, или же эффект отсутствует [7]. В мозге и гипофизе крыс обнаружено широкое представительство FMRF-иммунореактивных нейронов, которые, возможно, образуют новую, относительно независимую пептидергическую систему. Из литературы [2] известно, что FMRFa-подобные пептиды могут образовываться путем ограниченного протеолиза из некоторых опиоидных пептидов: YGGFMRF-NH₂, локализованного преимущественно в надпочечниках, и геморфин-подобных пептидов LVVP-WTQRF и VVVVPWTQRF, выделенных из гомогенатов головного мозга и являющихся фрагментами 31-40 и 32-40

β -цепи гемоглобина [3]. Таким образом, данные факты указывают на существование связи между эндогенной опиоидной и симпато-адреналовой системой: фрагменты параопиоидов, образующиеся в результате их ограниченного протеолиза, обладают способностью взаимодействовать с адренорецепторами, и, возможно, служат в качестве функциональных антагонистов своих предшественников (эндоопиоидов) [7].

Существенную роль в проявлении эффектов FMRFa, как и многих других веществ, играет количественный эквивалент применяемого пептида, при внутрибрюшинном введении крысам в дозе 5 мг/кг FMRFa оказывает действие, сходное с введением адреналина в той же дозе, т.е. угнетение двигательной активности, саливация, пилоэрекция, гипергликемия, отек легких. Блокада альфа-адренорецепторов дигидроэрготамином (2 мг/кг) отменяла данные патологические изменения; с другой стороны, введение пептида в дозе 0,1 мг/кг, как и применение адреналина в той же дозе, не приводило к существенным морфологическим отличиям от контроля [8].

В литературе имеются данные об анальгетической активности многих представителей семейства (NPFF, NPAF, NPSF) FMRFa-подобных пептидов. Интратекальные инъекции FMRFa и NPFF способны вызвать гиперанальгезию у крыс, а также пролонгируют морфиновую анальгезию [13, 16]. Показана их роль в регуляции боли на спинальном уровне на модели воспалительных болей, вызванных каррагеновыми инъекциями, а также при термической болевой стимуляции, при этом значительно возрастает уровень mRNA в спинном

мозге, кодирующей NPFF прекурсор [14].

Как известно, полифункциональный мукополисахарид гепарин широко представлен в организме млекопитающих и характеризуется уникальной способностью к взаимодействию с эндогенными белками и полипептидами, осуществляющими регуляторные функции [4-6]. В связи с этим, оценивать активность в организме того или иного пептида без изучения влияния на этот процесс гепарина является, на наш взгляд, неконструктивным.

Целью работы явилось изучение процессов пролонгирования гепарином антиноцицептивного действия нейропептида FMRFa на супраспинальном уровне, а также влияния на этот процесс Протамина сульфата, Налоксона и Обзидана.

Материалы и методы

Для исследования были использованы 90 половозрелых беспородных крыс-самцов массой 200 ± 10 г, содержащихся на общем рационе вивария. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАМН. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г.), «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Животные содержались в одинаковых стандартных условиях в пластиковых клетках с автопоилками, получали полноценный комбикорм и

очищенную водопроводную воду *ad libitum*. В качестве подстилки использовали древесные опилки из хвойных пород деревьев.

В качестве исследуемых веществ использовали следующие препараты:

1) высокомолекулярный гепарин (произв. Московского эндокринного завода), содержащий в 1 мл раствора 5000 ME (1ME=0,0077 мг);

2) FMRFa, синтезированный в ГНЦ РАМН;

3) Протамина сульфат (произв. Московского эндокринного завода), содержащий 10 мг сухого вещества в 1 мл раствора;

4) Налоксон (произв. Варшавского фармацевтического завода «Польфа»), содержащий 0,4 мг действующего вещества в 1 мл раствора;

5) Обзидан (произв. «ISIS PHARMA GmbH»), содержащий 1 мг пропранолола в 1 мл раствора.

Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно в объёме 1 мл в определённой последовательности, предусмотренной условиями опыта. Временной интервал между введениями был постоянным и составлял 10 мин.

При исследовании антиноцицептивного действия FMRFa использовали тест «горячей пластины («hot plate»), который даёт общее представление о действии веществ на супраспинальном уровне [9]. Животное помещали на пластину, нагретую до 57-58°C, температура поверхности пластины регулировалась термостатом. По секундомеру засекалось время от момента помещения животного на пластину до момента первого облизывания лап (задних), что и составляло латентный период реакции облизывания лап (ЛП РОЛ). Макси-

мальное время нахождения животного на пластине – 25 сек.

Анальгетический эффект оценивался в процентах от значений контрольной группы, принимаемой за 100%. Для оценки использовались медианы. Это связано с тем, что средняя арифметическая очень подвержена влиянию крайних членов вариационного ряда, наименее характерных для данной совокупности, что в случае использования нами небольших выборок (6-10 особей в группе) недопустимо. Кроме того, определённые ограничения продолжительности измерения вообще исключили в ряде опытов возможность использования какой-либо другой обобщающей характеристики. Поэтому в наших опытах использование медианы являлось наиболее оправданным.

Достоверность различий между группами оценивалась с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни для независимых совокупностей. Для множественных сравнений применяли критерий Данна [1].

Результаты и их обсуждение

Внутрибрюшинное введение FMRFa в дозе 0,1 мг/кг сопровождается увеличением времени ЛП РОЛ, что говорит об антиноцицептивном действии параопиоида (табл.). Анальгетический эффект FMRFa потенцируется на фоне действия гепарина в дозе 500 ME/кг, что выражается в продолжительности эффекта. Так, если при введении FMRFa максимальный эффект регистрируется только в течение первых двух минут от момента инъекции, то на фоне действия гепарина продолжительность анальгетического эффекта увеличивается до 60 мин.

Таблица

Влияние FMRFa, гепарина и Протамина сульфата на ЛП РОЛ (%) у крыс

Условия опыта	Время после введения веществ, мин				
	20	40	60	90	150
Контроль (физиол. раствор)	100	100	100	100	100
FMRFa (0,1 мг/кг)	223,4*	105,4	130,8*	118,4	126,0
Гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг)	188,3**	204,3**	167,0**	98,0	145,1*
Протамина сульфат (10 мг/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг)	84,3 ⁺	92,6 ⁺	72,1**	80,5 ⁺	97,2 ⁺
Протамина сульфат (10 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг)	145,5**	150,2**	117,6	158,2**	102,4

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем;
 + – $p < 0,05$ по сравнению с FMRFa.

Блокада эндогенного гепарина Протамина сульфатом с последующим введением FMRFa характеризуется реверсией анальгетического эффекта, а ЛП РОЛ в течение всего времени наблюдения достоверно ниже показателей группы крыс, которым вводили FMRFa. Интересные данные были получены при последовательном введении Протамина сульфата, гепарина и FMRFa. В этом случае величина ЛП РОЛ была ниже показателей FMRFa, но выше контрольных величин (табл.).

Предварительное введение Налоксона, являющегося антагонистом опиатных рецепторов, в дозе 1,0 мг/кг, с последующей внутрибрюшинной инъекцией FMRFa характеризовалось блокадой антиноцицептивного действия FMRFa, причём в течение 60 мин ЛП РОЛ резко отличался от аналогичного результата при введении только FMRFa. Введение исследуемых веществ по схеме «Налоксон → гепарин → FMRFa»

сопровождалось значительным снижением ЛП РОЛ в течение 40 мин от момента введения относительно группы с введением только FMRFa и увеличением ЛП РОЛ в течение всего времени наблюдения при введении по схеме «Налоксон → FMRFa» (рис. 1).

Обзидан, являющийся неселективным β -адреноблокатором, снижает антиноцицептивное действие FMRFa, а при введении по схеме «Обзидан → гепарин → FMRFa» анальгетический эффект FMRFa в значительной степени увеличивается по сравнению с результатом работы по схеме «Обзидан → FMRFa» (рис. 2).

Таким образом, данные фармакологического анализа показывают, что антиноцицептивное действие FMRFa связано с активацией опиоидэргической и адренергической систем. На фоне блокаторов гепарин способствует проявлению анальгетической активности FMRF-пептида.

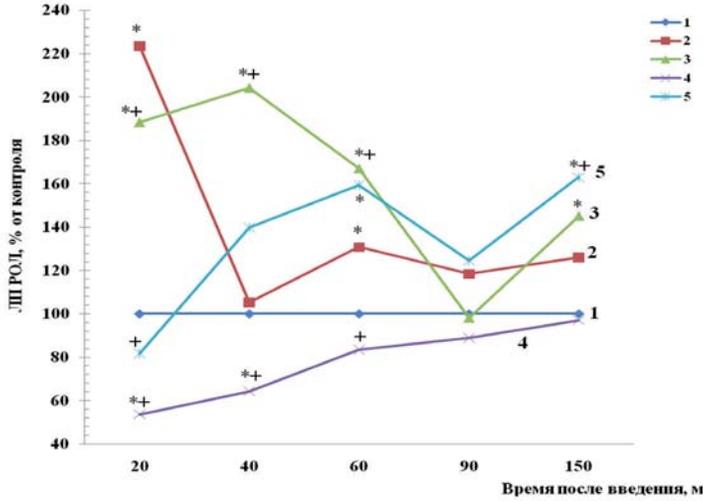


Рис. 1. Влияние FMRFa, гепарина и Налоксона на ЛП РОЛ (%) у крыс.

- 1 – Контроль (физиол. р-р);
- 2 – FMRFa (0,1 мг/кг);
- 3 – Гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);
- 4 – Налоксон (1 мг/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);
- 5 – Налоксон (1 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг).

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем;
 + – $p \leq 0,05$ по сравнению с FMRFa.

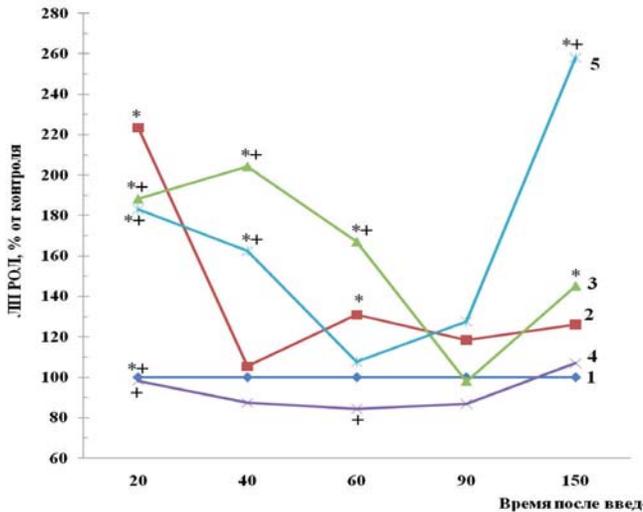


Рис. 2. Влияние FMRFa, гепарина и Обидана на ЛП РОЛ (%) у крыс.

- 1 – Контроль (физиол. р-р);
- 2 – FMRFa (0,1 мг/кг);
- 3 – Гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);
- 4 – Обидан (1 мг/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);
- 5 – Обидан (1 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг).

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем;
 + – $p \leq 0,05$ по сравнению с FMRFa.

Анализируя возможные механизмы потенцирующего действия гепарина на антиноцицептивный эффект FMRFa, особого внимания заслуживают взаимоотношения гепарина с медиаторными системами, в т.ч. и с рецепторами. Так, оказалось, что гепарин влияет на десенситизацию δ -опиоидных рецепторов, подавляет неконкурентным способом связывание с сигма-рецептором опиоидов $3H^+$ -N-аллилнорметазоцина в микросомальной фракции мозга и мембран печени крыс [20]. Гепарин уменьшает фосфорилирование дельта-опиоидных рецепторов, соединенных с G-белком (GPCR), и, как следствие, снижает гипосенсибилизацию, вызванную специфическим опиоидным агонистом эторфином и D-Ala₂-D-Leu₅-энкефалином (DADLE) [15, 17]. Гепарин блокирует выход Ca²⁺ [17, 19, 21], также как ингибитор инозитол 1,4,5-трисфосфата, гепарин реверсирует развитие морфиновой толерантности [19]. Процесс десенситизации, т.е. уменьшение чувствительности (гипосенситизация) и сокращение числа рецепторов на клеточной поверхности (интернализация) показаны не только для опиоидных рецепторов, но и для других, также принадлежащих к GPCR (в частности, β 2-адренергических и α 2-адренергических), для A1-аденозиновых рецепторов и m2-мускариновых рецепторов [10, 11]. Недавно были изучены рецепторы FMRFa-пептидов человека, они также относятся к классу GPCR [16]. Роль гепарина как неспецифического блокатора протеинкиназы доказана для опиоидных рецепторов и для β -адренергических рецепторов. Возможно, взаимодействуя с данным видом рецепторов, гепарин уменьшает

процесс десенситизации, вызванный воздействием синтетических агонистов, тем самым повышает чувствительность рецепторов к анальгетикам и, соответственно, при прочих равных условиях пролонгирует анальгетический эффект.

Выводы

В реализации анальгетического эффекта нейропептида FMRFa (в дозе 0,1 мг/кг) принимают участие опиоидная и β -адренергическая системы. На фоне действия гепарина (500 МЕ/кг) антиноцицептивное действие параопиоида усиливается. Протамина сульфат, Налоксон и Обзидан снижают анальгетическое действие FMRFa. Гепарин, включённый в схему последовательных введений, снижает антианальгетическое действие Протамина сульфата, Налоксона и Обзидана.

Список литературы

1. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. - М.: Практика. 1999. 459 с.
2. *Гомазков О.А.* Современные тенденции в исследовании физиологически активных пептидов // Успехи совр. биологии. 1996. Т. 116. № 1. С. 60-68.
3. *Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалёва И.И.* Выделение, структура и свойства новых эндогенных пептидов // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 10-11. С. 1271-1311.
4. *Каркищенко Н.Н.* Психонитропизм лекарственных средств. - М.: Медицина. 1993. 208 с.
5. *Кондашевская М.В.* Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах // Вестник РАМН. 2010. № 6. С. 49-54.
6. *Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е.* Противосвёртывающие эффекты комплексного соединения высокомолекулярного гепарина с аргинином // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 147. № 3. С. 300-303.

7. *Парин С.Б., Зимин Ю.В., Крылов В.Н.* Применение пептидов опиоидного ряда в экспериментальной терапии шока // Антигипоксанты и антипротекторы / Мат-лы конф. - СПб. 1994. Вып. 4. С. 272-273.
8. *Пономаренко А.А., Тияков Р.Л.* Эдемогенное и гипергликемическое действие FMRF-амида // Сб. работ мол. ученых биол. ф-та ННГУ. – Н. Новгород. 1998. С. 113-114.
9. *Северьянова Л.А., Бобынцев И.И., Кирьянова Н.А., Долгинцев М.Е.* Эффекты L-аргинина на различные виды болевой чувствительности // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 141. № 5. С. 503-506.
10. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.* Рецепторы физиологически активных веществ. - Волгоград: Изд-во «Семь ветров». 1999. 640 с.
11. *Судаков С.К., Тригуб М.М.* Гипотеза реципрокного взаимодействия центрального и периферического звена эндогенной опиоидной системы // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 12. С. 604-607.
12. *Тияков Р.Л., Парин С.Б., Крылов В.Н.* Реанимирующее действие FMRFa-подобных пептидов при клинической смерти у крыс // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 1996. № 4. С. 417-418.
13. *Gouarderes C., Sutak M., Zajac J.M.* Antinociceptive effects of intrathecally administered F8Famide and FMRFamide in the rat // Eur. J. Pharmacol. 1993. Vol. 237. P. 73-81.
14. *Ferdinand S.* Gene for pain modulatory Neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli // Mol. pharm. 1999. Vol. 55. № 4. P. 804-811.
15. *Hasbi A., Polastron J., Allouche S.* Desensitization of the delta-opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase // J. Neurochem. 1998. Vol. 70. N 5. P. 2129-2138.
16. *Kontinent V., Kalso E.* Differential modulation of $\alpha 2$ -adrenergic and μ -opioid spinal antinociception by neuropeptide FF // Peptides. 1995. Vol. 16. P. 973-977.
17. *Morikawa H., Fukuda K., Mima H.* Desensitization and resensitization of delta-opioid receptor-mediated Ca^{2+} channel inhibition in NG108-15 cells // Br. J. Pharmacol. 1998. Vol. 123. N 6. P. 1111-1118.
18. *Raffa R.B.* The action of FMRFamide and related peptides on mammals // Peptides. 1998. V. 9. P. 915-922.
19. *Smith A., Surviladze Z., Gaudet E.* A p110 β and p110 δ phosphatidylinositol 3-kinases up-regulate Fc ϵ RI-activated Ca^{2+} influx by enhancing inositol 1,4,5-trisphosphate production // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. № 20. P. 17213-17220.
20. *Tsao L.I., Su T.P.* IP3 receptor antagonist heparin uncompetitively inhibits [3H](+)-SKF-10047 binding to sigma receptors // Eur. J. Pharmacol. 1996. Vol. 311. N 1. P. 28-36.
21. *Yoon S.H., Lo T.M., Loh H.Y.H.* Delta-opioid-induced liberation of Gbettagamma mobilizes Ca^{2+} stores in NG108-15 cells // Mol. Pharmacol. 1999. Vol. 56. № 5. P. 902-908.

Potentialiation of antinociceptive effect of neuropeptide FMRFa by heparin on supraspinal level

A.E. Khomutov, K.A. Pursanov, O.V. Lushnikova, Z.V. Perepelyuk

In experiments on rats using a test "hot plate" and the registration of the latent period of the reaction licking feet potentiating effect of heparin on the antinociceptive FMRFa effects was established. Protamine sulphate, Naloxone and Obzidan reduced antinociceptive FMRFa effects. The heparin blocked the anti-analgetic action of Protamine sulfate, Naloxone and Obzidan.

Key words: neuropeptide FMRFa, heparin, Protamine sulphate, Naloxone, Obzidan.



20-21 мая 2015 г. в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России прошла ежегодная Научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование».

На пленарном заседании был заслушан доклад научного руководителя Центра академика Н.Н.Каркищенко «Эпигенетические аспекты создания гуманизированных животных-моделей», в котором были затронуты теоретические аспекты создания новых животных-биомоделей с генами человека.

В докладе «Эпигенетические аспекты ацетилирования/деаце-

тирования гистонов» зав. лаб. биоаналитических исследований М.С.Дуля остановился на практических вопросах изучения эпигенетических модификаций и связанных с ними болезнях.

В рамках симпозиума «Новые биомедицинские технологии» было заслушано 6 докладов (В.Н.Каркищенко, Е.Б.Шустов, Л.А.Болотских, Ю.В.Фокин, Н.В.Петрова, Е.Д.Шевченко), в



которых были отражены результаты деятельности сотрудников Центра по созданию и поддержке животных-биомоделей для биомедицинских исследований, а также докладов (Л.Н.Семенкова, Э.Р.Зулькарнеев, Ю.А.Арутюнов, И.А.Титович,), посвященных вопросам использования бактериофагов в биопроцессинге пищевых полуфабрикатов, математического моделирования внезапной сердечной смерти, оценке антигипоксической активности нового нейротропного средства, разработке моделей для анализа нейропротективной активности рекомбинантных белков, применению рекомбинантных цитокинов.

Докладчики симпозиума «Биомоделирование и лабораторные животные» уделили особое внимание состоянию и перспективам развития биомоделирования в Центре (Х.Х.Семенов, Р.А.Клёсов, А.О.Ревякин, Г.Д.Капанадзе), исследованиям структуры энтеральной среды у лабораторных мышей, моделированию различных процессов и оценке основных параметров электрической активности тонкой кишки, методическим подходам к разработке вакцины для лечения и профилактики опийной наркомании (Л.Х.Казакова, Н.С.Тропская, М.М.Каменецкая, Е.А.Кислякова, И.Г.Шашкова, Н.Б.Гамалея, А.Г.Берзина,).



Докладчики симпозиума «Проблемы доклинических исследований в фармакологии» уделили внимание различным методам при изучении фармакокинетики препаратов, биоаналитическим исследованиям, а также аналитической диагностики острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами (Т.Н.Комаров, Л.А.Меньшикова, Е.С.Мельников, Ю.В.Медведев, А.А.Львова, Ю.Е.Болдина, А.Ю.Савченко).

Школа молодых ученых: «Человек и животные. Роль животных в природе и жизни человека»

проходила в РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, в ней участвовали представители РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева и Российского университета дружбы народов. Было заслушано 8 выступлений. Все присутствовавшие приняли активное участие в обсуждении затронутых проблем.

На «Круглом столе» Перспективы развития лабораторного животноводства были обсуждены проблемы развития лабораторного животноводства в филиалах Центра.

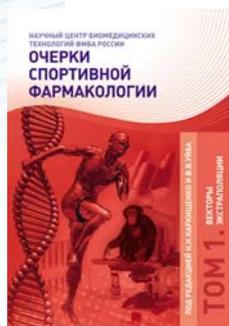


**Ежегодная научно-практическая конференция
«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ».**

Подробности на стр. 80.

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.