

3

2015

MEDICINE
ISSN 2074-5982

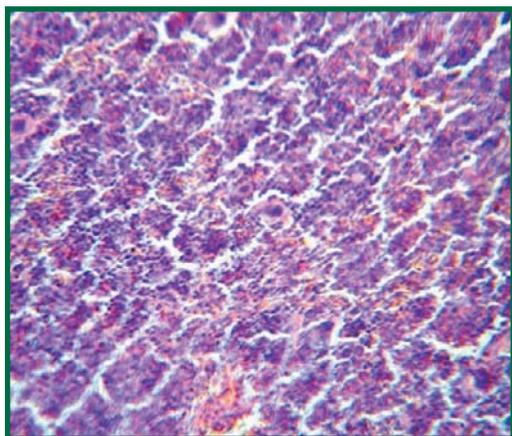
2015

3

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ



Научный центр БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ФМБА России



**КВАЛИФИЦИРОВАННЫЙ НАУЧНЫЙ ПЕРСОНАЛ
СОВРЕМЕННАЯ ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ
И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ БАЗА
МАСШТАБНЫЙ ЛАБОРАТОРНО-ВИВАРНЫЙ
КОМПЛЕКС**

- **СОЗДАНИЕ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
И ФАРМНУТРИЕНТОВ**
- **РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПРОИЗВОДСТВА АКТИВНЫХ
СУБСТАНЦИЙ И ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ**
- **ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛНОГО ЦИКЛА ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ФАРМНУТРИЕНТОВ**
- **СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ
ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ ЧЕЛОВЕКА**
- **ПРОВЕДЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ В ХИРУРГИИ, СТОМАТОЛОГИИ, ГИНЕКОЛОГИИ и т.д.
НА МЕЛКИХ И КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**
- **ПРОВЕДЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ**

Лицензия Росздравнадзора № ФС-99-01-008254 от 04.03.2013
Аккредитация Минздрава РФ № 662 от 18.03.2013

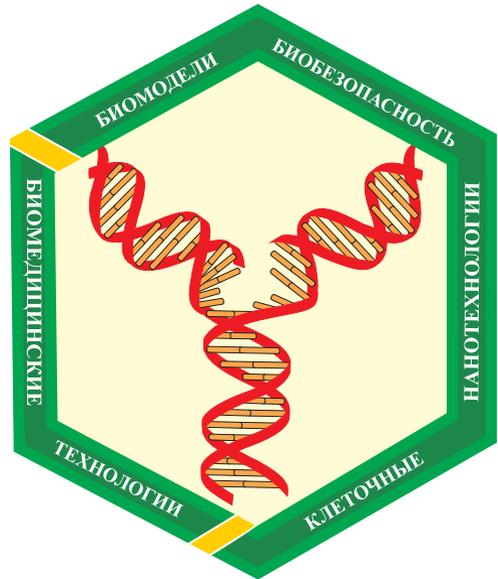
Научный журнал.

Основан в 2005 году ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 09.06.2005 г.

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 наук и кандидата наук (редакция – март 2010 года)



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

Г.Д. Капаназде, Светлые горы МО, **С.Л. Люблинский**, Обнинск, Калужская область, **Е.Л. Матвеевко**, Светлые горы МО, **А.Н. Мурашѐв**, Пушкино МО, **С.Ю. Пчелинцев**, Любучаны МО, **Г.В. Раменская**, Москва, **А.О. Ревякин**, Светлые горы МО, **В.П. Рябых**, Боровск МО, **Х.Х. Семѐнов**, Светлые горы МО, **Д.А. Сычѐв**, 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, **В. Влахов**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск, **А.М. Дыгай**, Томск, **А.Л. Зефирова**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан, **В.Г. Кулес**, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **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

Адрес редакции:

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

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

Отпечатано в типографии «Айсинг»
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская,
д. 18 Подписано в печать 28.09.2015
Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Петрова Новая модель оценки избирательной токсичности антибластомных средств на трансгенных мышцах с генами <i>Nat1hom</i> человека.....	4
В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина, А.А. Николаев Влияние транскраниальной низкочастотной электростимуляции головного мозга на спектральные характеристики ультразвуковой вокализации мини-свиней светлогорской популяции	20
И.А. Дьяченко, В.А. Паликов, Ю.А. Паликова, Я.А. Андреев, А.Н. Мурашёв Новые модели изучения воспалительной активности	27

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, Е.Б. Шустов Анализ поведенческих характеристик и ультразвуковой вокализации лабораторных крыс при фармакологической коррекции их психоэмоционального состояния.....	33
А.В. Соколов, В.Г. Кукес, Н.Д. Бунятян, Т.А. Родина, А.Б. Прокофьев, В.В. Архипов, Л.М. Красных, Е.А. Сокова Фармакокинетический подход в вопросе о взаимозаменяемости лекарственных средств.....	43
Т.Р. Петросян, В.А. Чавушян, А.С. Тер-Маркосян, А.С. Овсепян Эффекты разных концентраций бактериального меланина на электрическую активность нейронов коры мозга при раздражении нервов задней конечности у крыс.....	52
Ю.В. Фокин, А.М. Зубалий, М.К. Чугреев, М.М. Борисова, О.В. Алимкина Влияние синтетических пребиотиков на психоэмоциональное состояние крыс.....	62
В.Г. Шамратова, Л.А. Шарафутдинова, З.Р. Хисматуллина, М.В. Базунова, Е.И. Кулиш, Д.Р. Валиев Сравнительная оценка влияния ультрадисперсных систем на основе комплексов хитозана и его производных с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства эритроцитов	69

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова, П.А. Калинина Экспериментальное моделирование пузырчатки.....	78
--	----

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин Количественный фармако-ЭЭГ анализ активности ноотропов и их комбинаций с Мелаксеном при глобальной ишемии головного мозга у крыс.....	87
Н.А. Ломтева, Е.И. Кондратенко, М.А. Сомотруева Изучение психотропных свойств экстракта семян лотоса орехоносного.....	95

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze, N.V. Petrova A new model for the evaluation of selective toxicity of antineoplastic funds in transgenic mice with human genes <i>Nat1hom</i>	4
V.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina, A.A. Nikolaev Influence of low-frequency transcranial electrostimulation of the brain on the spectral characteristics of ultrasonic vocalizations of mini-pigs of Svetlogorsk population.....	20
I.A. Diyachenko, V.A. Palikov, Yu.A. Palikova, Ya.A. Andreyev, A.N. Murashev New models of studying of inflammatory activity.....	27

BIOMEDICAL METHODS

V.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, E.B. Shustov The analysis of behavioural characteristics and ultrasonic vocalization of laboratory rats at pharmacological correction of their psychoemotional state.....	33
A.V. Sokolov, V.G. Kukes, N.D. Bunyatyan, T.A. Rodina, A.B. Prokofiev, V.V. Arkhipov, L.M. Krasnikh, E.A. Sokova Farmakokinetic approach to the question of interchangeability of drugs.....	43
T.R. Petrosyan, V.A. Chavushyan, A.S. Ter-Markosyan, A.S. Hovsepian Effects of different concentrations of bacterial melanin on the electrical activity of neurons in the cerebral cortex in response to stimulation of the rat hindlimb nerves.....	52
Yu.V. Fokin, A.M. Zubaliy, M.K. Chugreyev, M.M. Borisova, O.V. Alimkina Effect of synthetic prebiotics on the psychoemotional state of rats.....	62
V.G. Shamratova, L.A. Sharafutdinova, Z.R. Khismatullina, M.V. Bazunova, E.I. Kulish, D.R. Valiev Comparative assessment of influence of ultradisperse systems on the basis of complexes of a hitozan and its derivatives with colloidal particles of silver iodide on the structural and functional properties of erythrocytes.....	69

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

A.A. Kubanov, T.V. Abramova, P.A. Kalinina Experimental models of pemphigus.....	78
--	----

NON-CLINICAL RESEARCHES

E.V. Gantsgorn, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin Quantitative pharmaco-EEG analysis of nootropics and nootropics with Melaxen combination activity at global cerebral ischemia in rats.....	87
N.A. Lomteva, E.I. Kondratenko, M.A. Samotrueva The study of psychotropic properties of <i>Nelumbo nucifera</i> seed extract.....	95



Новая модель оценки избирательной токсичности антибластомных средств на трансгенных мышах с генами *Nat1hom* человека

Н.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Петрова

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

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

На трансгенных гуманизированных мышах с генами *Nat1hom* человека проведена оценка токсичности лекарственного препарата Цисплатин при внутрижелудочном введении. Оценка проводилась в сравнении с мышами линии C57BL6/Y («быстрый» тип ацетилирования) и линии SHK («медленный» тип ацетилирования). LD50 для линии мышей *Nat1hom* составила 56,3 мг/кг, для мышей линии C57BL6/Y – 35,1 мг/кг, для мышей линии SHK – 33,7 мг/кг. Гибель животных линий C57BL6/Y и SHK наблюдалась уже через 1-6 ч после введения, а мышей *Nat1hom* – спустя сутки после введения. В предлетальном состоянии у животных всех линий отмечалась выраженная заторможенность, гиподинамия, резкое снижение тонуса мышц с эпизодически возникающими генерализованными судорожными эпизодами, заваливание на бок. При вскрытии павших животных отмечались признаки застойного венозного полнокровия внутренних органов, отека мозговых оболочек с единичными кровоизлияниями под оболочки мозга. После введения Цисплатина в дозе 45-55 мг/кг в гистологическом исследовании обнаружены отек головного мозга с признаками острой энцефалопатии и изменения в миокарде, которые свидетельствуют о начале развития острой сердечной недостаточности. Венозное полнокровие проявлялось во всех внутренних органах, а также в головном мозге. Меньший уровень токсичности Цисплатина у мышей с генами *Nat1hom* человека авторы объясняют наличием гена человека с «быстрым» типом ацетилирования. Делается вывод о том, что в метаболизме и детоксикации Цисплатина, а также снижении его токсичности более 60% приходится на N-ацетилтрансферазные процессы. Создание трансгенных гуманизированных мышей может быть основано на использовании CRISPR/Cas9-технологии. Предложена новая модель трансгенных гуманизированных мышей с геном *Nat1hom* для доклинических исследований противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: токсичность антибластомных препаратов, Цисплатин, трансгенные гуманизированные мыши с геном *Nat1hom*, мыши линий C57BL6/Y и SHK, гистоморфология, ПЦР в реальном времени, CRISPR/Cas9-технология.

Введение

Аксиоматичным является тот факт, что различные группы химических веществ иначе влияют на животных, чем на людей. Фармакогенетические исследования получили очередной стимул

с использованием новых трансгенных биомоделей и гуманизированных животных [10], развитием фармакомоделирования [5] и альтернативных фармакотоксикологических подходов [4]. Использование принципов GLP в фар-

макологических исследованиях [10] и новых принципов в фундаментальных биомедицинских исследованиях открыло новый путь к познанию механизмов действия и созданию инновационных лекарств, оценки их безопасности. Трансфекция генов человека в организм мышей позволяет получить гуманизированных животных, фармакологические исследования на которых дают гораздо более полное приближение к пониманию процессов, происходящих в организме людей.

Химические канцерогены ответственны за возникновение абсолютного большинства злокачественных новообразований человека. Реакция N-ацетилирования принадлежит особая роль не только на этапах детоксикации многих ксенобиотиков, но и участие в процессах канцерогенеза. Ацетилированные сложные эфиры химически лабильны и спонтанно превращаются в арилнитрониевые ионы, которые, в свою очередь, могут формировать ковалентные аддукты с ДНК и инициировать канцерогенез. В то же время, ряд металлонитрозильных соединений обладают противоопухолевым действием.

Успешное применение Цисплатина в клинике, с одной стороны, и высокая токсичность соединений платиновой группы, с другой стороны, послужили основой для проведения ряда работ, посвященных разработке платиновых комплексов и исследованию их противоопухолевых свойств [27].

К настоящему времени синтезированы тысячи платиновых комплексов различной структуры, однако из них только пять соединений внедрены в клиническую практику. Несколько соединений проходят клинические испытания, в т.ч.

первый платиновый комплекс перорального применения JM216 (сатраплатин).

Большинство антибластных средств метаболизируется и детоксицируется через ацетилтрансферазные механизмы. Наше внимание к выбору цисплатина как молекулы-ингибитора N-ацетилтрансферазы вызвано высоким сродством и реакционной способностью металлокомплексов к трансферазам с образованием дезактивированных белковых аддуктов. Сложность в понимании механизмов цисплатина определяется и тем, что наряду с выраженным антиканцерогенным действием, он способен вызывать возникновение папилломатозных и других видов опухолей.

Ранее нами были получены гуманизированные мыши, т.е. трансгенные животные, содержащие функционирующие гены *Nat1* и *Nat2* человека [7] с «быстрым» типом ацетилирования, а также определены условия их использования в фармакологических исследованиях [1]. Получены также высокоспецифичные праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных [6]. Поскольку цисплатин является субстратом и ингибитором NAT, мы сочли важным провести сравнительное исследование его эффектов на этих животных.

Цель работы – определить различия в токсичности Цисплатина при внутрижелудочном применении на мышах линий C57BL6/Y и SHK, а также на полученных нами трансгенных мышах, несущих гены *Nat1hom* человека. Эти исследования необходимы для более точной сравнительной оценки токсичности перспективных металлонитрозильных противоопухолевых препаратов и созда-

ния адекватных моделей экстраполяции полученных результатов доклинических исследований на человека.

Материалы и методы

Работа выполнена в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», в соответствии с нормативной документацией [12, 1, 11, 9, 8]. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией Центра.

Животные и их содержание

Эксперименты выполнялись на лабораторных аутбредных мышах линий C57BL6/Y («быстрые» ацетиляторы), SHK («медленные» ацетиляторы), а также мышах с геном *Nat1hom* человека. Мыши линии SHK характеризуются высокой частотой (18-20%) и скоростью роста спонтанных опухолей молочной железы. Источник получения животных – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Средняя начальная масса животных – 23-25 г.

Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» в вентилируемых клетках RairIsoSystem по 5 особей в клетке. В качестве корма использовали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный (экструдированный) для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам. Поение – *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 22-24°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – е-

стественное-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

В период исследования каждое животное ежедневно осматривалось. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных. При введении препарата осмотр проводился примерно через 1 ч после введения.

Животные распределялись по группам случайным образом методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела ($\pm 10\%$).

Генотипирование мышей с генами *Nat1hom* человека

Наличие гена *Nat1hom* человека проверялось с помощью ПЦР-анализа. В нашей работе использован амплификатор BIO-RAD CFX 96 Real-Time System (США). Система ПЦР реального времени с флуоресцентной детекцией CFX 96 состоит из двух компонентов: оптической реакционной системы сбора данных флуоресценции и термоциклера. Для определения экспрессии генов *Nat1* и *Nat2* человека у трансгенных животных на уровне мРНК высокоспецифичной ПЦР в режиме реального времени и точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления созданы строго специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды.

Объектом исследований служили мыши созданных новых трансгенных линий, а также линии C57BL6/Y. Исследуемый материал – ткань хвостов животных. Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом

аффинной сорбции и осуществляли синтез первой цепи кДНК. Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии генов *Nat1* у мышей и *Nat1* человека у трансгенных мышей проводили методом ПЦР с помощью специфичных праймеров и зондов к генам *Nat1* мышей (далее – *Nat1mus*) и *Nat1* человека у трансгенных мышей (далее – *Nat1hom*).

Обоснование доз

В работе использован коммерческий препарат «Цисплатин-Тева» («Teva Pharmaceutical Industries LTD», Израиль) в виде 0,5% раствора в 0,9% NaCl (0,5 мг/мл), далее – Цисплатин.

Для определения летальных доз выбирали различные концентрации препарата по классической схеме. Первоначальные наивысшие дозы препарата, которые приводили 100% гибели животных, в отчете не описывались. Путем снижения/повышения дозровок были достигнуты искомые LD16, LD50, LD84 и LD100 препаратов.

Введение осуществляли через металлический атравматичный зонд в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксоу. Для достижения необходимой дозы Цисплатина введение осуществляли разовым объемом 0,5 мл через каждые 30 мин.

Контрольным группам животных, уравненным по количеству с экспериментальными, внутрижелудочно вводили эквивалентные объемы дистиллированной воды.

Период наблюдения составлял 14 суток.

Регистрируемые показатели

Летальность, время гибели животных, симптоматика отравления, ежед-

невное наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание, потребление корма и воды, вскрытие и макроскопическое описание погибавших и всех выживших животных в конце исследования (эвтаназия осуществлялась передозировкой эфира), определение массовых коэффициентов внутренних органов.

Результаты и их обсуждение

В процессе исследований систематически осуществлялся контроль за трансгенными гуманизированными животными, у которых проводилась детекция наличия и функционирования гена *Nat1hom*.

Для выявления гена *Nat1hom* были подобраны специфичные праймеры и зонды. Нуклеотидные последовательности подобранных зондов и праймеров для мишеней зонда изучались на наличие вторичных структур, взаимокomплекментарных и самокомплекментарных участков в виде димеров и шпилек, что недопустимо для качественной ПЦР в режиме реального времени.

В результате подбора красителей и гасителей по свойствам флуоресценции и гашения флуоресценции для мечения зондов мишеней и зонда внутреннего контроля, с учетом мультиплексной ПЦР в реальном времени, была выбрана следующая комбинация (по схеме «флуорофор – олигонуклеотид – гаситель»):

FAM - зонд (мыши *Nat1*) - ВНQ-1,
ROX – зонд (человек *Nat1*) - ВНQ-2.

В данной комбинации достигается эффективное тушение за счет спектрального соответствия флуоресценции красителей и тушителей.

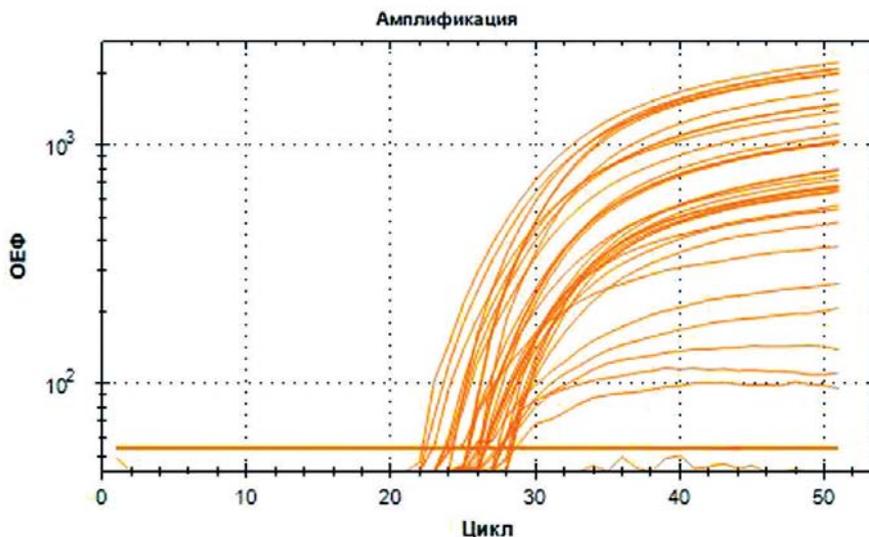


Рис. 1. Пример детекции гена *Nat1hom* у трансгенных животных.

На рис. 1 показаны графики накопления продуктов амплификации с помощью системы ПЦР в реальном времени, что свидетельствует о наличии положительных проб. У каждого исследуемого животного было выявлено наличие специфического участка гена *Nat1hom*.

Нами выявлена наработка специфического продукта ПЦР гена *Nat1hom* человека, который был получен на основе матрицы кДНК в результате обратной транскрипции тотальной РНК. Данный продукт свидетельствует о потенциальной транскрипции гена *Nat1hom* человека у трансгенных животных на белковом уровне, а, следовательно, и о работе данного гена в организме мыши. Установлена экспрессия гена *Nat1hom* человека у использованной линии трансгенных мышей с помощью ПЦР, что также подтверждено в результате проведения секвенирования.

Данная модель животных оказалась, по нашим данным, адекватной биомоделью для экстраполяции ре-

зультатов исследований в отношении человека, в т.ч. для оценки эффектов Цисплатина и других средств, влияющих на процессы ацетилирования в организме.

Токсикометрия

Зависимые от доз летальные эффекты исследуемого препарата представлены в табл. 1.

Таблица 1

Летальные эффекты препаратов (пало/всего) при внутрижелудочном введении мышам-самцам

Линии мышей	Доза, мг/кг		
	C57BL6/Y	20 1/10	30 4/10
SHK	Доза, мг/кг		
	20 2/10	30 4/10	40 6/10
с геном <i>Nat1hom</i>	Доза, мг/кг		
	50 0/10	55 2/10	60 5/10

Таблица 2
Летальные дозы Цисплатина для разных линий мышей

Летальные дозы	Линии мышей		
	C57BL6/Y	SHK	с геном <i>Nat1hom</i>
LD16	16,7	22,4	46,1
LD50	35,1	33,7	56,3
LD84	53,5	44,9	66,4
LD100	62,7	50,5	71,5

В табл. 2 даны летальные дозы Цисплатина для разных линий мышей. LD50 Цисплатина для трансгенной линии мышей с геном *Nat1hom* человека составила 56,3 мг/кг, что превышает LD50 для мышей линий C57BL6/Y и SHK более чем на 60%. Можно предположить, что трансформация Цисплатина в печени гуманизированных мышей происходит более активно.

Клиническая картина интоксикации

Мыши линии C57BL6/Y

Признаки передозировки препарата на организм подопытных животных, получавших Цисплатин в дозах 20-40 мг/кг, развились сразу после введения и проявлялись в виде заторможенности, снижения двигательной активности. У всех животных практически сразу после введения наблюдалось (в течение 1-6 мин) затруднение, подавление дыхания, заваливание на бок. При дозе 20 мг/кг у одного животного – тремор, судороги, в результате – гибель через 1,5 ч после введения препарата. Применение Цисплатина в дозах 30 и 40 мг/кг приводило к гибели большинства животных (примерно 80%) в первые часы после введения. Гибель оставшихся 20% животных наблюдалась на вторые сутки. Гибели

всех животных предшествовали тремор, судороги, затруднение дыхания, дезориентация. При использовании дозы 40 мг/кг у выживших животных отмечалась пониженная физическая активность, затруднение дыхания. На пятые-шестые сутки состояние животных, которым вводили Цисплатин в дозе 40 мг/кг, приходило в норму.

Мыши линии SHK

Картина интоксикации мышей линии SHK была такая же, как и у животных линии C57BL6/Y. При применении дозы 20-40 мг/кг у всех животных практически сразу после введения препарата (в течение 1-5 мин) наблюдалось затруднение дыхания, заваливание на бок, у большинства животных – тремор, судороги. К концу первого дня выжившие животные находились в неподвижном состоянии, с затрудненным дыханием и закрытыми глазами. На вторые сутки погибла часть животных. У выживших животных наблюдалось тяжелое состояние, затрудненное дыхание, глаза были закрыты, животные лежали неподвижно. Гибели животных при дальнейшем наблюдении не регистрировали, через 4-5 дней после введения Цисплатина состояние всех выживших животных приходило в норму.

Трансгенные гуманизированные мыши с геном Nat1hom

Признаки передозировки препарата на организм подопытных животных развились примерно через 0,5-1 ч после введения и проявлялись в виде заторможенности, снижения двигательной активности. У всех животных практически сразу после введения наблюдалось затруднение, подавление дыхания, заваливание на бок. В отличие от животных линий C57BL6/Y и SHK, в первые сутки

погибали только 1-2 особи (на всех тестируемых дозах). На второй день (на всех дозах) животные находились в неподвижном состоянии, с затрудненным дыханием. Наблюдали гибель основной части животных. На третьи сутки пало по одному животному при использовании доз 55 и 60 мг/кг. На четвертые-пятые сутки состояние животных, которые подвергались интоксикации, нормализовалось.

Результаты измерения массы тела животных, усредненные по группам, представлены в табл. 3.

Анализ полученных данных показывает увеличение средней массы всех выживших животных, получавших Цисплатин. Динамика массы тела опытных животных во всех группах не отличалась друг от друга. Живот-

ные контрольной группы прибавили к 14-му дню примерно 5% от начальной массы, а животные опытных групп – примерно 4%.

В табл. 4 приведены массовые коэффициенты внутренних органов мышей, усредненные по группам.

Анализ величин массовых коэффициентов не выявил каких-либо достоверных отличий как между группами животных, получавшими препарат, так и по отношению к контрольной группе.

Гистологические исследования

Т.к. гистологическая картина органов и тканей для животных всех групп была идентичной, ниже приведены результаты гистологических исследований органов и тканей с патологиями по группе животных с геном *Nat1hom*.

Таблица 3
Сравнительные данные изменения массы тела (г) под влиянием Цисплатина при однократном введении

Время наблюдения	Группы животных			
	Контроль	C57BL6/Y	SHK	с геном <i>Nat1hom</i>
Фон	23,9±1,5	23,4±0,8	23,0±1,4	23,2±1,2
7-й день	24,5±1,0	24,0±1,7	24,1±1,1	23,9±1,5
14-й день	25,1±1,3	24,3±1,2	24,2±1,8	24,3±0,9

Таблица 4
Массовые коэффициенты (МК) органов мышей разных линий при однократном введении Цисплатина (г/кг веса тела)

Орган	Группы животных			
	Контроль	C57BL6/Y	SHK	с геном <i>Nat1hom</i>
Сердце	3,9±0,3	3,6±0,3	3,7±0,1	3,8±0,4
Легкие с трахеей	6,3±0,2	6,5±0,4	6,6±0,2	6,4±0,3
Печень	39,2±2,0	38,5±1,8	39,6±0,7	37,8±1,4
Селезенка	3,6±0,7	3,4±0,6	3,4±0,3	3,5±0,2
Почка (левая)	4,3±0,4	4,6±0,1	4,1±0,2	4,6±0,4
Головной мозг	16,1±0,6	15,9±0,6	16,3±0,4	16,2±0,8

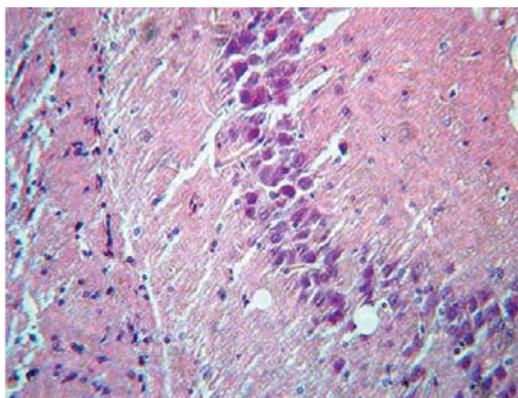


Рис. 2. Грушевидные клетки мозжечка. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

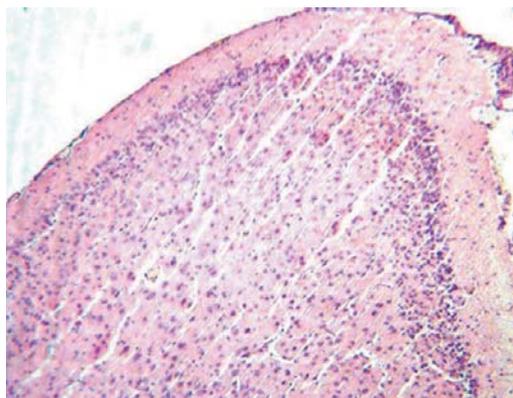


Рис. 3. Кора больших полушарий головного мозга. Дистрофические изменения единичных нейронов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x100.

Головной мозг (рис. 2, 3). Мягкая оболочка в виде мелких фрагментов с полнокровными сосудами. Умеренное полнокровие сосудов мелкого калибра. Сосуды среднего калибра в препаратах не представлены. Местами расширение периваскулярного пространства (в основном, вокруг глиальных клеток). Гистоархитектоника сохранена. Большинство нейронов окрашены бледно, округлой формы, набухание небольшого их количества, небольшое количество нейронов в виде клеток-теней. Клетки микроглии небольших размеров с гиперхромными, интенсивно окрашенными

ми ядрами. В единичных полях зрения сателлитоз. Нейронофагия не просматривается. Ядра грушевидных клеток коры мозжечка просматриваются плохо, единичные безъядерны.

Эти данные подтверждают клинические наблюдения о развитии под влиянием Цисплатина нейропатий преимущественно сенсорной природы. Отмечаются невриты зрительного нерва, корковая слепота, нарушения статокINETических функций.

Сердце (рис. 4-6). Неравномерное кровенаполнение с очагами ишемии. Неравномерное окрашивание кардиоми-

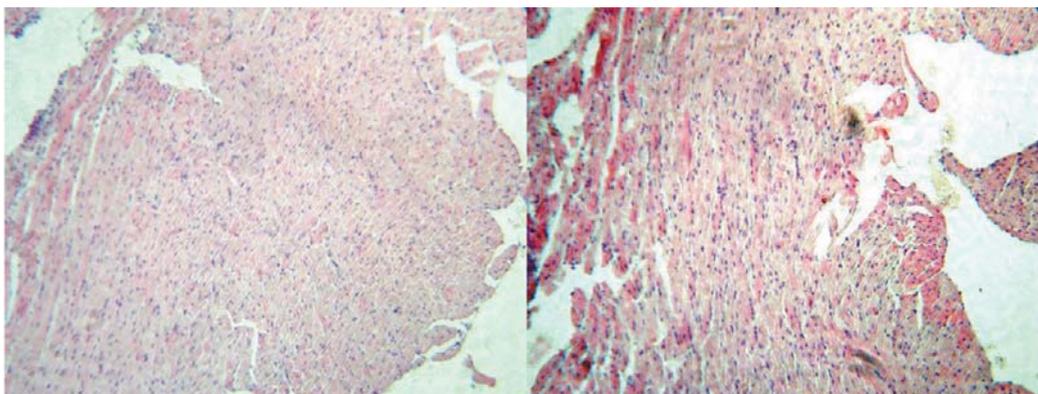


Рис. 4. Изменения тинкториальных свойств кардиомиоцитов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

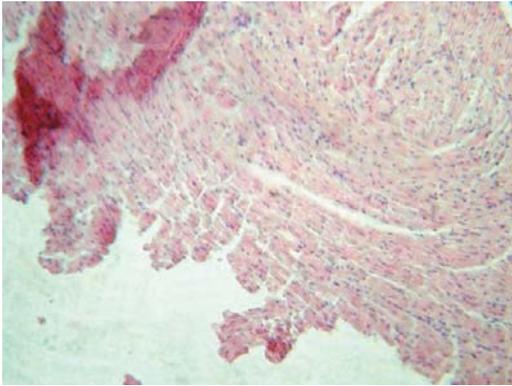


Рис. 5. Фрагментация кардиомиоцитов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

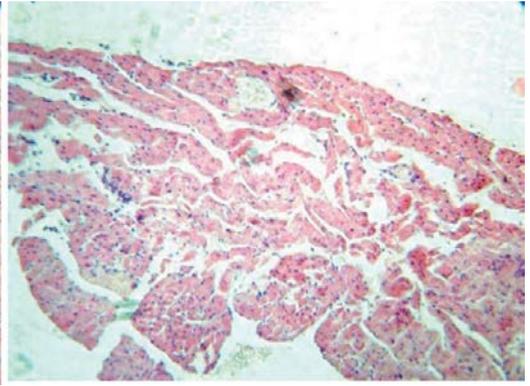


Рис. 6. Извитой ход волокон миокарда. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x100.

оцитов, ядра не увеличены, большинство из них имеют одинаковые размеры и окрашивание (нормохромность). У единичных кардиомиоцитов ядра с нечеткими контурами. Примерно в половине поля зрения мышечные волокна имеют извитой ход, в единичных полях зрения фрагментированы. Поперечная исчерченность мышечных волокон просматривается в некоторых полях зрения.

Эти гистологические изменения иллюстрируют описываемые клиницистами нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы: ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда,

застойная сердечная недостаточность, аритмии, ортостатическая гипотензия.

Легкие (рис. 7). Незначительное расширение просвета небольшого количества альвеол и альвеолярных ходов, в просвете мелких групп альвеол (2-4) отмечалось скопление гомогенной слабо эозинофильной жидкости, единичные мелкие очаги с рыхло расположенными эритроцитами в просвете альвеол (интраальвеолярные кровоизлияния). Сосуды (венозного типа) расширены, полнокровны. Преимущественное полнокровие капилляров межальвеолярных перегородок. Стен-

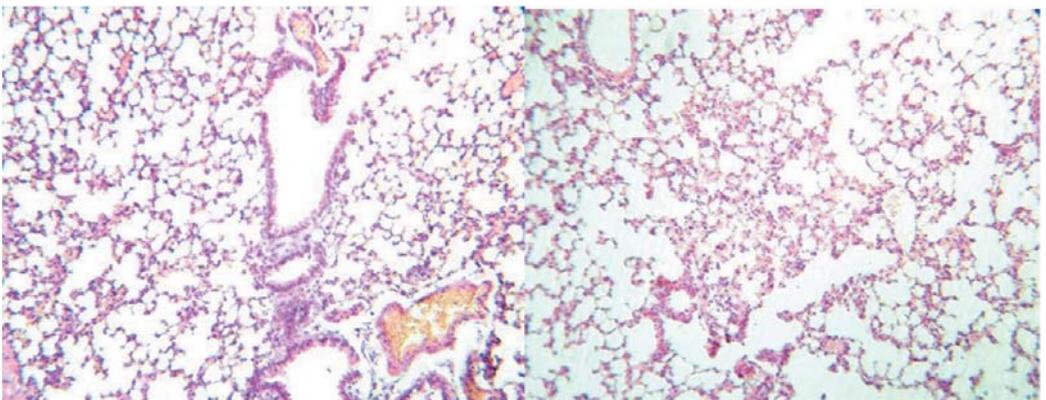


Рис. 7. Мелкоочаговые интраальвеолярные кровоизлияния. Полнокровие. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

ки крупных бронхиол практически во всех наблюдениях имели нормальное строение, без признаков воспаления и перибронхиолярного отека, выстланы респираторным эпителием без каких-либо патологических изменений. В некоторых полях зрения отмечается незначительная гиперплазия перибронхиальной лимфоидной ткани.

Клинические исследования отмечают нарушения объема вентиляции легких и изменения легочной гемодинамики.

Печень (рис. 8). Полнокровие портальных и центральных вен (в большей части поля зрения – с расширением их просвета). Гепатоциты всех отделов дольки имели нормальное строение с умеренно выраженными признаками белковой зернистой дистрофии.

В клинике транзиторные повышения уровня АСТ, АЛТ и билирубина в сыворотке крови и гепатозы также согласуются с полученными нами данными.

Почки (рис. 9). Преимущественное полнокровие обоих слоев с несколько большим кровенаполнением мозгового

вещества. Клубочки примерно одинакового размера без признаков патологических изменений, преимущественно полнокровны. Капсула Боумена-Шумлянского не изменена. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев сохранен, дистрофические изменения в нем не просматриваются.

Побочные эффекты Цисплатина в виде нефротоксичности являются основным токсическим фактором, ограничивающим дозу препарата. Однако в клинике отмечается, что нефротоксичность Цисплатина носит кумулятивный характер и выявляется на второй неделе после введения соответствующей дозы.

Наблюдаются повреждения почечных канальцев, повышение уровня креатинина, мочевины, мочевой кислоты. В нашем исследовании это не столь четко просматривается, поскольку используется однократное введение препаратов.

Селезенка (рис. 10). Полнокровие. Границы фолликулов нечеткие. Небольшое количество мегакариоцитов. Реактивные центры не просматриваются.

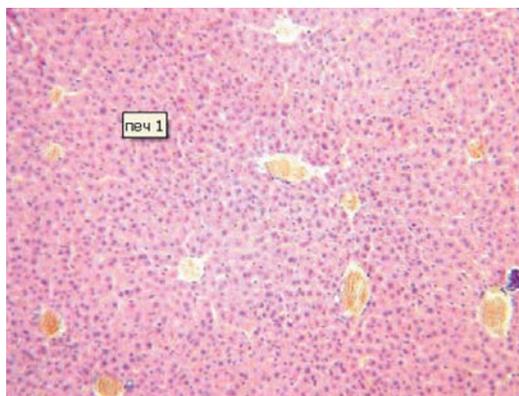


Рис. 8. Полнокровие портальных и центральных вен печени, умеренно выраженная белковая зернистая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 100$.

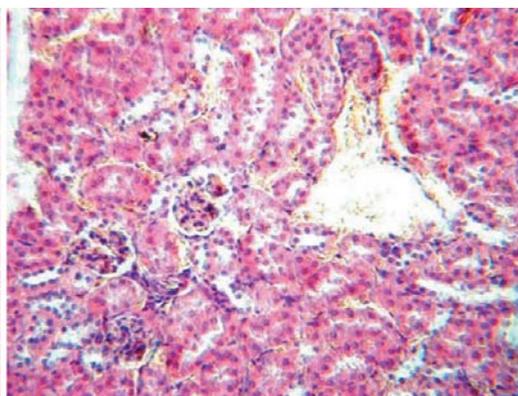


Рис. 9. Венозное полнокровие коры почки. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 200$.

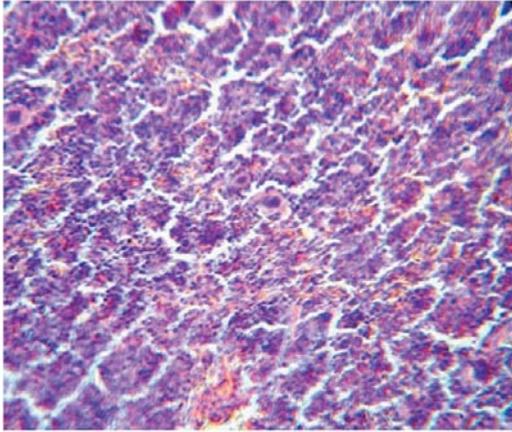


Рис. 10. Единичные мегакарициты в селезенке. Полнокровие. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

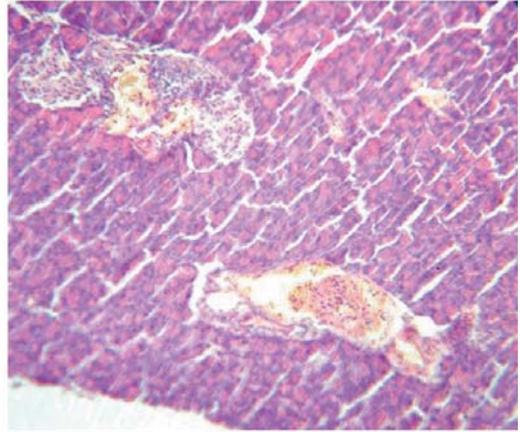


Рис. 11. Венозное полнокровие поджелудочной железы с умеренным лейкоцитозом. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

Поджелудочная железа (рис. 11). Венозное полнокровие (с умеренным лейкоцитозом у животного № 2). Инсулиновые островки просматриваются хорошо. Строма не изменена.

Тонкая кишка (рис. 12). Неравномерное кровенаполнение сосудов подслизистого слоя с преимущественным полнокровием вен. Круглоклеточная инфильтрация стромы слизистой оболочки и соединительной ткани ворсин, отек стромы последних. Незначительная круглоклеточная инфильтрация под-

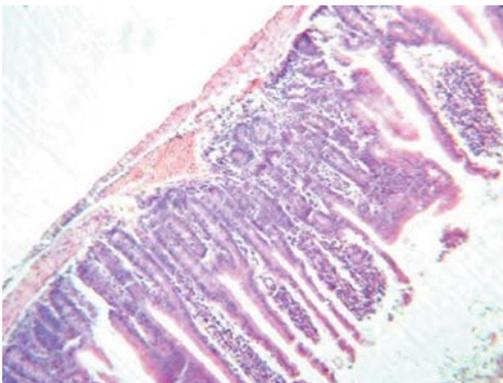


Рис. 12. Серозный энтерит. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x100.

слизистого слоя с невыраженным его отеком. Единичный мелкий фрагмент растительной клетчатки в просвете. Умеренное кровенаполнение прилежащей жировой клетчатки.

Клинические исследования указывают на достаточно тяжелое проявление токсического действия Цисплатинана со стороны ЖКТ в виде абдоминальных болей, диареи, запоров, тошноты и рвоты.

Заключение

Из-за межвидовых различий метаболизма существует значительная степень риска при экстраполяции результатов, полученных в экспериментах на животных, на физиолого-биохимические процессы, происходящие в организме человека, в частности процессы ацетилирования.

N-ацетилтрансфераза – один из ферментов второй фазы системы детоксикации, которая осуществляет N-ацетилирование (обычно дезактивация) ароматических и O-ацетилирование

(обычно активация) гетероциклических аминов, к которым относятся многие канцерогены и большинство антибластных лекарственных препаратов. NAT является ферментом, которому принадлежит важная роль в метаболизме эндогенных и чужеродных соединений ариламидной природы, включая противоопухолевые препараты.

Показано, что ген *Nat2* локализуется и экспрессируется преимущественно в печени, тогда как экспрессия гена *Nat1* у человека обнаружена почти во всех тканях, включая лейкоциты и эритроциты [15, 16, 20, 22]. Было отмечено, что ген *Nat1* начинает экспрессировать в ранний период развития человека [21]. В человеческой плаценте на ранних стадиях развития уровень экспрессии *Nat1* в 1000 раз выше уровня *Nat2* [24]. Позднее было показано, что этот ген начинает экспрессировать уже в эмбрионах, находящихся на стадии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции [23].

В течение многих десятилетий NAT1-изофермент был представлен в научной литературе как «мономорфный», поскольку биомодальность не была определена при активности N-ацетилирования в человеческих популяциях. Тем не менее, после клонирования генов NAT человека, было показано, что локус NAT1 является полиморфным [26], и на сегодняшний день в общей сложности 26 различных аллелей были зарегистрированы в NAT-номенклатуре базы данных. Из первых NAT1-аллелей, которые были описаны, NAT1*4 дикого типа отвечает за фенотип быстрого ацетилирования, и мутантный NAT1*10 [26]. Эти две аллели имеют одинаковые кодирующие области, но NAT1*10 содержит две

мутации в нетранслируемой области 3' (UTR), одна из которых (T1088-A) отменяет полиаденилирование сигнала гена. Первоначально сообщалось, что NAT1*10 связан с увеличением активности ацетилирования [13, 14].

Многочисленная литература указывает на субстратные свойства цисплатина в отношении фермента NAT. В дальнейшем было показано, что цисплатин является ингибитором NAT1. Нами было подтверждено это свойство цисплатина, но установлено его ингибирующее действие и на систему NAT2. NAT1 имеет оригинальный субстратно-специфичный профиль и в дополнение к метаболизму ксенобиотиков, включая цисплатин, который может участвовать в процессе ацетилирования эндогенных метаболитов [19, 27].

У взрослых мышей [25] и других грызунов [18] эквивалент человеческой *Nat1* экспрессируется в клетках Пуркинье мозжечка [25]. Исследования, проведенные на мозжечке взрослых людей, также показали аналогичную экспрессию *Nat1* в клетках Пуркинье [17]. Присутствие трансгена *Nat1* человека вызывало в печени мышей увеличение *Nat1* мРНК в 2-3 раза, тогда как у трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat2* человека количество эндогенной мРНК *Nat1* не значительно изменялось в печени, лёгких, почках и мозге. Эти данные определили выбор нами для исследования цисплатина: биомодель трансгенных мышей, несущих ген *Nat1hom*.

Было изучено влияние одноразового внутрижелудочного введения препарата Цисплатин в разных дозах на организм лабораторных мышей линий C57BL6/Y, SHK и мышей с геном *Nat1hom*.

Результаты острой токсикометрии выявили ЛД50 для каждой линии мышей. Для мышей линий C57BL6/Y и SHK LD50 составила 35,1 и 33,7 мг/кг соответственно. Для мышей с геном *Nat1hom* LD50 составила 56,3 мг/кг.

Картина интоксикации для всех изученных доз препарата была схожей: предположительно, животные умирали от остановки дыхания. У животных линий C57BL6/Y и SHK гибель наступала быстрее (в первые сутки после введения препарата), чем у животных с геном *Nat1hom*. Все выжившие животные через 4-5 дней приходили в норму. Анализ величин массовых коэффициентов не выявил каких-либо достоверных отличий как между группами животных, получавшими препарат, так и по отношению к контрольной группе.

Средняя масса тела всех выживших животных, получавших Цисплатин, равномерно увеличивалась. Динамика массы всех опытных групп животных не отличалась друг от друга, а также от контроля.

При гистологическом исследовании животных после внутрижелудочного введения Цисплатина в дозе 45 мг/кг обнаружены отек головного мозга с признаками острой энцефалопатии, что свидетельствует о преимущественном поражении центральной регуляции вегетативных стволовых центров (сосудодвигательного и дыхательного).

Обнаруженные изменения в миокарде (его неравномерное кровенаполнение с очагами ишемии, изменение тинкториальных свойств кардиомиоцитов, очаги фрагментации и извитого хода мышечных волокон) свидетельствуют о начале развития острой сердечной недостаточности, в пользу чего говорит наличие

венозного полнокровия внутренних органов (мозг, легкие, печень, почка, селезенка, поджелудочная железа), очаговые острые расстройства гемодинамики в легких.

Изменения, возникшие в тонкой кишке, могли бы быть объяснены результатом прямого либо резорбтивного действия перорального вводимого препарата, если бы не многочисленные клинические данные о серьезных и грубых нарушениях в ЖКТ после парентерального или инфузионного введения Цисплатина.

Следует также отметить, что по данным клинических исследований у пациентов, принимающих Цисплатин, обнаруживается нарушение электролитного баланса в виде гипомагниемии, гипокальциемии, гипонатриемии и гипофосфатемии. Гипомагниемия и/или гипокальциемия могут проявляться клинически повышенной мышечной чувствительностью или судорогами, тремором, карпопедальным спазмом (судороги в кистях и стопах) и/или тетанией. Гипонатриемия обычно обусловлена синдромом неадекватной продукции антидиуретического гормона. В наших исследованиях при введении трансгенным мышам линии *Nat1hom* субтоксических доз препарата это проявлялось в выраженной заторможенности, гиподинамией, резком снижении тонуса мышц с эпизодически возникающими генерализованными судорогами, заваливании на бок.

По данным клинических исследований Цисплатина [19], максимальная терапевтическая (переносимая) доза для человека составляет 200 мг/м², что ориентировочно соответствует дозе 5 мг/кг. По данным наших исследований, макси-

мально переносимой дозой для мышей с геном *Nat1hom* является доза 37,5 мг/кг, при которой ни одно животное не погибло. Использование таксономических расчетов и аллометрического масштабирования [3] соответствующих субтоксичных доз пересчета в системе «мышь-человек» составляет примерно 4,5 мг/кг. Повышенная устойчивость мышей с геном *Nat1hom* в сравнении с мышами линии C57Bl6/Y и SHK к токсическим эффектам Цисплатина дает основание предположить, что мыши с геном *Nat1hom* являются наиболее адекватными объектами для оценки безопасности антибластных препаратов.

Базируясь на концепции А. Альберта [1] о том, что избирательная токсичность – это способность лекарств воздействовать на специфичные клетки или метаболические звенья и не влиять на другие, мы подтвердили, что действие Цисплатина ориентировано на одну из мишеней – NAT, как по своим эффектам, так и по токсичности. Эффекты Цисплатина – как позитивные, так и негативные – проявляются в тех органах, где наиболее презентативна NAT-система. У трансгенных мышей, несущих ген *Nat1hom*, его экспрессия наиболее выражена и может быть количественно и качественно оценена при действии Цисплатина.

Представляет интерес сравнить приведенные данные с ранее полученными нами спектрофотометрическим кинетическим методом (по Эллману) результатами *in vitro* на экстрактах печени мышей линии C57BL6/Y об ингибиторной активности цисплатина. Оценивалась функциональная активность (IC_{50}) ингибитора цисплатина в дозе 45 мг/кг на фоне специфического субстрата сульфа-

метазин в дозах 5-20 мг/кг. Факторный анализ результатов эксперимента показал, что специфический субстрат снижал показатели летальности цисплатина на 20-35%.

Использование трансгенных гуманизированных животных, несущих ген *Nat1hom*, позволило нам не только уточнить параметры токсического действия препарата, но и выяснить некоторые доселе неизвестные механизмы их действия. Так, Цисплатин, согласно полученным данным, осуществляет свое фармакологическое действие на треть за счет вовлечения в него реакций N-ацетилирования и/или их ингибирования. Более того, в токсическом действии Цисплатина более 60% принадлежит ацетилтрансферазным процессам.

Трансгенные гуманизированные и химерные животные позволяют моделировать определенные механизмы генетического полиморфизма человека и его патологий для детальной оценки его индивидуальной чувствительности. Несмотря на известные проблемы и трудоемкость создания гуманизированных животных под задачи эксперимента, конечные результаты окупают финансовые и трудовые затраты. Новые горизонты в создании генетических и эпигенетических биомоделей открывает используемая нами CRISPR/Cas9-технология. Эта технология основана на использовании регулярно расположенных групп коротких палиндромных повторов, применяемых для создания принципиально новых генетических конструкций человека. CRISPR/Cas9-технология позволяет совершить прорыв в переходе от методов традиционной геномной инженерии и модификации генома к замене генных конструкций животных на человеческие

и быстрому созданию животных моделей не только болезней человека, но и биомоделей под задачи фармакологического эксперимента.

Благодарности

Авторы выражают свою признательность доценту О.В. Барановой за помощь в интерпретации результатов патморфологических исследований.

Список литературы

1. *Альберт А.* Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии. Т. 1. - М.: Медицина. 1989. 400 с.
2. ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».
3. *Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.* Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина. 2006. № 4. С. 85.
4. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 320 с.
5. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. - М.: Межакадемическое изд-во ВПК. 2007. 448 с.
6. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. - М.: Межакадемическое изд-во ВПК. 2004. 607 с.
7. *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.
8. *Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М.* Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы) // Биомедицина. 2014. № 4. С. 4-23.
9. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ: В кн. «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Медицина. 2005. С. 41-53.
10. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP). – РД 31,5-126-91. - М., 1992.
11. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. Миронова А.Н. - М.: Гриф и К. 2012.
13. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
14. *Badawi A.F., Hirvonen A., Bell D.A., Lang N.P., Kadlubar F.F.* Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder // CancerRes. 1995. N. 15. P. 5230-5237.
15. *Bell D.A., Badawi A.F., Lang N.P., Ilett K.F., Hirvonen A.* Polymorphism in the N-acetyltransferase (NAT1) polyadenylation signal: association of the NAT1*10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue // CancerRes. 1995a. N. 55. P. 5226-5229.
16. *Cribb A.E., Grant D.M., Millar M.A., Speilberg S.P.* Expression of monomorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes // J. Pharmacol. exp. ther. 1991. N. 259. P. 1241-1246.
17. *Hickman D., Pope J., Patil S.D., Fakis G., Smelt V.M., Stanley L.A., Payton M.A., Unadkat J.D., Sim E.* Expression of arylamine N-acetyltransferase in human intestine // Gut. 1998. N. 42. P. 402-409.
18. *Johnson N., Troen A., Fernando S., Warren D., Nagy Z., Smith A.D., Sim E.* Investigation of W-acetyltransferase (NAT1) in Alzheimer's disease: identification of a novel NAT1 allelic variant // Eurotox. London. 2000.
19. *King C.M., Land S.J., Jones R.F., Debiec-Rychter M., Lee M.S., Wang C.Y.* Role of acetyltransferases in the metabolism and carcinogenicity of aromatic amines // Mutat. Res. 1997. N. 376. P. 123-128.
20. *Markman M., D'Acquisto R., Iannotti N., et al.* Phase-1 trial of high-dose intravenous cisplatin with simultaneous intravenous sodium thiosulfate // J. Cancer Research and Clinical Oncology. 1991. Vol. 117. Iss. 2. P. 151-155.
21. *Ohsako S., Deguchi T.* Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases of human liver // J. Biol. chem. 1990. N. 265. P. 4630-4634.
22. *Pacific I.G.M., Benicini C., Rane A.* Acetyltransferases in humans: development and tissue distribution // Pharmacology. 1986. N. 32. P. 283-291.

23. Risch A., Smelt V., Lane D., Stanley L.A., van der Slot W., Ward A., Sim E. Arylamine N-acetyltransferase in erythrocytes of cystic fibrosis patients // Pharmacol. toxicol. 1996. N. 78. P. 235-240.
24. Smelt V.A., Upton A., Adjaye J., Payton M.A., Boukouvala S., Johnson S., Mardon H.J., Sim E. Expression of arylamine/V-acetyltransferases in pre-term placentas and in human pre-implantation embryos // Hum. mol. genet. 2000. N. 9. P. 1101-1107.
25. Smelt V.A., Mardon H.J., Sim, E. Placental expression of arylamine N-acetyltransferases: evidence for linkage disequilibrium between *NAT1*10* and *NAT2*4* alleles of the two human arylamine N-acetyltransferase loci *NAT1* and *NAT2* // Pharmacol. toxicol. 1999. N. 83. P. 149-157.
26. Stanley L.A., Mills I.G., Sim E. Localization of polymorphic A'-acetyltransferase (NAT2) in tissues of inbred mice // Pharmacogenetics. 1997. N. 7. P. 121-130.
27. Vatsis K.P., Weber W.W. Structural heterogeneity of Caucasian N-acetyltransferase at the *NAT1* gene locus // Arch. biochem. biophys. 1993. N. 301. P. 71-76.
28. Weber W.W., Vatsis K.P. Individual variability in p-amino-benzoic acid acetylation by human N-acetyltransferase (*NAT1*) of peripheral blood // Pharmacogenetics. 1993. N. 3. P. 209-212.

A new model for the evaluation of selective toxicity of antineoplastic funds in transgenic mice with human genes *Nat1hom*

N.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze, N.V. Petrova

The toxicity of the drug Cisplatin after intragastric administration was assessed on humanized transgenic mice with human genes *Nat1hom*. The evaluation was conducted in comparison with mice lines C57BL6/Y ("fast" type of acetylation) and line SHK ("slow" type of acetylation). LD50 for mice *Nat1hom* amounted to 56,3 mg/kg, for mice of the C57BL6/Y – 35,1 mg/kg, for mice line SHK – 33,7 mg/kg. The death of animals C57BL6/Y and SHK line was observed within 1-6 hours after administration and in mice *Nat1hom* – a day after the introduction. There were lethargy, lack of exercise, a sharp decline in muscle tone with episodic generalized convulsive episodes, collapsing on its side in animals of all lines closely to lethal condition. The autopsy of the dead animals showed signs of congestive venous plethora of internal organs, edema of the meninges with a single bleeding under the lining of the brain. After administration of Cisplatin at a dose of 45-55 mg/kg in histological research there were detected cerebral edema with signs of acute encephalopathy and changes in the myocardium, which indicate the early development of acute heart failure. Venous plethora manifested in all internal organs and in the brain. Lower level of toxicity of Cisplatin in mice with human genes *Nat1hom*, authors explain the presence of the human gene with the "fast" type of acetylation. It is concluded that in the metabolism and detoxification of Cisplatin, as well as reducing its toxicity, more than 60% N-acetyltransferase processes. The creation of transgenic humanized mice can be based on the use of CRISPR/Cas9 technology. Proposed a new model of humanized transgenic mice with the gene *Nat1hom* for preclinical researches of anticancer drugs.

Key words: toxicity of antineoplastic drugs, Cisplatin, humanized transgenic mice with the gene *Nat1hom*, mouse C57BL6/Y and SHK lines, histomorphology, real-time PCR, CRISPR/Cas9 technology.

Влияние транскраниальной низкочастотной электростимуляции головного мозга на спектральные характеристики ультразвуковой вокализации мини-свиней светлогорской популяции

В.Н. Каркищенко¹, Ю.В. Фокин¹, Д.Б. Чайванов², Ю.А. Чудина²,
А.А. Николаев^{1,2}

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

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, fokin-yuri@ya.ru;
к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, chaivanov@ya.ru

В работе приведен сравнительный анализ параметров ультразвуковой вокализации мини-свиней светлогорской популяции в состоянии спокойного бодрствования и под воздействием электросна. Сходной характеристикой обоих состояний является преобладание спектральной плотности мощности ультразвука на частотах 15-20 кГц. Состояния спокойного бодрствования и электросна различаются спектральной плотностью мощности в интервалах 20-30 и 32-38 кГц. Эти эффекты могут отражать взаимосвязь ультразвуковой вокализации и цикла дыхания. Анализ ультразвуковой вокализации животных при действии электросна может быть рекомендован в качестве модельного метода оценки гипногенных эффектов фармакологических средств, а также доклинических исследований средств, обладающих снотворным и другими сходными действиями.

Ключевые слова: ультразвуковая вокализация, электросон, низкочастотная ритмическая электростимуляция, спектральная плотность мощности, мини-свиньи.

Введение

Наличие феномена ультразвуковой вокализации (УЗВ) экспериментально подтверждено у разных млекопитающих: как у относительно мелких животных (крыс, мышей, морских свинок, летучих мышей) [12], так и у более крупных, например, у кроликов, мини-свиней и обезьян; у человека УЗВ регистрируется, в основном, при физических и эмоциональных нагрузках [2].

Феномен УЗВ состоит в том, что животные генерируют УЗВ-сигналы в диапазоне, неслышимом для человеческого уха, и, как показывают иссле-

дования, способны воспринимать и реагировать на такие сигналы от своих сородичей, а также воспроизводить или повторять их [8].

Наиболее широко изучен феномен УЗВ у грызунов – в частности, у крыс. Способность производить УЗВ-сигналы, по мнению исследователей, связана с особенностями устройства гортани грызунов и с наличием в ней специфического свистящего механизма [6], а также с особенностями модуляции дыхательного цикла [12]. Восприятие ультразвука, связанное с возможностью распознавать УЗВ сородичей, обусловлено наличием

нейронов, избирательно настроенных на характеристики (частота и интенсивность) ультразвукового сигнала, в первичной слуховой коре крыс [10]. Таких нейронов, как отмечают авторы работы, в первичной слуховой коре этих животных – множество, и интенсивность их ответа напрямую зависит от частотных характеристик естественного ультразвукового сигнала.

Экспериментально было доказано, что УЗВ может использоваться как метод оценки положительных и отрицательных эмоциональных и мотивационных состояний животных, уровня стрессового воздействия, а также особенностей коммуникативного поведения. Такие характеристики ультразвука, как узконаправленность, быстрое затухание и рассеивание сигнала уменьшают успешность локализации его источника, что делает данный механизм удобным приспособлением для близкой коммуникации в условиях опасности [6].

Тестирование УЗВ лабораторных крыс в различных стрессовых состояниях показало зависимость динамики ее изменений от уровня стрессорного воздействия [5]. Исходное комфортное состояние животных характеризуется преобладанием спектральной плотности мощности (СПМ) УЗВ в частотном диапазоне 30-60 кГц и изменяется под воздействием стресс-факторов. Например, состояние полной иммобилизации вызывает смещение максимальной СПМ УЗВ в диапазон 20-30 кГц, а электрокожное раздражение приводит к расширению частотного диапазона УЗВ от 20 до 80 кГц).

УЗВ мини-свиней в состоянии спокойного бодрствования характеризуется максимальными значениями СПМ на

частоте около 21-22 кГц, наличием дополнительных пиков на 27-28 и 35 кГц. Далее СПМ УЗВ снижается по мере возрастания частоты, т.е. ультразвук частотой более 58 кГц у мини-свиней выражен плохо [2]. Забегая вперед, отметим, что результаты настоящей работы в целом подтверждают эти данные, полученные ранее.

Выполняя коммуникативные функции, УЗВ также является и индикатором психоэмоционального состояния животных. В частности, максимальные значения СПМ УЗВ крыс в диапазоне частот 20-30 кГц являются показателем дискомфорта с признаками тревоги, волнения и дистресса, а полоса 35-45 кГц – показателем комфортного состояния [4, 14]. Эти исследования согласуются с многочисленными экспериментами по изучению УЗВ взрослых крыс, у которых были выделены два паттерна УЗВ, характеризующиеся разными частотами. Первый паттерн УЗВ частотой 22 кГц является реакцией взрослой особи на появление опасного или отрицательного стимула и соответствует «крику опасности», второй паттерн характеризуется частотой 50 кГц и соответствует позитивному или нейтральному состоянию животного и обозначается как «крик желания» и покоя [8, 13]. Более подробные исследования второго паттерна показали, что УЗВ частотой 50 кГц возникает на гедонические стимулы и подавляется отрицательными воздействиями. Эту вокализацию, в отличие от первого паттерна, животные охотно воспроизводят, и периодичность ее воспроизведения определяется ценностью ожидаемой награды [9]. Рассмотренные типы, или паттерны, УЗВ крыс различаются акустическими параметрами, их

возникновение определяется активацией разных восходящих путей переднего мозга: УЗВ частотой 22 кГц связана с активацией холинергической системы, а УЗВ частотой 50 кГц сопровождается возбуждением дофаминергической системы [7, 11]. Следовательно, формирование этих специфических паттернов УЗВ провоцируется активацией соответствующих нейрхимических систем мозга, что, в частности, указывает на их связь с разными эмоциональными состояниями животного.

Изучение УЗВ других млекопитающих, кроме мелких грызунов, пока не получило широкого распространения. Экспериментальные исследования, проведенные на базе НЦБМТ ФМБА России, показали, например, определенные графические сходства в картине УЗВ кроликов и мини-свиней, состоящие в снижении СПМ генерируемой УЗВ с нарастанием ее частоты, а также в прямой взаимосвязи частоты встречаемости УЗВ-сигнала с его спектральной мощностью.

Целью настоящей работы явился анализ характеристик УЗВ мини-свиней светлогорской популяции под влиянием транскраниальной низкочастотной электростимуляции головного мозга для дальнейшего применения данной модели в качестве метода оценки гипногенных эффектов фармакологических средств, а также доклинических исследований средств, в т.ч. обладающих снотворным и другими сходными действиями.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Исследования проводили на базе НЦБМТ ФМБА России. Запись эксперименталь-

ных данных осуществлялась на самцах мини-свиней светлогорской популяции в возрасте 1-1,5 года. В эксперименте принимали участие четыре особи, из которых по результатам анализа отобрали трех (от четвертой мини-свиньи не было получено убедительных данных по УЗВ).

Все мини-свиньи содержались в индивидуальных станках при температуре воздуха 18-22°C и относительной влажности 60-70%. Животных кормили комбикормом ПК-58 и давали очищенную водопроводную воду.

Регистрация УЗВ. Запись волн ультразвукового диапазона осуществлялась с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды), установленных на расстоянии 20-25 см от головы животного. В процессе записи информативных параметров УЗВ в данном исследовании было учтено наличие ультразвуковых шумов, производимых системами отопления, вентиляции и сопряженных с работой компьютера, были применены способы устранения этих ультразвуковых шумов [3]. Ультразвуковые сигналы записывались в цифровом формате, частота дискретизации – 200 кГц. УЗВ-показатели каждого животного фиксировали отдельно. Регистрация УЗВ осуществлялась в два этапа, продолжительность каждого из которых составляла 30 мин. Первый этап записи УЗВ осуществляли у животного, находящегося в состоянии спокойного бодрствования, второй этап – у животного, подвергавшегося воздействию электросна.

Процедура электросна. Состояние электросна у мини-свиней светлогорской популяции достигалось с помощью низкочастотной (6 Гц) ритмической электрической стимуляции,

осуществлявшейся через глазничные и затылочные электроды, по которым на мозг подавались импульсы прямоугольной формы [1]. Переход животного в состояние сна подтверждали на основе изменения его физиологических и поведенческих реакций. Ритмическая стимуляция мозга осуществлялась с помощью бытового прибора «Электросон – ЭГСАФ-01».

Обработка данных. Первичная обработка полученных данных УЗВ заключалась в удалении физических артефактов, представленных монотонными шумами, и проведении спектрального анализа ультразвука путем быстрого преобразования Фурье, осуществляемого в частотной полосе 15-100 кГц (эпоха анализа – 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье – 2000 интервалов). Обработку проводили с помощью пакета программ SKILAB-5.4 методом Уэлча (функция *pwelch*). В результате получали значения СПМ по каждой частоте УЗВ.

Результаты и их обсуждение

В результате усреднения данных, полученных от всех животных отдельно по каждому этапу исследования, были построены графики зависимости СПМ от частоты УЗВ в состоянии спокойного бодрствования и во время электросна, представленные на рисунке. Сравнительный анализ показал практически их слияние в области 15-19 кГц и некоторые различия в остальном анализируемом диапазоне, выражающиеся, в основном, в увеличении СПМ УЗВ под воздействием электросна при схожем графическом характере двух кривых. Иными словами, воздействие низкочастотной ритмической электростимуля-

ции улучшает способность мини-свиней генерировать УЗВ-сигналы во время электросна по сравнению с состоянием спокойного бодрствования. Значимые различия в СПМ УЗВ двух этапов исследования были выявлены для диапазонов частот 20-30 и 32-38 кГц, являющихся типичными для УЗВ мини-свиней [2].

Повышение СПМ УЗВ во время сна, вызванного низкочастотной ритмической электростимуляцией, может быть связано с изменениями параметров дыхания, которое во сне углубляется и перестает зависеть от необходимости передавать коммуникативные сигналы.

В работах некоторых исследователей у млекопитающих была обнаружена связь между УЗВ и дыхательным циклом, которая может проявляться в виде встраивания УЗВ в нормальный цикл дыхания или в виде модуляции (изменения) дыхательного цикла со стороны УЗВ для передачи ультразвукового сигнала нужной длительности. Первый тип взаимосвязи УЗВ и дыхания характерен для летучих мышей и др. млекопитающих, производящих УЗВ с той же частотой, что и крысы [14], второй тип обнаружен у мышей, человекообразных и нечеловекообразных обезьян [12]. Сравнительный анализ временных паттернов УЗВ и дыхания у летучих и лабораторных мышей показал наличие существенных различий. У летучих мышей механизм формирования эхолокационных УЗВ-сигналов высоко коррелирует с циклом дыхания. Напротив, у лабораторных мышей формирование УЗВ оказывается практически не зависимым от цикла дыхания, что позволяет предположить сходство механизмов генерации паттернов УЗВ мышей с таковыми у приматов [12].

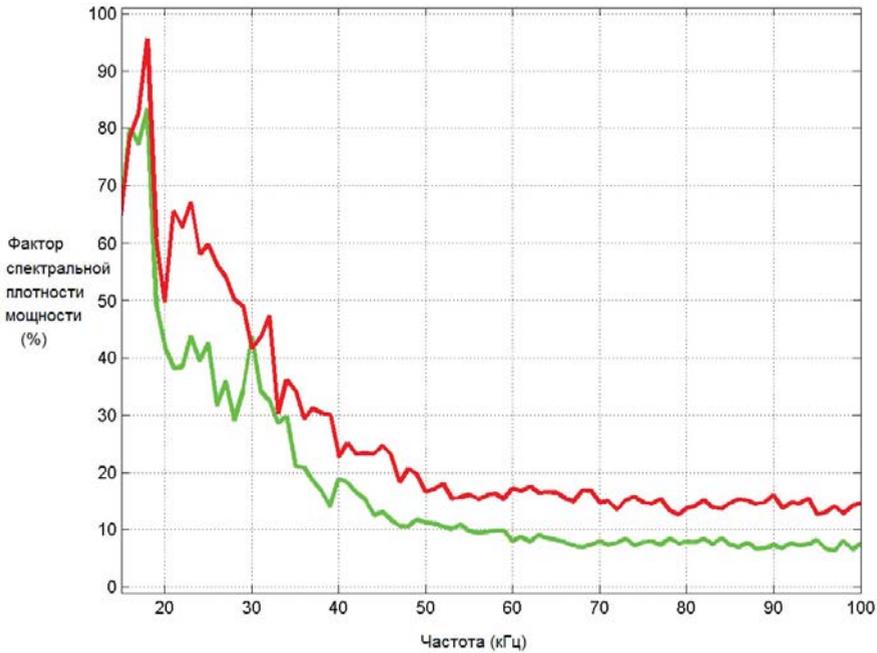


Рис. УЗВ мини-свиней в состоянии спокойного бодрствования (зеленая кривая) и электросна (красная кривая). По оси абсцисс – частота (кГц), по оси ординат – СПМ (%).

В проведенной работе показано, что в состоянии электросна СПМ УЗВ мини-свиней в целом растет и значимо увеличивается для определенного диапазона частот, что может быть следствием торможения систем взаимодействия с окружающей средой, в т.ч. обеспечивающих передачу социальной информации с помощью УЗВ. Другими словами, в состоянии электросна УЗВ мини-свиней появляется как результат прохождения воздуха через гортань, которое не несет коммуникативной или другой социальной информации. Интересным является сравнение отдельных частот УЗВ спящей и бодрствующей мини-свиньи. Для состояния спокойного бодрствования этих животных характерно наличие наибольших зна-

чений СПМ УЗВ на частотах 18, 23-25 и 30 кГц, в то время как для состояния электросна наибольшие значения СПМ УЗВ появляются для частот 17 и 21-23 кГц. Это, предположительно, может указывать на то, что УЗВ частотой 17-25 кГц является следствием дыхательных движений гортани и поэтому проявляется в обоих состояниях, а УЗВ частотой 30 кГц, которая возникает только во время бодрствования, отражает процесс собственно вокализации, связанной с биосоциальными условиями обитания. Полученные результаты, возможно, свидетельствуют о том, что мини-свиньи являются животными вторым типом взаимосвязи УЗВ и дыхания, предполагающим наличие модуляционных эффектов УЗВ.

Выводы

Проведенное исследование подтверждает наличие у мини-свиней светлогорской популяции феномена УЗВ, максимальные значения СПМ которой принадлежат частотному диапазону 17-35 кГц и затем снижаются по мере возрастания частоты.

Сравнительный анализ УЗВ в состоянии спокойного бодрствования и при воздействии низкочастотной электростимуляции выявил различия в частотно-спектральных характеристиках УЗВ. СПМ УЗВ во время электросна на всем анализируемом частотном диапазоне больше, чем в состоянии спокойного бодрствования. Кроме того, в состоянии спокойного бодрствования обнаруживается пик СПМ УЗВ на частоте около 30 кГц, отсутствующий в УЗВ при электросне. Возможно, данный эффект является характерным признаком состояния спокойного бодрствования и следствием модуляции ультразвуковой вокализацией дыхательного цикла.

Анализ информативных параметров УЗВ мини-свиней под влиянием транскраниальной низкочастотной электростимуляции головного мозга может быть рекомендован в качестве метода оценки гипногенных эффектов фармакологических средств, а также доклинических исследований средств, в т.ч. обладающих снотворным и другими сходными действиями.

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., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капаназе Г.Д., Чайванов Д.Б.* Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. 2011. № 1. С. 4-23.

3. *Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Фокин Ю.В.* Рекомендации по устранению шумов при записи параметров ультразвуковой вокализации животных и человека // Вестник Психофизиологии. 2012. № 1. С. 45-47.
4. *Фокин Ю.В.* Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения на вокализацию крыс в ультразвуке // Биомедицина. 2012. № 2. С. 84-91.
5. *Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н.* Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения и физической нагрузки фармакодинамики лекарств // Биомедицина. 2010. № 5. С. 17-21.
6. *Brudzynski S.M., Neville H.* Fletcher Rat ultrasonic vocalization: short-range communication // Handbook of mammalian vocalization. 2010. No. 3. P. 69-76.
7. *Brudzynski S.M.* Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches // ILAR J. 2009 Vol. 50 Iss. 1. P. 43-50.
8. *Burgdorf J., Kroes R.A., Moskal J.R., Pfau J.G., Brudzynski S.M., Panksepp J.* Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback // J. comp. psychol. 2008. Vol. 122(4). P. 357-67.
9. *Burgdorf J., Moskal J.R.* Frequency modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations reflect a positive emotional state in the rat: neural substrates and therapeutic implications // Handbook of mammalian vocalization. - Oxford: Academic Press. 2009. P. 209-214.
10. *Carruthers I.M., Natan R.G., Geffen M.N.* Encoding of ultrasonic vocalizations in the auditory cortex // J. Neurophysiol. 2013. Vol. 109. P. 1912-1927.
11. *Ciucci M.R., Ahrens A.M., Ma S.T., Kane J.R., Windham E.B., Woodlee M.T., Schallert T.* Reduction of dopamine synaptic activity: degradation of 50-kHz ultrasonic vocalization in rats // Behav. Neurosci. 2009. Vol. 123(2). P. 328-336.
12. *Hage S.R., Gavrilov N., Salomon F., Stein A.M.* Temporal vocal features suggest different call-pattern generating mechanisms in mice and bats // BMC Neuroscience 2013. Vol. 14. P. 99.

13. Portfors C.V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice // J. of the American Association for laboratory animal science. 2007. No 1. Vol. 46. P. 28-34(7).

14. Sirotnin Y.B., Costa M.E., Laplagne D.A. Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior // Frontiers in behavioral neuroscience. 2014. Vol. 8, Art. 399. P. 1-12.

Influence of low-frequency transcranial electrostimulation of the brain on the spectral characteristics of ultrasonic vocalizations of mini-pigs of Svetlogorsk population

**V.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina,
A.A. Nikolaev**

The article presents a comparative analysis of the parameters of ultrasonic vocalizations of mini-pigs of Svetlogorsk population in the state of wakefulness and when exposed to electric sleep. Similar characteristics of both conditions is the prevalence of the power spectral density of ultrasound at frequencies of 15-20 kHz. The states of wakefulness and electric sleep have different spectral power density in the intervals 20-30 and 32-38 kHz. These effects may reflect the relationship of ultrasonic vocalizations and breathing cycle. The analysis of ultrasonic vocalization of animals when exposed to electric sleep can be recommended as a modeling method of evaluating of the hipnogen effects of pharmacological means, and also preclinical researches of the means possessing sleeping pill and other similar actions.

Key words: ultrasonic vocalization, electric sleep, low-frequency rhythmical electrical stimulation, spectral power density, mini-pigs of Svetlogorsk population.

Новые модели изучения воспалительной активности

И.А. Дьяченко^{1,2}, В.А. Паликов^{1,2}, Ю.А. Паликова^{1,2}, Я.А. Андреев³,
А.Н. Мурашёв^{1,2}

¹ – Филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Пуцино

² – Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино

³ – ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва

Контактная информация: Дьяченко Игорь Александрович, dyachenko@bibch.ru

В исследовании представлен поведенческий тест на химическое воздействие для определения анальгетической активности и оценки воспалительного процесса. Тест отвечает современным требованиям к исследованию фармакологически активных веществ, проявляющих анальгетическую активность, и гуманному обращению с экспериментальными животными.

Ключевые слова: модель *in vivo*, поведенческий тест, воспалительный процесс, анальгетическая и противовоспалительная активность.

Введение

Проведение всестороннего изучения активности потенциального лекарственного вещества (ЛВ) в экспериментах на животных является основной частью доклинических испытаний фармакологического исследования. На сегодняшний день исследование новых ЛВ, обладающих противовоспалительной активностью, занимает около 15% от общего числа исследований в мире [7]. Независимо от причин возникновения, многие острые и хронические заболевания сопровождаются болью и воспалением, резко снижающими качество жизни человека, его социальную адаптацию, вызывая постоянные страдания.

Воспаление – это комплексный местный и общий патологический процесс, возникающий в ответ на повреждение (*alteratio*) клеточных структур организма или действие патогенного

раздражителя и проявляющийся в реакциях (*exudatio* и др.), направленных на устранение продуктов повреждения, а если возможно, то и агентов (раздражителей), а также приводящий к максимальному для данных условий восстановлению (*proliferatio* и др.) в зоне повреждения. Именно воспалительный процесс является одной из основных причин обращения людей за врачебной помощью. Более 60% заболеваний ассоциированы с воспалением. Около 5% человечества страдает от хронического воспаления. Ежедневно свыше 12 млн человек в мире принимают какой-либо противовоспалительный препарат. Однако их прием является одной из самых типичных причин нежелательных реакций на фармакотерапию. По официальным оценкам, в США использование ненаркотических анальгетиков и нестероидных противовоспалительных пре-

паратом ежегодно приводит более чем к 70 тыс. госпитализаций и 7 тыс. смертельных случаев [1].

Еще в конце XIX столетия И.И. Мечников считал, что воспаление – это приспособительная и выработанная в ходе эволюции реакция организма. Одним из важнейших ее проявлений служит фагоцитоз микрофагами и макрофагами патогенных агентов и обеспечение таким образом выздоровления организма. Но репаративная функция воспаления была для И.И. Мечникова сокрыта. Подчеркивая защитный характер воспаления, он в то же время полагал, что целительная сила природы, которую и представляет собой воспалительная реакция, не есть еще приспособление, достигшее совершенства. По мнению И.И. Мечникова, доказательством этого являются частые болезни, сопровождающиеся воспалением, и случаи смерти от них [2].

Внешние признаки воспаления определил уже древнеримский писатель Авл Корнелий Цельс:

- 1) «*rubor*» (краснота, покраснение, эритема);
- 2) «*tumor*» (опухоль, в данном случае – припухлость, т.е. отёк);
- 3) «*calor*» (жар, гипертермия – повышение местной температуры);
- 4) «*dolor*» (боль).

Дополнил Клавдий Гален (130-200 гг. н.э.), добавив «*functio laesa*» (нарушение функции).

Недавнее открытие и описание семейства рецепторов TRPV-1 и TRPA-1 предоставило ряд новых потенциально терапевтических мишеней для лечения хронической боли. Последние отчеты показали, что каналы TRPA-1 могут играть важную роль в возникновении боли воспалительного генеза,

спровоцированной введением CFA и формалина [4, 6]. Принципиальное значение, с точки зрения понимания воспалительной боли и механизма действия анальгезирующих и противовоспалительных препаратов, играет разработка новых биомоделей. Аллилизотиоционат (АИТС) является агонистом TRPA-1-канала, тем самым способствуя развитию острой и воспалительной боли [3, 5]. Способность воздействовать на TRPA-1-каналы дает возможность моделировать острую и воспалительную боль, и на основе этой биомодели изучать активность новых препаратов.

Целью данной работы явилась разработка биомодели, которая в дальнейшем помогла бы исследовать терапевтический потенциал фармакологического TRPA-1 антагонизма для лечения воспалительных и нейропатической болей.

Материалы и методы

Исследование проводилось на мышцах CD-1 в возрасте 8-10 недель. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН и имели статус СПФ, подтверждаемый сертификатом производителя.

Лаборатория биологических испытаний Филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН имеет свидетельства об аккредитации Словацкой национальной службы аккредитации (SNAS), Росаккредитации, Международной организации AAALAC по гуманному обращению с лабораторными животными, что свидетельствует о высоком качестве выполняемой работы.

Все процедуры по рутинному уходу за животными выполнялись в соответствии со стандартными операционными процедурами лаборатории. Животные содержались в комнате барьерного типа, в контролируемых условиях окружающей среды (20-24°C и 28-63% относительная влажность). Температура и влажность постоянно контролировались с помощью системы мониторинга EVL. В комнате содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час.

Мышам субплантарно в заднюю лапу вводился АИТС в различных концентрациях согласно групповой принадлежности (табл.). Контрольной группе вводился физиологический раствор. После чего в течение 5 мин фиксировалось количество облизываний задней лапы и время её поджатия.

Также измерялся диаметр подушечки задней лапы до момента введения вещества и через 2, 4, 6 и 24 ч после введения с помощью электронного штангенциркуля.

Для всех полученных данных была применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение (Mean) и стандартная ошибка среднего (SEM). Экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента для независимых рядов, расчёты результатов проводились

в пакете компьютерных программ «MS Excel 2010». Изменения исследуемых показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Полученные данные в результате подсчета количества облизываний задней лапы показывают прямую зависимость «доза-эффект». Так, при введении АИТС в концентрации 0,05% количество облизываний составляет, в среднем, 3 раза, а при 1% концентрации количество облизываний составило, в среднем, 20 раз (рис. 1). Следует заметить, что животные из группы с физиологическим раствором не облизывали лапу, в которую вводили вещество. Различия между группами статистически достоверны.

В данном тесте к значимым результатам можно отнести время поджатия задней лапы в течение 5-ти мин с момента введения вещества. Обнаружена четкая зависимость между концентрацией АИТС и временем поджатия лапы (рис. 2). Такие концентрации АИТС, как 0,5% и 1%, имеют ярко выраженный и хорошо прослеживаемый эффект, что позволит оценить анальгетическую активность новых фармакологически активных веществ. Все группы имеют достоверные отличия между собой и относительно контрольной группы.

Таблица

Распределение животных по группам

Номер группы	Кол-во животных (n)	Вещество	Концентрация вещества	Объем введения (мл)
1	5	Физ. р-р.	0,9%	0,02
2	5	АИТС	0,05%	0,02
3	5	АИТС	0,1%	0,02
4	5	АИТС	0,5%	0,02
5	5	АИТС	1%	0,02

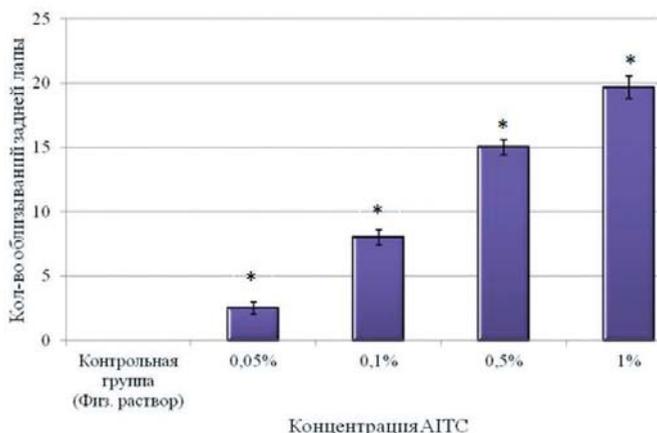


Рис. 1. Сравнение количества облизываний задней лапы мышей CD-1 в течение 5-ти мин после однократного субплантарного введения физиологического раствора и аллилизотиоционата (АИТС) в 4-х концентрациях: 0,05; 0,1; 0,5; 1%.

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно предыдущей группы по t-критерию Стьюдента.

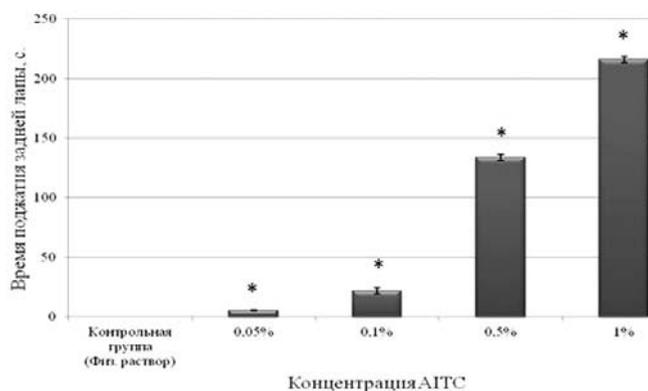


Рис. 2. Сравнение время поджатия задней лапы мышей CD-1 в течение 5-ти мин после однократного субплантарного введения физиологического раствора и аллилизотиоционата (АИТС) в 4-х концентрациях: 0,05; 0,1; 0,5; 1%.

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно предыдущей группы по t-критерию Стьюдента.

Измерение диаметра подушечки задней лапы в различных временных точках показывает, что группы, которым вводили АИТС в концентрациях 0,5% и 1%, имеют наиболее выраженное проявление в виде отека лапы (рис. 3). Максимальный объем лапы достигается уже через 2 ч после введения. Между собой обе эти группы не имеют достоверных отличий ни в од-

ной из временных точек. Группы мышей, которым вводили АИТС в концентрациях 0,05% и 0,1%, достоверно отличаются от контрольной группы и от групп с 0,5% и 1% АИТС во временных точках 2, 4 и 6 ч. Между собой обе эти группы достоверно неотличимы. Объем лапы у всех групп через 24 ч достоверно не отличается и приближен к первоначальным значениям.

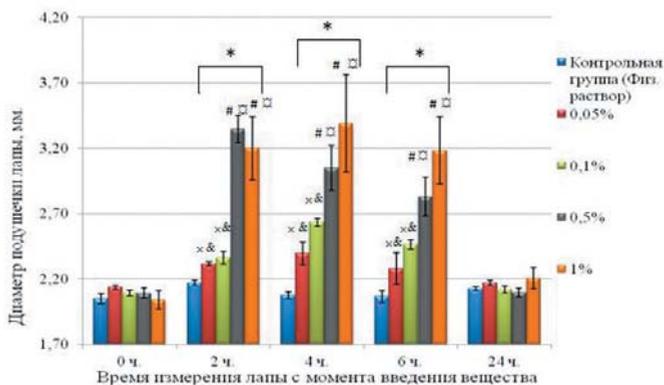


Рис. 3. Сравнение диаметра подушечки задней лапы мышей CD-1 в различные временные точки после однократного субплантарного введения физиологического раствора и аллилизотиационата (АИТС) в 4-х концентрациях: 0,05; 0,1; 0,5; 1%.

Примечания: * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

– $p < 0,05$ относительно группы с концентрацией АИТС 0,05% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

□ – $p < 0,05$ относительно группы с концентрацией АИТС 0,1% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

× – $p < 0,05$ относительно группы с концентрацией АИТС 0,5% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента;

& – $p < 0,05$ относительно группы с концентрацией АИТС 1% для соответствующей временной точки по t-критерию Стьюдента.

Выводы

В работе представлены основные направления по изучению анальгетической и противовоспалительной активности новых фармакологических веществ. При проведении доклинических исследований препаратов с предполагаемым анальгезирующим эффектом следует использовать АИТС в концентрации 1% и фиксировать количество облизываний и время поджатия задней лапы. Оценку противовоспалительной активности препаратов рекомендуется проводить с использованием вещества АИТС в концентрации 0,5%, измеряя диаметр подушечки задней лапы. Данная концентрация имеет достаточно выраженный ответ в виде отека задней

лапы. Учитывая отсутствие достоверных отличий от более высокой концентрации 1%, использование 0,5% АИТС более предпочтительно с точки зрения гуманности.

Данный тест полностью отвечает требованиям к доклиническим испытаниям новых фармакологически активных анальгетических средств в соответствии с ГОСТ Р53434-2009 «Национальный стандарт РФ Принципы надлежащей лабораторной практики (Principles of good laboratory practice)», утвержденным 01.03.2010 г.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00118).

Список литературы

1. *Аляутдин Р.Н., Романов Б.К., Давыдова О.Н., Чубарев В.Н.* Методические рекомендации для обучаемых. Фармацевтический факультет ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава. - М. 2006.
2. *Струков А.И., Серов В.В.* Патологическая Анатомия. 5-е издание. 2010. С. 169.
3. *Guimaraes M.Z.P., Jordt S.-E.* TRP Ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades. Chapter 11TRPA1: A sensory channel of many talents: CRC Press. 2007.
4. *Hatakeyama Y., Takahashi K., Tominaga M., Kimura H., Ohta T.* Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons // *Mol. Pain.* 2015 May 2; 11:24. Doi: 10.1186/s12990-015-0023-4.
5. *Lumpkin E.A., Caterina M.J.* Mechanisms of sensory transduction in the skin // *Nature.* 2007. V. 445. N. 7130. P. 858-865.
6. *McNamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M.* TRPA1 mediates formalin-induced pain // *PNAS.* 2007. V. 104. N. 33.
7. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm190729.html>, свободный. - Загл. с экрана. - Яз. рус., англ.

New models of studying of inflammatory activity

I.A. Diyachenko, V.A. Palikov, Yu.A. Palikova, Ya.A. Andreyev, A.N. Murashev

The article describes the behavioral test that uses the chemical effect to determine the analgesic activity and evaluation of the inflammatory process. It meets contemporary requirements for a study of the pharmacologically active materials with analgesic activity, and to ethical treatment of experimental animals.

Key words: *in vivo* models, behavioral test, inflammatory process, analgesic and anti-inflammatory activity.



Анализ поведенческих характеристик и ультразвуковой вокализации лабораторных крыс при фармакологической коррекции их психоэмоционального состояния

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

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

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

Интерпретация психоэмоционального состояния лабораторных животных по анализу их свободного поведения и параметров ультразвуковой вокализации является ценным инструментом доклинического исследования медицинских технологий и фармакологических средств.

Ключевые слова: поведение, ультразвуковая вокализация, психоэмоциональное состояние, фармакологическая коррекция, крысы.

Введение

Применение фармакологических средств позволяет изменить функциональное состояние животных, что может проявиться в картине их поведения и вокализации в ультразвуковом диапазоне (УЗВ) [2-4]. Однако для выявления некоторых специфических видов психофармакологической активности необходимо предварительно смоделировать измененное состояние у животных. Так, например, для выявления транквилизирующего (анксиолитического) действия необходимо моделировать эмоциональный стресс, для антидепрессивного – состояние депрессии, для антиастенического действия – состояние утомления.

Несмотря на то, что к настоящему времени УЗВ различных животных в

обычных, комфортных условиях достаточно хорошо изучена, какой-либо системы ее поведенческой интерпретации, приемлемой для доклинического изучения психофармакологических средств, не создано.

Цель настоящей работы состояла в разработке методики интерпретации поведенческих характеристик и УЗВ лабораторных животных, приемлемой для доклинической оценки эффектов психофармакологических средств.

Материалы и методы

Исследование планировалось и проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и РД 64-126-91 «Правила доклинической

оценки безопасности фармакологических средств. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией НЦБМТ ФМБА России.

Исследование выполнялось на лабораторных белых аутбредных самцах крыс линии WAG/GY, в возрасте 2,5-3 мес., средней массой 300 ± 25 г, по 8 особей в группе, поступивших из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Карантин, содержание животных, осмотры и рандомизация, введение препаратов и этаназия осуществлялись в соответствии с утвержденными стандартными операционными процедурами (СОП) организации. Животные содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem. В качестве корма животным использовался стандартный экструдированный гранулированный полнорацционный комбикорм для лабораторных животных ПК-120, произведенный в соответствии с ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось в свободном режиме, исходя из суточных нормативов. Водопроводная очищенная вода давалась всем животным *ad libitum* в стандартных поилках.

Анализ поведенческих характеристик, осуществляемый с помощью автоматизированной системы, является наиболее современным методом оценки локомоторной активности животных и проводится в нашем Центре с использованием системы Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая позволяет вычислять длительность таких форм поведения как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность, стойки (вертикальная или ориентировочная активность), груминг (умывания, признак эмоционально комфортного состояния), стереотипные движения и др. Кроме

того, оценивалось время элементов сложного поведения. За каждый временной промежуток по каждому животному определяется процент каждой формы поведения.

Основными преимуществами компьютерного анализа поведения с помощью Laboras являются:

- возможность тестирования многих мелких лабораторных животных – мыши, крысы, хомяки, морские свинки – что крайне важно при выборе оптимальной модели для биомедицинских, доклинических и других исследований;
- полная автоматизированность системы, позволяющая без участия экспериментатора и, соответственно, «человеческого фактора», измерять поведенческие характеристики животных;
- способность работы в полной темноте, когда использования иных методов, таких как видеорегистрация, ограничено или невозможно;
- длительность исследования, составляющая до 7 дней в непрерывном режиме, т.е. тестируемые животные при этом находятся в привычных для них условиях;
- простота и удобство использования, которое не требует дополнительных навыков работы исследователя и особенной профессиональной подготовки.

Регистрация УЗВ. Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате.

До начала эксперимента у каждого животного осуществляли регистрацию ультразвуковых колебаний (фоновые данные, являлись объектом сравнения).

Длительность регистрации свободного поведения и УЗВ составляла 15 мин.

Тестируемые препараты. Изменение функционального состояния животных обеспечивалось введением фармакологических средств: транквилизатора бензодиазепиновой группы Диазепам (Релиум, Тархоминский фармацевтический завод «Польфа»), ноотропа с психоактивирующим действием Фенотропил (Щелковский витаминный завод), норадренэргического стимулятора Атомоксетин (Страттера, Eli Lilly), центрального холинэргического средства непрямого действия Галантамин (Каннофарма) и синтетического аналога энкефалинов Даларгин (Бион). Указанные средства применялись в следующих дозах: Релиум – 2 мг/кг, Фенотропил – 21 мг/кг, Страттера – 1 мг/кг, Нивалин – 1 мг/кг, Даларгин – 0,5 мг/кг. Дозы исследуемых препаратов соответствуют средним терапевтическим для людей с учетом коэффициентов видового переноса для лабораторных животных [1]. Все исследуемые препараты вводились внутривенно с помощью металлического зонда однократно в объеме 0,2-0,5 мл за 0,5-1,5 ч до начала исследования, при достижении максимальной концентрации препаратов в крови. Контрольной группе животных вводили эквивалентное количество физиологического раствора.

Обработка материалов. После удаления физических артефактов

(монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 20 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB-5.5 методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье (Nfft) – 2000 интервалов. После вычислений спектральной плотности мощности (СПМ) УЗВ находились медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного. Кроме того, отдельно вычислялись медианы значений спектра по всей частотной полосе (20-100 кГц), и для каждой частоты осуществлялось суммирование числа случаев, когда СПМ была выше этой «общей» медианы. Значения СПМ УЗВ выражались в виде безразмерных коэффициентов ($K_{СПМ}$), рассчитанных как отношение СПМ к фону окружающей среды.

Статистическая обработка данных проводилась методами параметрической статистики, корреляционного, регрессионного, дисперсионного и мультифакторного анализа с помощью пакета прикладных программ WinStat и пакета анализа данных для процессора таблиц Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

В состоянии психологического комфорта (спокойное бодрствование) картина УЗВ у крыс характеризуется (рис. 1) наличием доминантного пика УЗВ в частотном диапазоне 31-45 кГц (наиболее часто – 36-40 кГц) при отсутствии высокоамплитудных пиков в других частотных диапазонах.

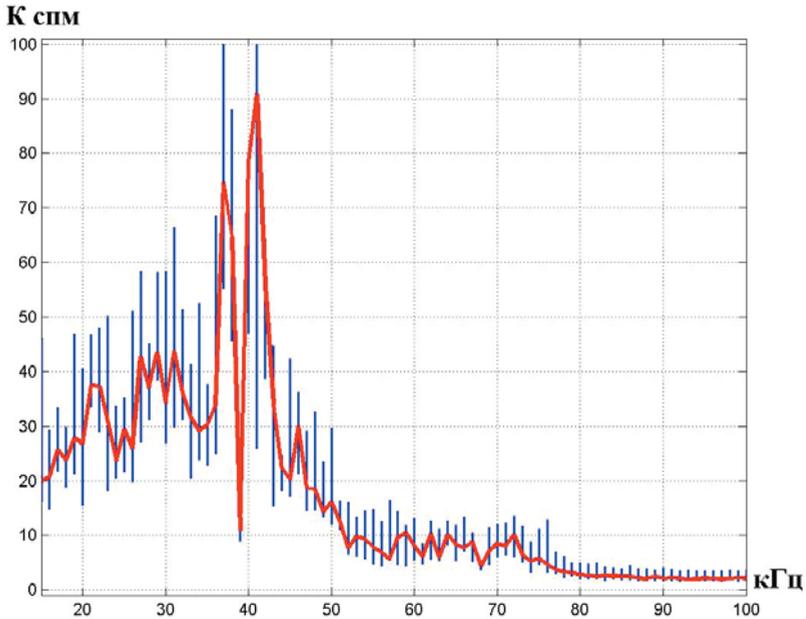


Рис. 1. УЗВ крысы в спокойном комфортном состоянии. По оси абсцисс – частота, кГц; по оси ординат – спектральная плотность мощности (Кспм). Синие линии – 95% доверительный интервал.

Высокоамплитудная вокализация в диапазоне 31-45 кГц свидетельствует о комфортном для животных эмоциональном состоянии. Появление высокоамплитудных пиков УЗВ в частотном диапазоне 20-30 кГц свидетельствует об острых стрессовых воздействиях, причем, чем выраженнее стресс, тем «громче» происходит вокализация в этом диапазоне. Этот диапазон может быть охарактеризован как отражающий тревогу, напряжение (или умеренный дискомфорт при низких амплитудах УЗВ). Вовлечение в УЗВ частотного диапазона менее 20 кГц свидетельствует об экстремальном, опасном для жизни состоянии животного. Появление основного или дополнительных пиков в диапазоне 45-75 кГц свидетельствует о дискомфортном состоянии животных или их астенизации (появление при утомлении, постстрессовых состояниях). Для

УЗВ высокочастотного диапазона (75 и более кГц) интерпретируемых признаков на этом этапе работы не выявлено.

В литературе [5] выделяют два подтипа 50 кГц-вокализации у крысы. Первый из них связан с приятными ощущениями (юношеские игры, спаривание, еда, электростимуляция некоторых ядер лимбической системы мозга), второй, напротив, – с отрицательной стимуляцией (запах кота, звук шагов, яркий свет). 50-кГц вокализация может быть индикатором комфортных, представляющих гомологию радости человека, и дискомфортных состояний, что совпадает с результатами наших исследований.

С целью дальнейшей детализации интерпретации показателей УЗВ было выполнено ее сопоставление с показателями теста Laboras при синхронной регистрации.



Рис. 2. Суточная структура спонтанной поведенческой активности крыс (интактная группа) по данным методики Laboras.

Структура типичной поведенческой активности интактных крыс при суточной регистрации представлена на рис. 2.

Интерпретация регистрируемых системой Laboras показателей может строиться исходя из их самостоятельной поведенческой характеристики. Горизонтальная активность отражает общую двигательную (локомоторную) активность, вертикальная активность – ориентировочную активность, груминг – состояние психологического комфорта. Показатели иммобилизации (замирания, неподвижности) и сложных элементов системного поведения не имеют однозначной прямой интерпретации.

Так, замирание животного может отражать его поведенческую реакцию на опасность, быть признаком стресс-реакции, а может отражать гипоактивное, сонное состояние. К числу элементов сложного системного поведения относятся вздрагивания, резкие движения головой, встряхивания «по типу мокрой собаки», почесывания, заваливания на бок, развороты на месте, вынюхивание, которые не имеют единого поведенческого вектора интерпретации.

Прямые показатели методики Laboras, определяемые у интактных животных, характеризуются достаточно высокой степенью вариативности (табл. 1).

Таблица 1

Статистические характеристики показателей методики Laboras у интактных крыс (полигон измерения – 900 сек)

Показатель	Горизонтальная активность	Неподвижность	Вертикальная активность	Элементы системного поведения	Груминг
Среднее	4,90	566,91	43,09	172,71	112,39
Стандартная ошибка	0,33	17,42	2,38	13,80	6,08
Стандартное отклонение	3,82	204,58	27,96	162,16	71,45
Коэффициент вариации	0,78	0,36	0,65	0,94	0,64

В исследовании с моделированием ситуационного стресса выполнен анализ анксиолитического (транквилизирующего) действия препаратов Релиум и Даларгин, в исследовании в условиях утомления – препарата Фенотропил. На специально сформированной группе животных, находящихся в гипоактивном состоянии, – препарата Страттера.

Результаты исследования поведенческих характеристик животных при действии указанных фармакологических средств представлены в табл. 2.

В контрольной группе животных по отношению к фоновым данным наблюдалось возрастание длительности неподвижности, умывания и ЭСП, снижение горизонтальной и вертикальной активности.

На фоне введения препарата Релиум наблюдалось повышение времени неподвижности при снижении горизонтальной и вертикальной активности по сравнению с фоновыми данными. Повышение длительности умывания по отношению к фону указывает на пребывание животных в благоприятном, комфортном состоянии.

После введения препарата Даларгин наблюдались противоположные вышеописанным эффекты: возрастание горизонтальной и вертикальной активности при уменьшении времени неподвижности по сравнению с фоновыми данными. Повышение длительности умывания также является показателем благоприятного, комфортного состояния животных.

В группе «Фенотропил» были зафиксированы следующие эффекты по отношению к фоновым данным: возрастание горизонтальной и вертикальной активности, снижение времени неподвижности, умывания и ЭСП. Усиление и активизирование сенсорных и сенсомоторных реакций, наблюдаемое в данной группе, вероятно, сопряжено с психоэмоциональным напряжением и общим беспокойством.

В группе «Страттера» наблюдались следующие изменения по отношению к фоновым данным: возрастание горизонтальной и вертикальной активности, а также длительности умывания, снижение времени неподвижности и ЭСП.

Таблица 2

Поведенческие характеристики крыс при действии тестируемых препаратов

Группа	Фон (сек)					Эффект (сек)				
	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.
Контроль	389	25	148	187	151	398	20	169	141	172
Релиум	161	13	552	84	90	102	2	563	62	171
Даларгин	84	6	723	13	74	116	11	665	17	91
Фенотропил	347	31	129	204	189	265	59	107	313	156
Страттера	286	35	219	225	135	253	55	65	313	214

Примечание: ЭСП – элементы системного поведения, Г.а. – горизонтальная активность (локомоции), Им. – иммобилизация (неподвижность), В.а. – вертикальная активность (стойки), Гр. – груминг (умывание).

Таким образом, состояние животных, принимавших препараты Даларгин и Страттера, может расцениваться как благоприятное, т.е. возрастание двигательной активности на фоне приёма

препаратов не является для них дискомфортным признаком.

Результаты исследования УЗВ животных при действии указанных фармакологических средств представлены на рис. 3-6.

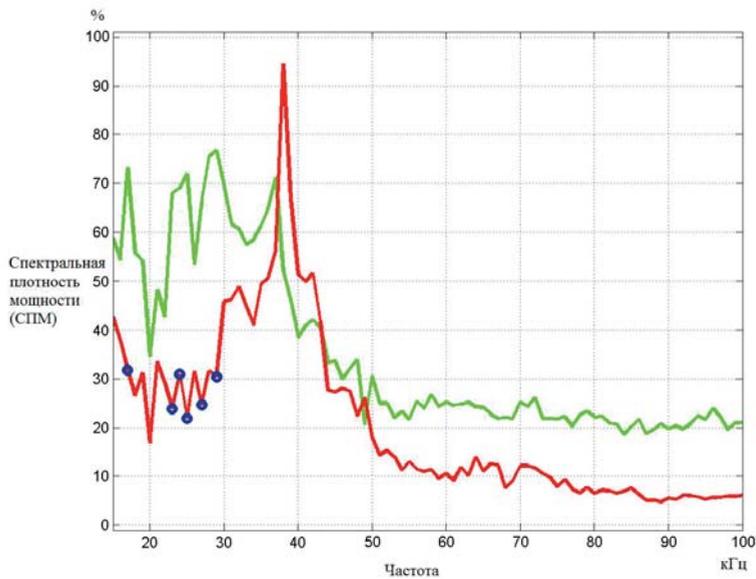


Рис. 3. УЗВ группы «Релиум». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные. Синие кружочки – $p < 0,01$ (ANOVA).

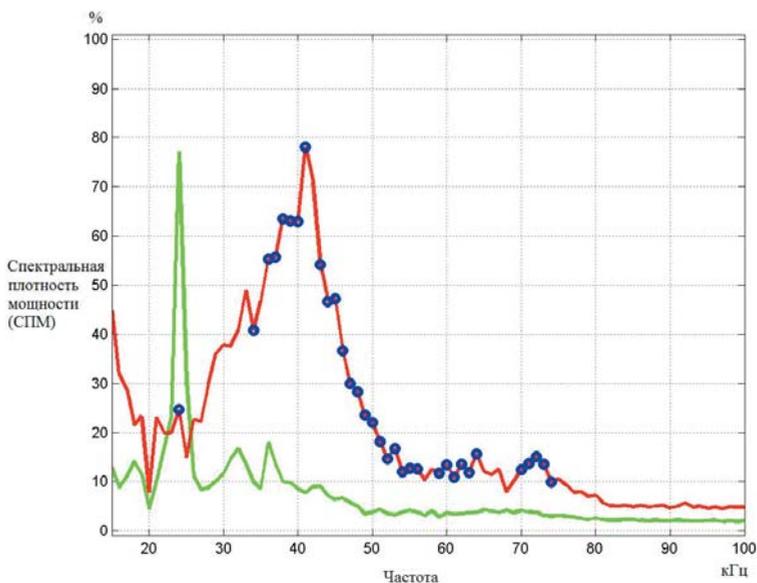


Рис. 4. УЗВ группы «Даларгин». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные. Синие кружочки – $p < 0,01$ (ANOVA).

После применения препарата Релиум сформировался отчетливый доминантный пик УЗВ на частоте около 38 кГц, отражающей комфортный диапазон для крыс. Кроме того, произошло снижение амплитуд УЗВ в тревожно-дискомфортном диапазоне (20-30 кГц). Такие изменения УЗВ отражают противотревожное (анксиолитическое, транквилизирующее) действие препарата Релиум, его способность контролировать эмоционально-негативные состояния.

После применения препарата Даларгин происходит умеренное повышение ультразвуковой вокализации в частотном диапазоне до 20 кГц, разрушение спектрального пика тревожного диапазона (20-30 кГц) и формирование широкого потока вокализации в комфортном диапазоне частот (31-45 кГц, с максимумом около 41 кГц (достоверность изменений по сравнению с фоном обнаруживается на многих точках графика)), отражающем пребывание крыс в благоприятном, комфортном психо-

эмоциональном состоянии. Кроме того, отмечается усиление вокализации в диапазоне 50-75 кГц, отражающую коммуникативную активность этих животных, эмоционально-позитивное состояние.

Максимум СПМ УЗВ в фоновых измерениях приходится на частоту около 42 кГц, что является показателем комфортного состояния животных. Однако относительно низкая амплитуда по частотным диапазонам в целом и дополнительный пик в диапазоне 50-60 кГц свидетельствует о состоянии утомления животных. После введения препарата Фенотропил отмечается усиление УЗВ в диапазоне частот до 20 кГц. При этом сохраняется в достаточно полной степени УЗВ в комфортном для животных частотном диапазоне. Эмоциональное состояние животных, оцениваемое по полученным УЗВ-графикам, представляется достаточно противоречивым: комфорт с элементами напряжения, возможно – возбуждение, пограничное состояние, но уже не утомление.

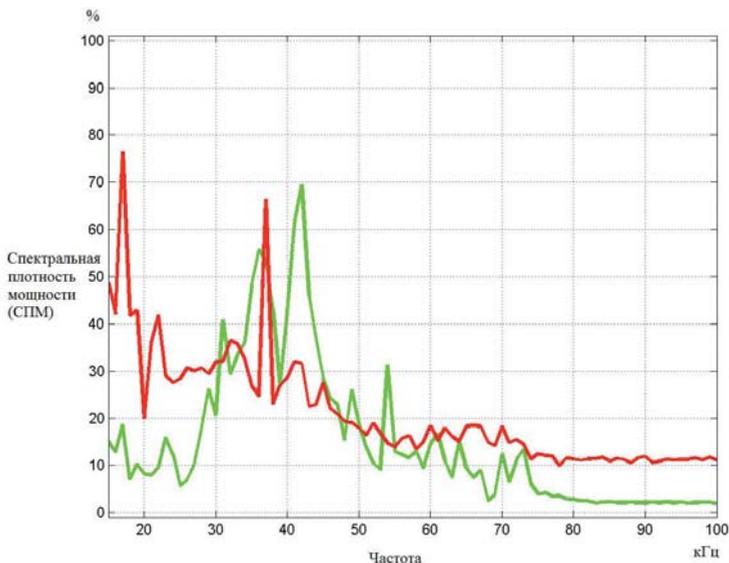


Рис. 5. УЗВ группы «Фенотропил». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные.

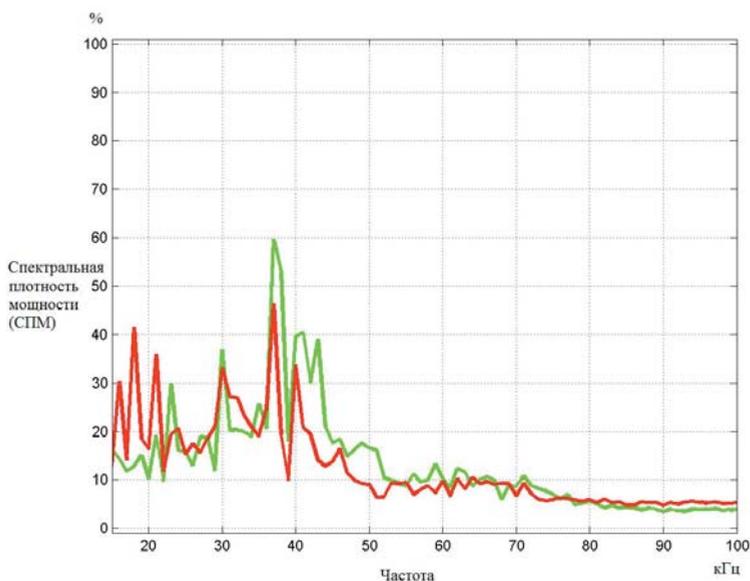


Рис. 6. УЗВ группы «Страттера». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные.

Максимальная СПМ УЗВ обеих кривых приходится на частоту около 38 кГц, что является маркером позитивного эмоционального состояния животных. После введения препарата Страттера отмечается некоторое возрастание СПМ в диапазоне около 20 кГц, однако его мощность ниже, чем в «диапазоне комфорта». Вероятно, данный эффект, наблюдаемый и в контрольной группе, связан с процедурой инъекции. В целом, существенных изменений в спектре ультразвуковых сигналов при однократном применении препарата не наблюдается, состояние крыс оценивается как благоприятное.

Заключение

Изменения поведенческих характеристик и параметров УЗВ при фармакологической коррекции психоэмоционального состояния животных позволяют на скрининговом уровне вы-

явить признаки анксиолитического, седативного, антиастенического и активирующего действия биологически активных веществ. Методика интерпретации функционального состояния животных по анализу их свободного поведения и УЗВ является ценным инструментом доклинического исследования медицинских технологий и нейротропных лекарственных средств.

Список литературы

1. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических средств: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств / под общ. ред. Р.У. Хабриева. - М.: Медицина. 2005. С. 41-54.
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов В.Б. Очерки спортивной фармакологии. Том 1. Векторы экстраполяции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. - М., Спб: Айсинг. 2013. 288 с.

3. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и её информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. 2011. № 1. С. 4-23.
4. Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н. Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. 2010. № 5. С. 17-21.
5. Wöhr M., Houx B., Schwarting R.K.W., Spruijt B. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats // Physiology and behavior. 2008. V. 93. P. 766-776.

The analysis of behavioural characteristics and ultrasonic vocalization of laboratory rats at pharmacological correction of their psychoemotional state

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

Interpretation of a psychoemotional state of laboratory animals according to the analysis of their free behaviour and parameters of ultrasonic vocalization is the valuable instrument of preclinical research of medical technologies and pharmacological agents.

Key words: behaviour, ultrasonic vocalization, psychoemotional state, pharmacological correction, rats.

Фармакокинетический подход в вопросе о взаимозаменяемости лекарственных средств

А.В. Соколов^{1,2}, В.Г. Кулес^{1,2}, Н.Д. Бунятян^{1,2}, Т.А. Родина¹,
А.Б. Прокофьев^{1,2}, В.В. Архипов^{1,2}, Л.М. Красных¹, Е.А. Сокова^{1,2}

¹ – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

² – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Контактная информация: д.ф.н., проф. Соколов Андрей Владимирович, sokol.pharm@mail.ru;
д.м.н., проф. Прокофьев Алексей Борисович, elmed@yandex.ru

Статья посвящена вопросам, касающимся оценки соответствия воспроизведенных лекарственных препаратов оригинальному препарату. Рассматриваются такие понятия, как фармацевтическая, фармакокинетическая (биологическая) и терапевтическая эквивалентность. Показано, что в развитых странах для препаратов с узким терапевтическим диапазоном действия рекомендуется ограничить динамический диапазон величиной 0,9-1,1. Также рассматриваются вопросы, связанные с экспертизой качества и регистрацией зарубежных и отечественных воспроизведенных ЛП в России.

Ключевые слова: воспроизведенный лекарственный препарат, взаимозаменяемость, качество, терапевтическая эквивалентность, фармацевтическая эквивалентность, биоэквивалентность.

В соответствии с требованиями ФЗ РФ № 429-ФЗ, с 1 июля 2015 г. в России вводится новый термин: «взаимозаменяемый лекарственный препарат» – «лекарственный препарат с доказанной терапевтической эквивалентностью или биоэквивалентностью в отношении референтного лекарственного препарата, имеющий эквивалентные ему качественный состав и количественный состав действующих веществ, состав вспомогательных веществ, лекарственную форму и способ введения» [12].

Главной проблемой, связанной с воспроизведенными лекарственными препаратами (ЛП) и значительно влияющей на эффективность и безопасность терапии, является, естественно, их взаимозаменяемость с оригинальным препаратом.

Концепция взаимозаменяемости ЛП подразумевает, что только фармацевтически эквивалентные и биоэквивалентные (таким образом, терапевтически эквивалентные) воспроизведенные ЛП могут быть взаимозаменяемыми. Основным критерием качества воспроизведенного ЛП является его терапевтическая эквивалентность, которая может быть продемонстрирована различными способами.

Доказательством терапевтической эквивалентности могут служить результаты полномасштабных доказательных клинических исследований воспроизведенных ЛП, однако стоимость и длительность подобных исследований практически исключают их внедрение в повсеместную практику. В практическом отношении фармакокинетический

подход в демонстрации биоэквивалентности во всем мире является основным и необходимым условием сопоставимости инновационного и воспроизведенного ЛП по эффективности и безопасности. Стоимость подобных исследований хотя и довольно высока, но существенно ниже стоимости проведения полномасштабных клинических испытаний. Это особенно актуально потому, что в РФ процент воспроизведенных ЛП достигает 95%, в других странах этот показатель значительно меньше. К примеру, в Великобритании – не более 50%, в Японии и Германии – 30%, в США – менее 15% [1]. Замена инновационного препарата на воспроизведенный ЛП, как правило, диктуется сравнительно низкой ценой последнего. Однако надо иметь в виду, что меньшая цена воспроизведенного ЛП не всегда является гарантией снижения стоимости лечения. При оценке стоимости лечения воспроизведенным ЛП и оценке ожидаемой экономии при его применении необходимо ориентироваться на уровни показателей реальной клинической эффективности и безопасности: стоимость единицы эффекта, стоимость равнозначного эффекта, расчет зависимости «доза-эффект», затраты на лечение побочных эффектов, которые должны быть сопоставимы с уровнями указанных показателей для оригинального препарата [9, 3]. При этом сопоставимость инновационного и воспроизведенного ЛП обуславливается целым комплексом проблем: качеством проведения сравнительных исследований биоэквивалентности (ИБЭ); качеством применяемых соединений активного вещества; качеством применяемых наполнителей лекарственных форм; количеством обнаруженных микропри-

месей и, следовательно, возможными нежелательными реакциями (НР); производством ЛП в соответствии с теми же или сравнимыми фармакопейными и другими соответствующими стандартами. Для того чтобы воспроизведенный ЛП был качественным, он должен соответствовать фармакопейной статье и производиться по стандартам надлежащей производственной практики (good manufacturing practice, GMP), которая будет гарантировать воспроизводимость состава ЛС от серии к серии [16].

Основой для адекватной замены инновационных лекарств может служить доказанная терапевтическая эквивалентность. Анализ проблем, возникающих при необходимости генерического замещения, и при этом не приводящего к ухудшению качества лечения, достаточно подробно рассмотрен в работе [7]. Авторы подробно анализируют проблемы, связанные с активными компонентами (производство и контроль качества), с определением биоэквивалентности (ширина приемлемого диапазона различий, при котором препараты считаются эквивалентными; показатели, которые учитываются при определении эквивалентности), а также вопросы, связанные с «неактивными» компонентами лекарственного вещества, и др.

Общепризнано, что основой для регистрации воспроизведенного ЛП являются качественно проведенные рандомизированные ИБЭ [5, 6, 8, 22]. При этом исследования по сравнительному изучению близких по действию ЛП должны быть максимально стандартизированы. В работе [17] дана оценка подходов к проведению ИБЭ в различных странах (Австралии, Бразилии, Канаде, Китае, Тайване, Европейском со-

обществе, Японии, Мексике, Сингапуре, Южной Кореи, Швейцарии, США). Важным представляется тот факт, что при ИБЭ ЛС с варьируемыми параметрами фармакокинетики и препаратов с узким терапевтическим диапазоном многие авторы склоняются к введению существенно более узких доверительных интервалов (ДИ): вместо общепринятых 0,8-1,25 предлагается ввести ДИ 0,9-1,11. На наш взгляд, введение такого диапазона существенно повысило бы качество воспроизведенного ЛП и во многом помогло бы решить проблему взаимозаменяемости ЛП с узким терапевтическим диапазоном.

Обязательным компонентом ИБЭ по сравнительному изучению близких по действию ЛП должен быть контроль качества выполненной рандомизации. Однако даже при условии грамотно проведенных ИБЭ, далеко не всегда гарантируется терапевтическая эквивалентность препаратов [24, 25]. Почему это происходит? – На это существует несколько причин. При анализе публикаций по биоэквивалентности препаратов для лечения артериальной гипертензии (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), антагонисты рецепторов ангиотензина II, блокаторы медленных кальциевых каналов, β -адреноблокаторы), гиперхолестеринемии (статины), остеоартрита (анальгетики, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), медленно-действующие средства), идентифицированных в библиографической базе MEDLINE за 15 лет (с 1990 по 2005 гг.), не было выявлено работ, которые бы продемонстрировали бионезэквивалентность β -адреноблокаторов, ингибиторов АПФ, антагонистов рецепторов анги-

отензина II и статинов. В то же время, в отношении антагонистов кальция и НПВС имелись публикации, утверждающие как биоэквивалентность, так и бионезэквивалентность для различных ЛП. Такое положение можно объяснить также и тем, что в 90% публикаций, по данным авторов, была выявлена связь с производителем воспроизведенного ЛП. В этом же исследовании были рассмотрены критерии оценки публикаций исследований биоэквивалентности: адекватность выбора референтного препарата и режима дозирования, достоверность методик определения активного вещества в плазме крови, соответствие дизайна исследования предъявляемым требованиям, полнота исследования фармакокинетических параметров и адекватность статистических методов анализа. На основании проведенного анализа были представлены рекомендации по назначению воспроизведенных ЛП:

- ✓ результаты исследований оригинальных препаратов не могут быть автоматически перенесены на другой препарат, имеющий то же действующее вещество;
- ✓ доказательством эквивалентности является только качественно спланированное и проведенное исследование;
- ✓ назначать воспроизведенные ЛП, для которых известны доказательства эквивалентности;
- ✓ перевод больного с одного воспроизведенного ЛП на другой может привести к ситуации терапевтической неэквивалентности;
- ✓ при замене оригинального препарата с узким терапевтическим диапазоном на аналог (с доказанной

эквивалентностью) следует чаще контролировать параметры эффективности и токсичности лечения;

✓ при множестве доступных препаратов-аналогов и отсутствии данных об эквивалентности следует отдавать предпочтение наиболее известным и хорошо зарекомендовавшим себя препаратам.

Также существует мнение, что фармакокинетические параметры препарата, полученные в ИБЭ, выполненном на здоровых добровольцах, могут существенно отличаться от таковых у больных [21]. Кроме того, при ИБЭ изучается действие разовых доз препаратов, хотя известны факты, что при курсовом приеме параметры фармакокинетики, по крайней мере, некоторых препаратов могут существенно меняться [4, 26].

Далее, при ИБЭ, как правило, не исследуют качество наполнителей и примесей, содержание которых может быть различным в оригинальном препарате и воспроизведенном ЛП, и которые могут (хотя и не должны) обладать собственной фармакологической активностью. Более того, некоторые примеси могут влиять на возникновение побочных эффектов ЛП [6, 14]. При проведении ИБЭ показатели концентрации одного из препаратов могут быть более переменными, чем у другого. В ряде публикаций представлены различия в фармакокинетических параметрах у молодых и пожилых пациентов. Однако если при самом первом назначении оригинального препарата или воспроизведенного ЛП это может не иметь большого значения для пациента, то при замене оригинального препарата на воспроизведенный ЛП или переходе с одного дженерика на другой, пациент может заметить различие в эф-

фективности или переносимости между двумя препаратами, которое объясняется вариабельностью данных фармакокинетики [20, 23]. По данным Carter и соавт. [21], несмотря на доказанную биоэквивалентность, в сравнительном рандомизированном двойном-слепом исследовании верапамила у пожилых концентрация воспроизведенного ЛП в плазме крови оказалась на 77% выше. При этом клиническая неэквивалентность между препаратами нашла отражение и в безопасности лечения: частота возникновения НР у пациентов, получавших воспроизведенный ЛП, была существенно выше по сравнению с группой пациентов, получавших оригинальный препарат верапамила. Также было отмечено существенно более частое удлинение интервала PQ у пожилых, получавших аналог верапамила, по сравнению с пациентами, принимавшими оригинальный препарат, что не могло не отразиться на безопасности проводимой терапии.

При качественном проведении фармакокинетических исследований и полученном несовпадении основных фармакокинетических параметров (скорость всасывания, время достижения максимальной концентрации и ее величина) возможно при использовании фармакокинетических подходов проводить замену одного препарата на воспроизведенный ЛП (с точки зрения поддержания оптимальной концентрации препарата в организме, максимально совпадающей с ранее достигнутой). При этом необходимо использовать данные терапевтического лекарственного мониторинга. Так, в работах Соколова А.В. и соавт. [10, 11] показано, что необходимо предпринять для достижения этой цели.

Например, для достижения указанной цели в работе [10] предлагается изменить режим дозирования метопролола. Для сокращения вариабельности в значениях концентрации между C_{\min} и C_{\max} также предлагаются изменения схем дозирования препаратов. При этом предполагается, что возникновения НР будут минимальны [11].

Важным представляется и тот факт, что если учет частоты и выраженности НР при проведении всех фаз клинических исследований оригинального ЛП является строго обязательным, то при проведении исследований по биоэквивалентности воспроизведенного ЛП сведения о его безопасности, как правило, предоставляются не в должном объеме [18].

Следует отметить, что в исследованиях биоэквивалентности крайне мало уделяется внимания качественному составу исследуемых лекарственных форм препаратов. Изучение этого вопроса не входит в основную задачу проведения данных исследований. Особенно, по нашему мнению, это касается качества активного вещества лекарственного препарата. Притом, для многих исследователей совершенно неоспоримым представляется тот факт, что качество воспроизведенных ЛП во многом определяется качеством субстанции [19, 13]. Так, например, при исследовании нескольких воспроизведенных ЛП аторвастатина было показано, что, в отличие от оригинального препарата, содержавшего активный компонент в виде молекулы в стабильной кристаллической форме, воспроизведенные ЛП содержали аторвастатин в аморфных формах. Известно, что аморфные формы аторвастатина имеют существенно больше примесей,

чем при использовании кристаллических структур активного вещества (в 10 и более раз) [2].

Классификация препаратов как терапевтически эквивалентных в различных странах проводится примерно одинаково. Так, в США Управление по контролю качества лекарственных и пищевых продуктов (FDA) классифицирует лекарственные препараты как терапевтически эквивалентные продукты, которые удовлетворяют следующим критериям: как разрешенные к применению по критериям безопасности и эффективности, если они фармацевтически эквивалентны, т.е. содержат одинаковые количества одной и той же активной фармацевтической субстанции и соответствуют фармакопейным или иным стандартам качества, чистоты и концентрации. Препараты являются биоэквивалентными, если они производятся в соответствии со стандартами GMP с соответствующей маркировкой. При этом важным представляется тот факт, что концепция терапевтической эквивалентности, использовавшаяся для разработки документа под названием «Разрешенные к применению лекарственные препараты с указанием их терапевтической эквивалентности» («Оранжевой книги») [15], применяется только по отношению к лекарственным продуктам, содержащим одну и ту же активную фармацевтическую субстанцию, и не предполагает сравнения различных лекарственных средств, используемых для лечения одного и того же состояния.

В некоторых случаях, после соблюдения специальной процедуры («Citizen petition procedure»), FDA может дать согласие на указание в перечне двух или более препаратов сравнения для воспро-

изведенных ЛП в одной лекарственной форме с одинаковой силой действия активного вещества. Но и в этом случае, чтобы у врачей не возникало проблем при замене одного препарата другим, FDA для каждого рецептурного воспроизведенного ЛП специально указывает расширенный код терапевтической эквивалентности, соответствующий препарату сравнения.

В нашей стране не только специалистам, проводящим ИБЭ, но и практическому врачу подчас недоступны сведения о наполнителе, содержании токсических примесей и продуктов деградации, стабильности субстанции, хотя указанные параметры могут влиять на клинический результат ничуть не меньше, чем активная субстанция ЛП, ввиду того, что вспомогательные вещества очень часто составляют основную часть фармакопейной статьи, и к ним должны быть применимы те же требования и критерии качества. Поскольку любое изменение в составе вспомогательных веществ может неблагоприятно повлиять на биодоступность и вызвать токсические явления или аллергию, важно, чтобы при проведении ИБЭ в досье к препаратам предоставлялась информация о реологических свойствах, кинетике растворения (dissolution test), проведенной по нескольким точкам и другим параметрам.

Что же, по нашему мнению, необходимо предпринять для того, чтобы практический врач мог бы заменить дорогостоящий препарат его аналогом (особенно это касается препаратов с узким терапевтическим диапазоном, препаратов, обладающих значительной вариабельностью, и препаратов с пролонгированным действием)?

Во-первых, представляется целесообразным создание специальных подразделений и рабочих групп, которые занимались бы вопросами оптимизации процесса внедрения на государственном уровне исследований по определению биоэквивалентности препаратов и, соответственно, принимали участие в определении и исключении с фармацевтического рынка продукции, которая не соответствует этому критерию качества. При этом было бы рационально ввести на федеральном уровне ежегодную практику тестирования аналитических лабораторий. Хорошей практикой было бы проведение контрольных выборочных ИБЭ уже зарегистрированных препаратов, а также проведение предварительных сравнительных химико-фармацевтических исследований по нескольким параметрам: количественное содержание, однородность дозирования, микробиологическая чистота, количество микропримесей и процедуры сравнительной кинетики растворения, проведенной по 4-5 точкам, выполненных по единым правилам. Для препаратов с узким терапевтическим диапазоном и значительной вариабельностью параметров необходимо при проведении ИБЭ ввести более узкий ДИ (0,9-1,11). Для препаратов с пролонгированным действием, по нашему мнению, необходимо уделять больше внимания исследованиям равновесной стационарной концентрации препарата в плазме крови (C_{ss}) при курсовом приеме.

Во-вторых, у врача всегда должна быть под рукой качественная информация, в которой указывалось бы не только международное непатентованное название (МНН) препарата, но и

его фармакокинетические параметры с описанием отличий, выявленных в ходе клинических исследований, ИБЭ, с прогнозами по фармакотерапии при замене одного препарата на другой, и описанием состава данной лекарственной формы препарата с указанием возможных НР при применении. Для получения данных об истинной сравнительной эффективности воспроизведенного ЛП и оригинального препарата, назначаемого в различных дозах, необходимо рассчитать соотношение их эффективных доз.

В-третьих, с целью упрощения выбора адекватной терапии, практикующему врачу должна быть доступна информация по терапевтической эквивалентности, а также данные по сопоставимости доз оригинальных препаратов и широко применяемых воспроизведенных ЛП. Для этого было бы хорошо в окончательных отчетах о проведенных ИБЭ включать рекомендации фармакокинетика по коррекции фармакотерапии при замене инновационного препарата на исследуемый воспроизведенный ЛП. Для этого желательно как можно быстрее организовать процесс создания информационного бюллетеня – аналога «Оранжевой книги», которая издается в США [15]. Данное издание, по нашему мнению, должно подвергаться регулярному дополнению (хотя бы раз в месяц) с включением результатов всех ИБЭ и пострегистрационных исследований, которые проводились по конкретным препаратам. Конечно, выпуск такого издания в печатном виде – достаточно дорогое удовольствие. Поэтому можно начинать с выпуска электронной версии, как это делают

в США. Доступ специалистов к нему должен быть открытым. Данное издание должно иметь соответствующий статус, поскольку на основании этих данных регуляторные органы должны иметь право либо прекращать продажу некачественных препаратов, либо приостанавливать действие регистрационных документов. Такое издание не должно копировать выпускаемые в настоящее время справочники по лекарственным соединениям, такие как «Видаль», «РЛС» и т.п., в которых дается крайне скудная информация, по большей части дублирующая друг друга.

В-четвертых, для установления взаимозаменяемости ЛП наиболее правильным было бы проведение сравнительных рандомизированных клинических исследований с целью установления эквивалентности их терапевтического действия. Проведение крупномасштабных, длительных исследований в данном случае достаточно затратно и поэтому представляется проблематичным. Однако даже небольшие по объему, но правильно спланированные исследования с перекрестным дизайном с учетом суррогатных конечных точек позволяют обосновать целесообразность применения воспроизведенных ЛП в реальной клинической практике. Причем такие исследования должны проводиться только после получения реальных данных по биоэквивалентности воспроизведенных ЛП.

Таким образом, на наш взгляд, при соблюдении этих условий взаимозаменяемость ЛП медицинского применения была бы наиболее обоснованной и эффективной.

Список литературы

1. Белоусов Ю.Б. Дженераки – мифы и реалии // Ремедиум. 2003. № 7-8. С. 4-9.
2. Верткин А.Л., Барабашкина А.В., Ткачева О.Н., Васильева А.В. и др. Влияние небиволола на состояние сердечно-сосудистой системы при сохраняющейся после родов артериальной гипертензии // Российский кардиологический журнал. 2005. № 2. С. 55-59.
3. Воробьев П.А., Авксентьева М.В., Юрьев А.С., Сура М.В. Клинико-экономический анализ (оценка, выбор медицинских технологий и управление качеством медицинской помощи). - М.: Ньюдиамед. 2004. 404 с.
4. Есенова И.И., Автандилов А.Г., Петросов С.Л. Оценка эффективности применения лизиноприла у молодых мужчин с артериальной гипертензией и алиментарным ожирением // Фарматека. 2009. № 4. С. 61-64.
5. Марцевич С.Ю., Суханов Я.В., Белолипецкая В.Г., Кутищенко Н.П. Исследования биоэквивалентности как способ доказательства идентичности оригинального препарата и препарата-дженерика // Российский кардиологический журнал. 2005. № 2. С. 76-78.
6. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов. - М.: МЗ РФ. 2001. 24 с.
7. Плавинский С.Л. Являются ли препараты с одним международным непатентованным наименованием (МНН) взаимозаменяемыми? Анализ международного опыта на примере циклоспоринов. - М.: Медицина. 2013. № 4. С. 86-108.
8. Принципы надлежащей лабораторной практики // Библиотека ГОСТов [электронный ресурс]. - Режим доступа: свободный. - Загл. с экрана. - Яз. рус., англ.
9. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. - М: МедиаСфера. 2006. 312 с.
10. Соколов А.В., Белоусов Ю.Б., Тищенко И.Ф. Сравнительное фармакокинетическое исследование биоэквивалентности двух лекарственных форм метопролола // Клиническая фармакокинетика. 2004. № 1. С. 27-33.
11. Соколов А.В., Белоусов Ю.Б., Тищенко И.Е. Сравнительная фармакокинетика препаратов вальпроевой кислоты с контролируемым высвобождением // Ремедиум. 2006. Спецвып. № 4. С. 2-7.
12. ФЗ № 429 от 22 декабря 2014 г. «О внесении изменения в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» // Министерство здравоохранения Российской Федерации [официальный сайт]. - Режим доступа: <http://rosminzdrav.ru/docs/mzsr/projects/1926>, свободный. - Загл. с экрана. - Яз. рус.
13. Флетчер Р., Флетчер С., Вазнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Пер. с англ. - М: МедиаСфера. 1998. 352 с.
14. ACC/ANA/ACP-ACIM Guidelines for the management of patients with chronic stable angina. A report of the American college of cardiology / American Heart Association task force on practice guidelines // J. Amer. coll. cardiol. 2003. N. 41. P. 159-168.
15. Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations, 33nd (2013) [Orange Book] // United States food and drug administration [официальный сайт]. - Режим доступа: свободный. - Загл. с экрана. - Яз. англ.
16. Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use / Pharmaceutical legislation medicinal products for human use. Vol. 1 // The rules governing medicinal products in the European Union (Eudralex).
17. Davit B., Braddy A.C., Conner D.P., Yu L.X. International guidelines for bioequivalence of systemically available orally administered generic drug products: A survey of similarities and differences // The AAPS J. 2013. Vol. 15. No. 4. DOI: 10.1208/s12248-013-9499-x. P. 974-990.
18. Diamond B.I., Albercht J.W. Medical and psychiatric implications of generic drugs // Psychopathology. 1987. Suppl 1. P. 92-98.
19. Duh M.S., Andermann F., Paradis P.E., et al. The economic consequences of generic substitution for antiepileptic drugs in 1 public payer setting: the case of lamotrigine // Dis. Manag. 2007. N. 10. P. 216-225.
20. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary // Eur. Heart J. 2007. N. 28. 2375-2414.
21. Food and drug administration, Center for drug evaluation and research. In vivo bioequivalence approaches, draft guidance [электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.fda.gov/cder/guidelance/1716dft.pdf>, свободный. - Загл. с экрана. - Яз. англ. 1997.

22. Guideline for Good Clinical Practice E6 (R1) // International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human.
23. *Laguna-Goya N., Blazquez-Perez A., et al.* Regulation about generic approval // *Farm. Hosp.* 2006. N. 30(6). P. 379-384.
24. *Senn S.J.* Cross-over trials in clinical research // Chichester. Wiley. 1993.
25. *Simpson K., Jarvis B.* Lisinopril. A review of its use in congestive heart failure // *Drugs.* 2000. N. 59. P. 1149-1167.
26. WHO Drug Information. 1998. N. 12. P. 134-135.

Farmakokinetic approach to the question of interchangeability of drugs

**A.V. Sokolov, V.G. Kukes, N.D. Bunyatyan, T.A. Rodina, A.B. Prokofiev,
V.V. Arkhipov, L.M. Krasnikh, E.A. Sokova**

This article addresses the issues concerning assessment of generic drugs and their correspondence to original drug product. The review highlights issues concerning pharmaceutical, pharmacokinetic (biological) and therapeutic equivalence. It is shown that in developed countries for drugs with a narrow therapeutic range, it is recommended to limit the dynamic range value from 0.9 to 1.11. The problem of governmental regulation of quality and submission for obtaining marketing authorization for generic drug products in Russia are discussed.

Key words: generic drugs, interchangeability, quality, therapeutic equivalence, pharmaceutical equivalence, bioequivalence.

Эффекты разных концентраций бактериального меланина на электрическую активность нейронов коры мозга при раздражении нервов задней конечности у крыс

Т.Р. Петросян¹, В.А. Чавушян², А.С. Тер-Маркосян³, А.С. Овсепян³

¹ – Ереванский государственный медицинский университет, Ереван, Армения

² – Институт физиологии НАН РА, Ереван, Армения

³ – НПП «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА, Ереван, Армения

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

С целью выявления сдвигов в электрической постстимульной активности нейронов сенсомоторной коры мозга (СМК) под влиянием разных концентраций бактериального меланина изучалась высокочастотная тетаническая активация корковых нейронов в ответ на стимуляцию периферических нервов задней конечности у крыс. Регистрировались соответствующие посттетанические короткие (СТР) и/или длительные (ЛТР) изменения активности корковых нейронов, связанных с мобилизацией того или иного медиатора изучаемой структуры. Характер воздействия раствора меланина оказался прямо зависящим от исследуемой концентрации раствора. Оптимальным для данной работы признан способ внутримышечного введения. Картины посттетанических ответов практически идентичны при прямой аппликации и внутримышечном и/или внутривнутрибрюшинном введении меланина при применении одной и той же концентрации. При введении низких концентраций раствора меланина отмечалось повышение нейрональной активности. Самой надежной концентрацией является 4,5 мг/мл, которая вызывает стабильное и длительное повышение активности корковых нейронов. Активирующее влияние бактериального меланина может способствовать процессам восстановления при нейродегенеративных заболеваниях.

Ключевые слова: меланин, нейроны сенсомоторной коры, вызванная активность нейронов.

Введение

Согласно современным литературным данным, нейромеланины (НМ) являются природными антиоксидантами, эффект которых определен значительным подавлением липидной перекисидации в мышцах [14]. Исследователи отмечают, что оксидативный путь допаминового метаболизма в мозге человека ведет к формированию и аккумуляции НМ в цитоплазме большинства нигростриарных допаминергических нейронов, и считают спорным физи-

ологическое значение НМ и их вклад в нейродегенеративные процессы, лежащие в основе болезни Паркинсона (БП). Изучена корреляция эффекта меланинконицентрирующего гормона (МКГ) на способность восстановления памяти после амнезии, вызванной LN-нитроаргинином (L-NOArg). Более того, электрофизиологические исследования показали, что L-NOArg не блокирует потенциацию нейронов [13].

Другими авторами выявлено повышение уровня редокс-активного железа

(Fe^{2+}) в черной субстанции в ассоциации с НМ у людей с БП [1]. Согласно этим данным, наиболее обширная дегенерация допаминергических нейронов при БП наблюдается в субпопуляции меланизированных нейронов, локализованных в компактной части черной субстанции. Авторы исследовали редокс-активные НМ-агрегаты у группы пациентов с БП и показали значительное понижение (70%) числа меланизированных нейронов и повышение негемового Fe^{3+} , вследствие чего возникает усиление оксидативного стресса и выраженности интранейрональных повреждений.

На примере латерального гипоталамуса крыс показано, что МКГ подавляет синаптическую активность глутаматных и ГАМК-ергических нейронов [5].

Целью настоящего исследования было изучение влияния разных концентраций водорастворимого бактериального меланина на специфику электрической постстимульной активности нейронов сенсомоторной коры (СМК) мозга.

Нами было отдано предпочтение не одиночной, а высокочастотной тетанической активации корковых нейронов и регистрации соответствующих посттетанических коротких (STP) и/или длительных (LTP) изменений их активности, связанных с мобилизацией того или иного медиатора изучаемой структуры. Интерес к указанному явлению приобретает всё большую значимость в связи с проблемой нейрональной пластичности и памяти. Явление LTP, например, обнаружено не только в гиппокампе, где оно особенно интенсивно изучалось в связи с его непосредственным участием в обеспечении кратковременной памя-

ти, но и в других структурах мозга – в зрительной стриатной коре [9], в синапсах, сформированных ручками нижних колликул, в медиальном коленчатом теле [6] и т.д. Что касается нейронов сенсомоторной коры, на которых проведено настоящее исследование, индукция долгодлящей депрессии (LTD), в частности, видимо, ассоциируется с понижением дендритного протяжения и плотностью шипиков в 3-ем и 5-ом слоях данной области [7, 10]. В другой работе [11] теми же авторами изучена потенциация в СМК, вызванная квалифицированным обучением – поведенческой формой LTD. При LTD важным фактором является также и депотенциация в СМК у свободно передвигающихся крыс [2].

В настоящем исследовании влияние БМ на электрическую активность нейронов СМК было изучено при прямой аппликации, внутрибрюшинном и внутримышечном введении вещества. В предыдущей серии электрофизиологических опытов мы пытались выяснить влияние раствора БМ на допаминергические нейроны черной субстанции [12]. Было установлено, что БМ повышает электрическую активность допаминергических нейронов компактной части черной субстанции, что практически может способствовать облегчению восстановления моторной функции в условиях нейродегенерации. Преимуществом настоящей серии является возможность регистрации нейрональной активности от поверхностных нейронов СМК и сравнения полученных постстимульных эффектов при внутримышечном (внутрибрюшинном) введении вещества и прямой аппликации на кору.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 14-ти зрелых разнополых крысах-альбиносах массой 200-300 г. Всего зарегистрировано 209 нейронов сенсомоторной коры мозга, в т.ч. интактных (n=7 крыс) – 103 нейрона, и 106 нейронов, подверженных многочасовому воздействию бактериального меланина с концентрацией 0,009 г/мл, 0,006 г/мл и 0,0045 г/мл (методом прямой аппликации – 45 нейронов, внутривнутрибрюшинным и внутримышечным введением – 41 нейрон и 20 нейронов соответственно).

В остром эксперименте крыс обездвигивали однопроцентным дитилином (внутрибрюшинно, 25 мг/кг), переводили на искусственное дыхание и после фиксации головы животного в стереотаксическом аппарате открывали область СМК (до 3 мм латеральнее от средней линии и 3 мм назад от брегмы), соответствующую представительству задней контралатеральной по отношению к точке отведения конечности [8]. Стереотаксически ориентированный стеклянный микроэлектрод с кончиком 1-2 мкм, заполненный 2М раствором NaCl, вводили в СМК мозга для регистрации одиночной активности пирамидных нейронов и интернейронов на глубине от 250 до 1800 мкм, вызванной на одиночное и частотное (прямоугольными импульсами длительностью 0,5 мс и частотой 50 и 100 Гц на протяжении 1 с) раздражение смешанного (n. Ischiadicus-I), флексорного (n. Peroneus communis-P) и экстензорного (n. Gastrocnemius-G) нервов задней конечности. Ответы нейронов в виде посттетанической потенциации (ПТП) или депрессии (ПТД) различной выраженности и длительности регистриро-

вались на компьютере при помощи специальной программы, разработанной В. Каменским [3].

Что касается выбора концентрации раствора меланина, то из испытанных нами в исследовательском проекте шести концентраций были выбраны три самых низких. Это связано с тем, что в наших предыдущих исследованиях с выработкой инструментальных условных рефлексов (ИУР) после удаления СМК, внутримышечное введение вышеуказанных концентраций приводило к эффекту ускорения восстановления ИУР и движения парализованной задней конечности. Особенно результативной оказалась концентрация 0,0045 г/мл.

После воздействия бактериального меланина велось многочасовое наблюдение и запись экстраклеточной электрической активности нейронов, через определенные периоды времени. Примененная нами программа обеспечивает регистрацию электрической активности в режиме реального времени и проводит селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации. В автоматическом режиме строились суммарные перистимульные гистограммы межспайковых интервалов (PETH-Peri-Event Time Histogram). В среднем, в течение одной регистрации проводилось до 10-30 постстимульных испытаний. Программа проводит анализ полученных данных по алгоритму, специально разработанному для оценки значимости отрезков PETH. Постстимульная нейронная тоническая активность вычисляется посредством последовательного усечения рассматриваемого спайкового потока с исключением значений диапазонов,

выпадающих из интервала $M \pm 2SD$ (M – среднее значение, L – стандартное отклонение), повторяющегося до тех пор, пока среднее значение и SD стабилизируются (различие менее 2%). Конечная выборка принимается за тоническую активность (ТА) нейрона.

Значимость различия фоновой (ФА) и ТА определялась с помощью t -критерия Стьюдента.

Аналогичная задача решается программой посредством кумулятивных кривых, построенных для фоновой и тонической гистограмм. По методу наименьших квадратов определялся наклон прямых, аппроксимирующих данные кривые. По наклону прямой, аппроксимирующей отклоняющийся участок кумулятивной кривой, рассчитывалась значимость расхождения с тонической активностью. Для заключения о физических ответах отбирались периоды активности со статистически значимым ($p < 0,001$) отличием от тонического уровня. По углам наклона аппроксимирующих прямых рассчитывалась значимость изменения тонической активности нейрона по сравнению с фоновой. Анализ данных, полученных при частотном раздражении, проводился на основе графиков скользящей частоты. При этом со сдвигом в 50 мс рассчитывалась частота разряда нейрона в интервале в 200 мс и более.

При наличии фоновой активности для нее также проводился расчет, вычислялась соответствующая средняя частота и стандартное отклонение [3, 4]. На основании этих величин, по $M \pm 2SD$ выявлялись периоды ПТП и ПТД нейрона. При отсутствии фона выделялись соответственные участки повышенной и пониженной активации.

Результаты и их обсуждение

Проведено исследование вызванной импульсной активности 209-ти одиночных нейронов СМК мозга крыс, в т.ч. 103 нейрона – в норме и 106 – под воздействием бактериального меланина. В целом, у крыс в норме, без воздействия препарата, следует отметить регулярное формирование преимущественно первичного раннего ответа, возникающего на 9-ой мс (рис. 1).

Представлены гистограммы постстимульных проявлений активности в нейронах СМК мозга в ответ на раздражение ствола п. ischiadicus (I) и его флексорного (P) и экстензорного (G) коллатерального ответвления в норме (рис. 1), а также эффекты аппликации, внутрибрюшинного и внутримышечного введения трех разных концентраций бактериального меланина в динамике (на протяжении до 3-х ч регистрации), с восстановлением ответа до исходного уровня (рис. 2-4).

Особенно эффективной оказалась концентрация 0,0045 г/л (рис. 2 и 3). Она, по нашему мнению, явилась оптимальной в связи с её «мягким» действием (характерным первоначальным возбуждением и/или торможением с последующим нередко быстрым восстановлением исходного уровня постстимульной частоты активности исследуемого нейрона с дальнейшим феноменом отдачи в виде повышения частоты активации и повторным восстановлением до постстимульного уровня без применения препарата).

Регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 15, 18, 26 (A); 34, 42 (B); 50 (C) мин.

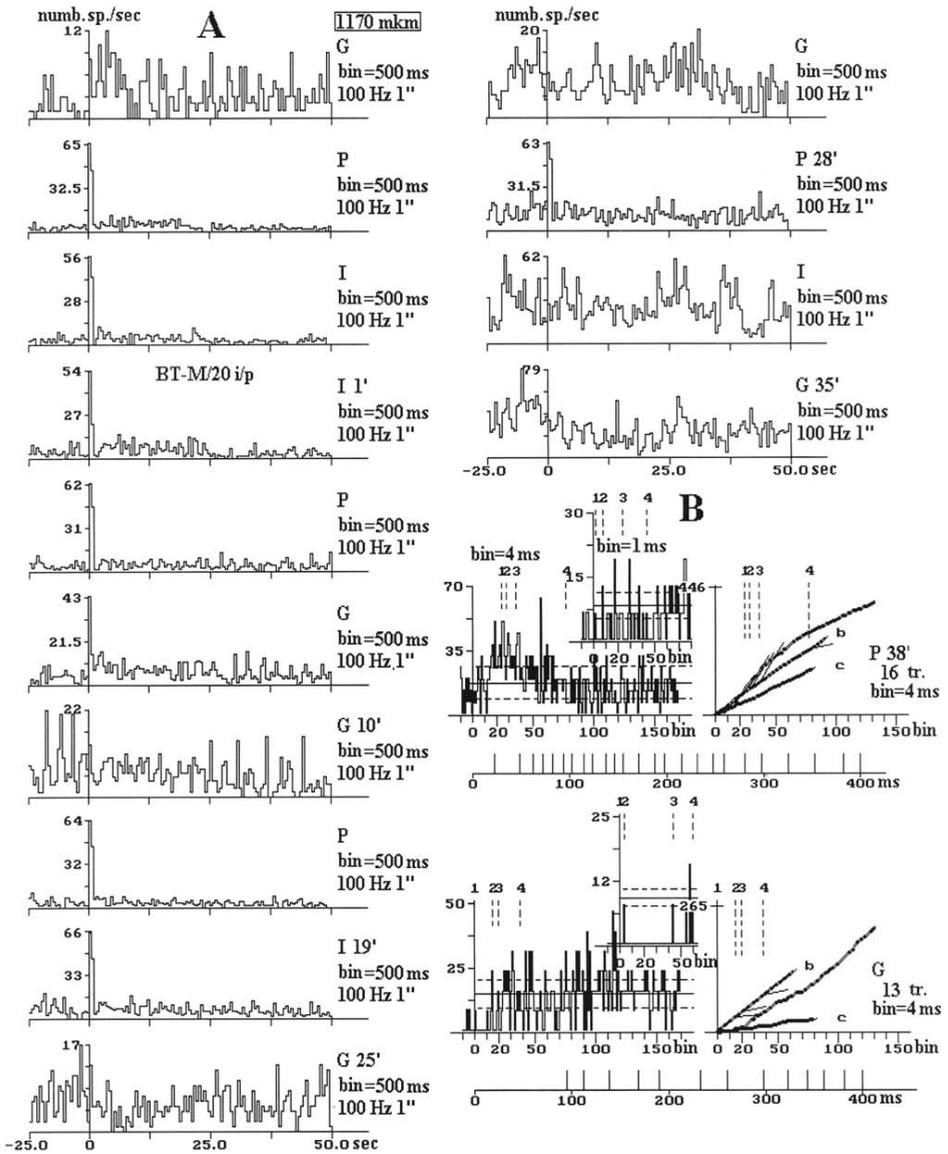


Рис. 1. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на единичную и частотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G у интактных крыс.

A – регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 19, 25, 28 и 35 мин.

B – аппроксимирующие кривые, построенные на основе зарегистрированных гистограмм. По углам наклона аппроксимирующих кривых рассчитывалась значимость изменения тонической активности нейрона по сравнению с фоновой. Анализ данных, полученных при частотном раздражении, проводился на основе графиков скользящей частоты.

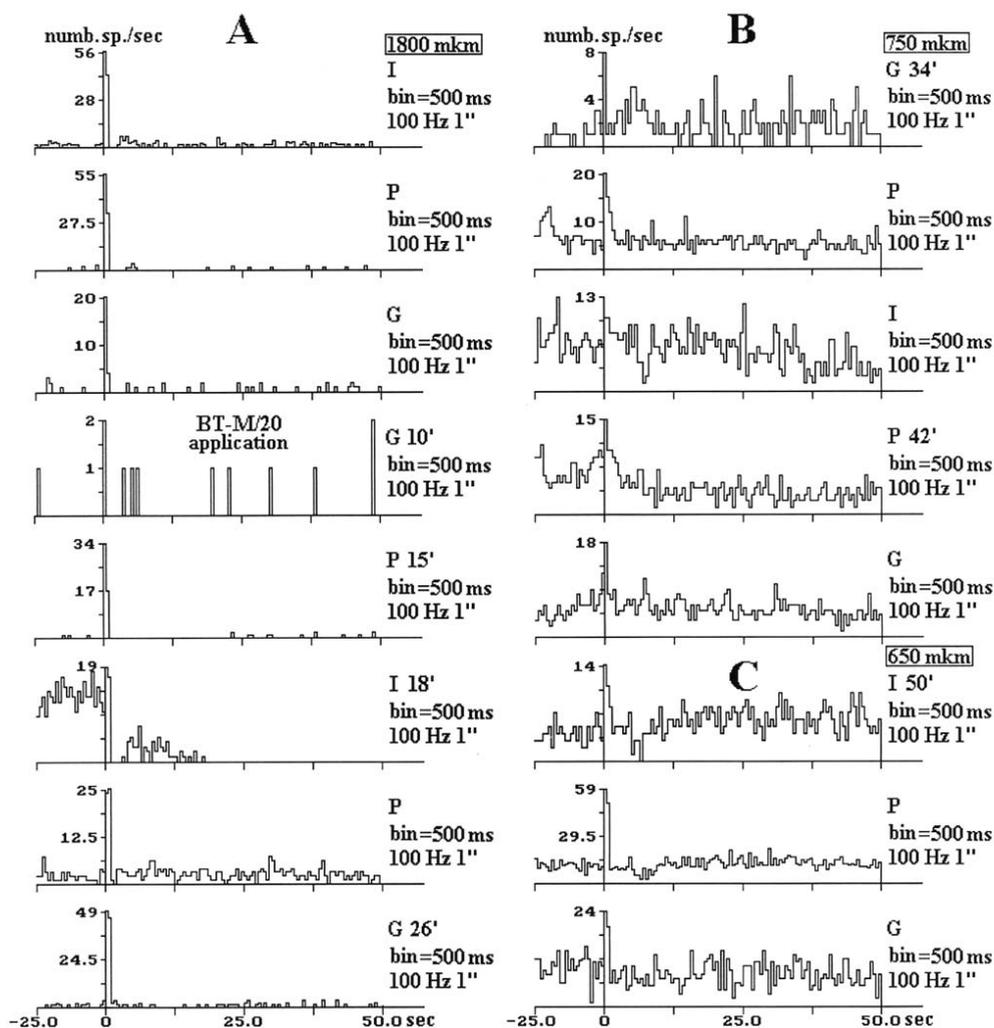


Рис. 2. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на высокочастотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G в условиях непосредственной аппликации меланина в концентрации 4,5 мг/мл (M20 – 20-кратное разведение начальной концентрации).

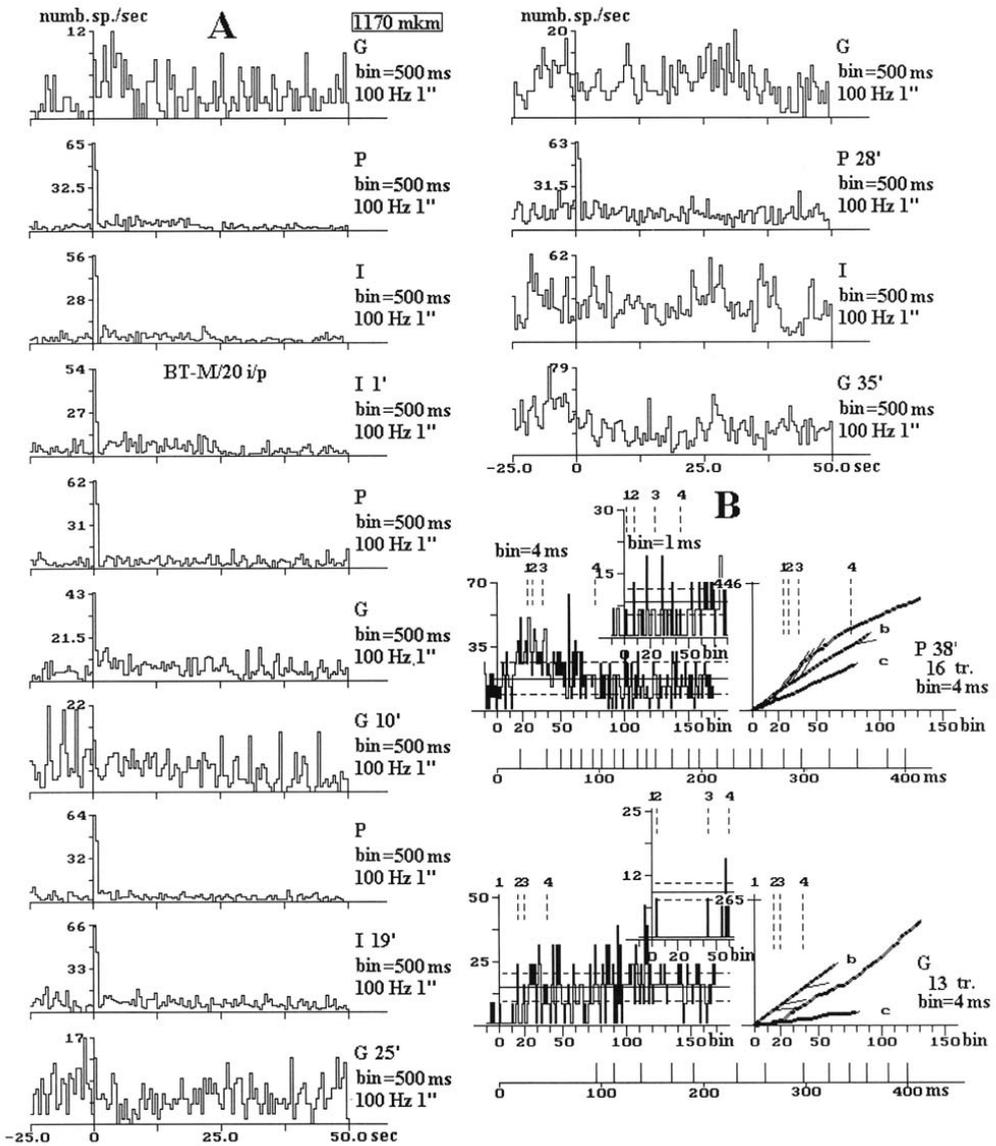


Рис. 3. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на единичную и частотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G, в условиях внутрибрюшинного введения меланина в концентрации 4,5 мг/мл (M20).

A – регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 19, 25, 28, 35 мин.

B – аппроксимирующие кривые, построенные на основе зарегистрированных гистограмм. По углам наклона аппроксимирующих кривых рассчитывалась значимость изменения тонической активности нейрона по сравнению с фоновой. Анализ данных, полученных при частотном раздражении, проводился на основе графиков скользящей частоты.

Что же касается остальных испытанных более высоких концентраций, то можно отметить следующее. Концентрация 0,009 г/л чаще оказывалась резко и длительно тормозящей, нередко с ПТД,

независимо от формы применения, иногда этот эффект прослеживался до 2-3 ч и более. А концентрация 0,006 г/л выявила промежуточные значения постстимульных проявлений активности (рис. 4).

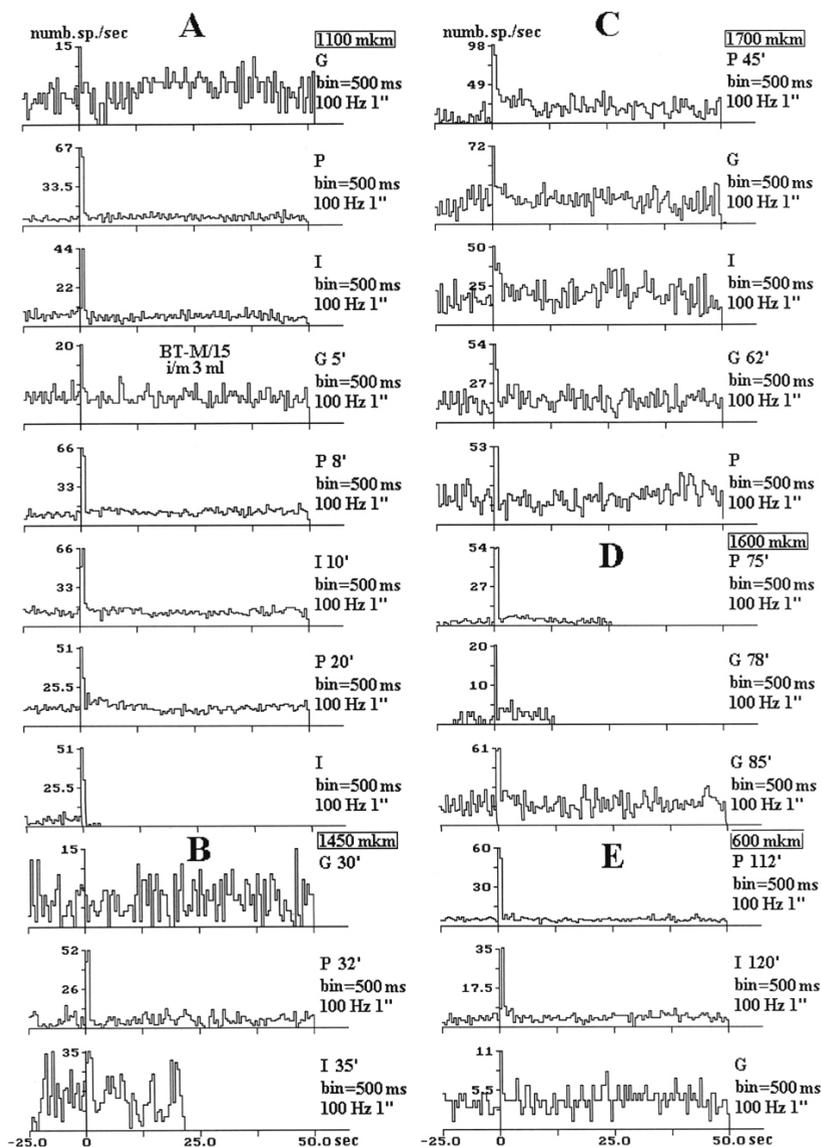


Рис. 4. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на высокочастотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G, в условиях внутримышечного введения меланина в концентрации 6 мг/мл (M15).

Регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 20 (A); 30, 32, 35 (B); 45, 62 (C); 75, 78, 85 (D); 112, 120 (E) мин.

Однако их объединяло характерное первоначальное урежение активности с последующим ее учащением и дальнейшим восстановлением. Более того, в отношении всех изученных концентраций препарата была выявлена интересная разница не только в степени, но и в характере постстимульных изменений частоты активации от различных нервов задней конечности. Подобный феномен, предполагается, обусловлен их принадлежностью к различной ступени эволюционного развития, в частности – флексорных произвольных точностных движений и экстензорных, больше обслуживающих поздние установки. Нередко препарат проявлял выраженный эффект в отношении флексорного нерва при отсутствии такого в ответе экстензорного. Но характерным паттерном для всех серий испытаний является высокий уровень посттетанической активности после раздражения п. *Gastrocnemius*. Данная особенность была зарегистрирована при внутримышечном, внутрибрюшинном введении вещества, а также при прямой аппликации.

На концентрацию раствора меланина, равную 0,006 г/л, особенно при внутрибрюшинном введении, наблюдалось некоторое начальное возбуждение испытуемых нейронов, за которым следовало торможение с последующим облегчением и восстановлением их активности.

Выводы

Таким образом, характер постстимульного ответа оказался прямо зависящим от испытуемой концентрации раствора.

Результаты исследования показали, что метод внутримышечного введения

является самым удачным в том аспекте, что при прямой аппликации бактериальный меланин действует очень быстро. Эффекты при внутримышечном введении длятся намного дольше (2-3 ч), создавая возможность для обстоятельного исследования.

Самой надежной концентрацией является концентрация 4,5 мг/мл, которая вызывает стабильное и длительное повышение активности корковых нейронов. Картины посттетанических ответов практически идентичны при прямой аппликации и внутримышечном и/или внутрибрюшинном введении меланина при применении одной и той же концентрации. Такая корреляция результатов свидетельствует о том, что повышение нейрональной активности при введении низкой концентрации (4,5 мг/мл) раствора обусловлено применением меланина.

Полученные данные сопоставимы с результатами регистрации электрической активности глубоких допаминергических нейронов черного вещества мозга [12]. Активирующее влияние бактериального меланина может способствовать процессам восстановления при нейродегенеративных заболеваниях.

Список литературы

1. *Faucheux B.A., Martin M.E., Beaumont C., Hauw J.J., Agid Y., Hirsh E.C.* Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2003. N. 5. P. 1142-1148.
2. *Froc D.J., Capman C.A., Trepel C., Racine R.J.* Long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of reely moving rat // *J. Neurosci.* N. 20 (1). P. 438-445.
3. *Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Kipriyan T.K., Sarkissian E.J., Chavushyan E.A., Sulkhanyan R.M., Meliksetyan I.E., Abrahamyan S.S., Grigorian Y.Kh., Avetisyan Z.A., Otieva N.A.*

- Protective effect of a new hypothalamic peptide against cobra venom and trauma induced neuronal injury // *Neurochem. Res.* 2001. N. 26. P. 1023-1038.
4. *Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Kipriyan T.K., Sarkissian E.J., Grigorian Y.Kh., Sulkhanyan R.M., Khachatryan T.S.* Comparison of the protection against neuronal injury by hypothalamic peptides and by dexamethasone // *Neurochem. Res.* 2000. N. 25. P. 1567-1578.
 5. *Gao X.B., van den Pol A.N.* Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus // *J. Physiol.* 2001. N. 533 (Pt 1). P. 237-252.
 6. *Gerren R.A., Weinberger N.M.* Long term potentiation in the magnocellular medial geniculate nucleus of anesthetized cat // *Brain Res.* 1983. N. 265. P. 138-142.
 7. *Gevorgyan O.V.* Neuronal activity of sensorimotor cortex on the mesencephalic reticular formation stimulation // *Biol. J. of Armenia.* 1987. V. 40. N. 12. P. 993-997.
 8. *Hicks S.P., D'Amato C.I.* Locating corticospinal neurons by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase // *Exp. Neurol.* 1977. N. 56. P. 410-420.
 9. *Komatsu Y., Toyama K., Maeda J., Sakaguchi H.* Long term potentiation investigated in a slice preparation of striate cortex of young kittens // *Neurosci. Lett.* 1981. N. 26. P. 269-274.
 10. *Monfils M.H., Teskey G.C.* Induction of long-term depression is associated with decreased dendritic length and spine density in layers III and V of sensorimotor neocortex // *Synapse.* 2004. N. 2. P. 141-121.
 11. *Monfils M.H., Teskey G.C.* Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioral long-term potentiation // *Neuroscience.* 2004. N. 125 (2). P. 329-336.
 12. *Petrosyan T.R., Chavushyan V.A., Hovsepian A.S.* Bacterial melanin increases electrical activity of neurons in Substantia Nigra pars compacta // *J. of Neural. Transmission.* Springer. 2014. N. 121. P. 259-265.
 13. *Varas M., Perez M., Mouzon M.E., de Barioglio S.R.* Melanin concentrating hormone, hippocampal nitric oxide levels and memory retention // *Peptides.* 2002. N. 12. P. 2213-2221.
 14. *Wilczok T., Stepien K., Dzierzega-Leczmar A., Zajdel A., Wilczok A.* Model neuromelanins as antioxidative agents during lipid peroxidation // *Neurotox. Res.* 1999. N. 2. P. 141-147.

Effects of different concentrations of bacterial melanin on the electrical activity of neurons in the cerebral cortex in response to stimulation of the rat hindlimb nerves

T.R. Petrosyan, V.A. Chavushyan, A.S. Ter-Markosyan, A.S. Hovsepian

In order to detect changes in the post-stimulus electrical activity of neurons in sensorimotor cortex (SMC) induced by the influence of different concentrations of bacterial melanin, high-frequency tetanic activation of cortical neurons was studied in response to stimulation of peripheral nerves of rat hindlimb. The corresponding post-tetanic short (STP) and/or long-term (LTP) changes in the activity of cortical neurons, caused by the mobilization of a mediator, were registered. The nature of the impact was directly dependent on the concentration of the tested solution. The method of intramuscular injection is recognized as the best method for this research. The pattern of posttetanic responses was almost identical after direct application and intramuscular and/or intraperitoneal injection of melanin at use of the same concentration. The increase of neuronal activity was noted by introduction of low concentration of solution of melanin. The most reliable concentration is the concentration of 4.5 mg/ml, which induces stable and long-lasting increase in the activity of the cortical neurons. Activating effect of bacterial melanin can contribute to the recovery processes in neurodegenerative diseases.

Key words: melanin, the neurons of the sensorimotor cortex, evoked neuronal activity.

Влияние синтетических пребиотиков на психоэмоциональное состояние крыс

Ю.В. Фокин¹, А.М. Зубалий², М.К. Чугреев², М.М. Борисова²,
О.В. Алимкина¹

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

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

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

Пищевые добавки на основе пребиотиков способствуют нормализации психоэмоционального состояния крыс, поддержанию его на достаточно высоком уровне комфорта и имеют седативное действие, что отражается в ультразвуковой вокализации животных. Курсовое потребление биологически активных добавок на основе лактулозы, янтарной и аминокислот не изменяет нормальных поведенческих реакций крыс, что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния данных средств. Анализ свободного поведения и ультразвуковой вокализации крыс может служить объективным методом оценки эффектов пребиотиков, БАДов и других средств аналогичного действия.

Ключевые слова: пребиотики, пищевые биологически активные добавки, психоэмоциональное состояние, поведение, ультразвуковая вокализация, крысы.

Введение

Биологически активные добавки к пище (БАД) – термин, вошедший в современную медицину сравнительно недавно. Однако ещё до новой эры во многих странах Востока сложились довольно стройные системы профилактики и терапии различных заболеваний человека путём использования, чаще всего, в натуральном виде, специально приготовленных продуктов из растительных и животных тканей, минерального сырья. БАДы улучшают самочувствие, способствуют более быстрому выздоровлению при многих болезнях, но, как и лекарства, принимать их следует с большой осторожностью.

Цель исследования – оценить влияние месячного потребления пищевых биологически активных добавок на основе пребиотика-лактюлозы на поведение и ультразвуковую вокализацию крыс.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в НЦБМТ ФМБА России. Тестировались самки крыс линии WAG/GY в возрасте 3 мес., по 8 особей в контрольной и опытной группах.

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

(ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [2]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ ФМБА России.

Дизайн и организация исследования направлены на изучение поведенческих форм животных, употребляющих пищевые биологически активные добавки на основе лактулозы, а также их ультразвуковой вокализации (УЗВ) и выявление взаимосвязи данных характеристик с психоэмоциональным состоянием крыс. Количество объектов, принимающих участие в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемого эффекта.

Условия кормления и содержания. Крыс содержали в микроизоляторной системе RairIsoSystem по 4 особи. Животные соответствовали категории конвенциональных. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине

7 дней в клетках.

Исследуемые вещества – пищевые биологически активные добавки на основе лактулозы – дисахарида, состоящего из остатков молекул галактозы и фруктозы. Лактулоза является синтетическим стереоизомером молочного сахара – лактозы, используется в качестве стимулирующего перистальтику кишечника лекарственного средства, применяется при диагностике нарушений желудочно-кишечного тракта, запорах, печёночной энцефалопатии. Тестируемые вещества («Гликолакт» и «Lar-Su», производство ООО «ЯНИЦПП «Парадокс», г. Ростов, Россия), в состав которых также входят глицин и янтарная кислота, применялись в качестве питьевой добавки в рекомендуемых производителем дозах в течение 30 суток. Контрольной группе животных в аналогичном режиме давалась водопроводная очищенная вода в стандартных поилках, вволю.

Регистрация поведенческих компонентов происходила с применением компьютерной системы Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая позволяла вычислять длительность таких форм поведения, как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность (иммобилизация), стойки (вертикальная активность), умывание (груминг). Кроме того, оценивалось время так называемых нераспознанных системой Laboras движений [5]. Эпоха анализа составляла 15 мин. За исследуемый временной промежуток (до начала и после окончания эксперимента) по каждому животному определяли процент каждой формы поведения. Полученные данные группировали в зависимости от тестируемого вещества, временного интервала исследования и формы поведения.

Регистрация УЗВ. Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрацию ультразвуковых колебаний (в течение 15 мин) у каждого животного сначала осуществляли в состоянии покоя (фоновые данные), затем – после окончания курса потребления тестируемого вещества. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье – 2000 интервалов. В ходе анализа спектральную плотность мощ-

ности ультразвука (СПМ), излучаемого каждым животным, нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения приводили в соответствие с максимумом. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам. Ввиду того, что в разные периоды регистрации не все животные излучали ультразвуковые колебания (число N варьировалось), для оценки статистической значимости изменений по сравнению с фоновыми данными был применен анализ ANOVA для несвязанных групп.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования свободного поведения животных, принимавших участие в эксперименте, представлены в табл.

Таблица

Длительность поведенческих форм животных (в среднем по группе, $M \pm m$), сек

Группа животных	До начала эксперимента (фон)					После окончания эксперимента				
	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.
Гликолакт	291,9	43,5	41,2	264,6	258,8	366,8	60,2	98,5	263,7	110,8
	± 7,75	± 8,33	± 7,91	± 30,14	± 23,65	± 11,57	± 10,00	± 14,64	± 27,26	± 9,10
Lar-Su	301,9	35,4	92,6	224,8	245,3	265,3	36,1	220,7	148,5	229,4
	± 9,49	± 5,0	± 15,29	± 22,15	± 9,14	± 8,18	± 5,43	± 21,40	± 12,91	± 18,54
Контроль	320,6	60,5	87,2	277,9	153,8	328,1	46,8	224,8	178,4	121,9
	± 11,15	± 12,01	± 9,45	± 24,58	± 13,03	± 10,61	± 7,56	± 23,82	± 15,01	± 10,51

Примечание:

ЭСП – элементы системного поведения,
Г.а. – горизонтальная активность (локомоции),
Им. – иммобилизация (неподвижность),
В.а. – вертикальная активность (стойки),
Гр. – груминг (умывание).

Оценка элементарных форм поведения контрольной группы животных показала возрастание времени неподвижности и прочих элементов системного поведения, снижение двигательной активности и умывания после эксперимента по сравнению с фоновыми данными. Возрастание времени неподвижности и снижение длительности умывания отмечалось и в обеих опытных группах. В группе «Гликолакт» отмечалось также повышение горизонтальной активности и незначительное снижение вертикальной активности, показатели которой практически аналогичны таковым, полученным в фоновых замерах, на фоне возрастания элементов системного поведения. В группе «Lar-Su» наблюдалась похожая, но несколько иная картина: повышение горизонтальной, снижение вертикальной активности и длительности элементов системного поведения.

Снижение длительности умывания, в целом, не является позитивным признаком при оценке поведения, но обнару-

жение данного эффекта в контрольной группе указывает, возможно, на изменения погодных условий (осадков, скачков атмосферного давления и т.д.) в период финального исследования, на которые могли отреагировать животные.

Таким образом, можно заключить, что исследуемые препараты практически не оказывают влияния на поведение крыс. А это может свидетельствовать об отсутствии негативных свойств, в т.ч. токсичности, данных средств.

Результаты исследования УЗВ тестируемых животных представлены на рис. 1-3.

Фоновые измерения УЗВ контрольной группы крыс (рис. 1) выявили преобладание частот в диапазоне 31-47 кГц с пиком на 41 кГц, что является показателем комфортного состояния данных животных [1, 3, 4, 7, 9, 11]. По окончании эксперимента в УЗВ этих животных преобладают частоты в области 20-27 кГц с пиком на 22 кГц, отмечается снижение СПМ УЗВ в диапазоне комфорта, что

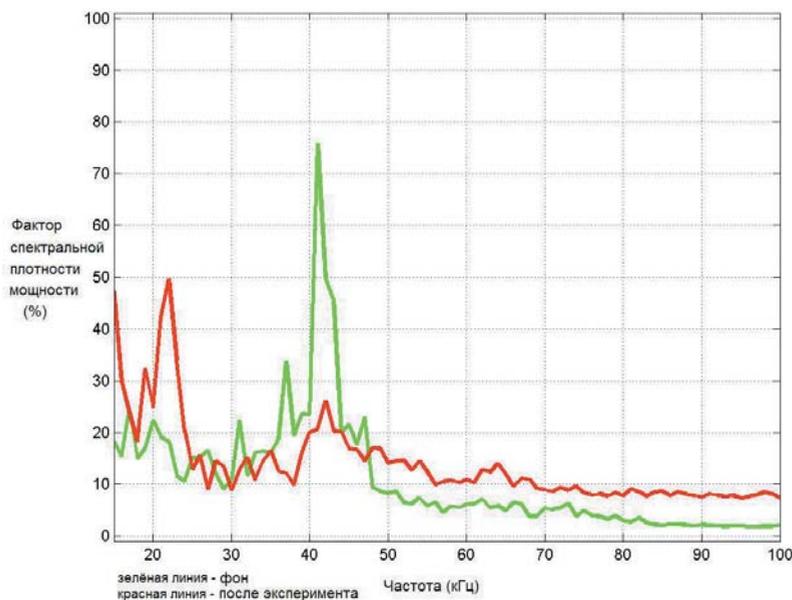


Рис. 1. УЗВ животных контрольной группы.

свидетельствует о пребывании крыс в тревожном, взволнованном состоянии [1, 3, 6, 8, 10].

Причиной этого могут являться те же измененные погодные условия на

данном этапе исследования, что было указано выше, в описании результатов свободного поведения.

Фоновые измерения УЗВ опытной группы «Гликолакт» (рис. 2) показали

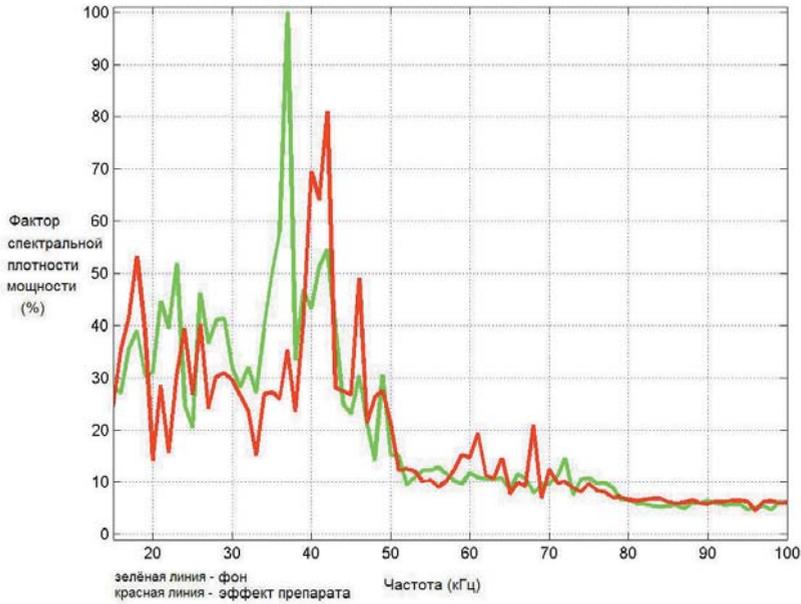


Рис. 2. УЗВ животных группы «Гликолакт».

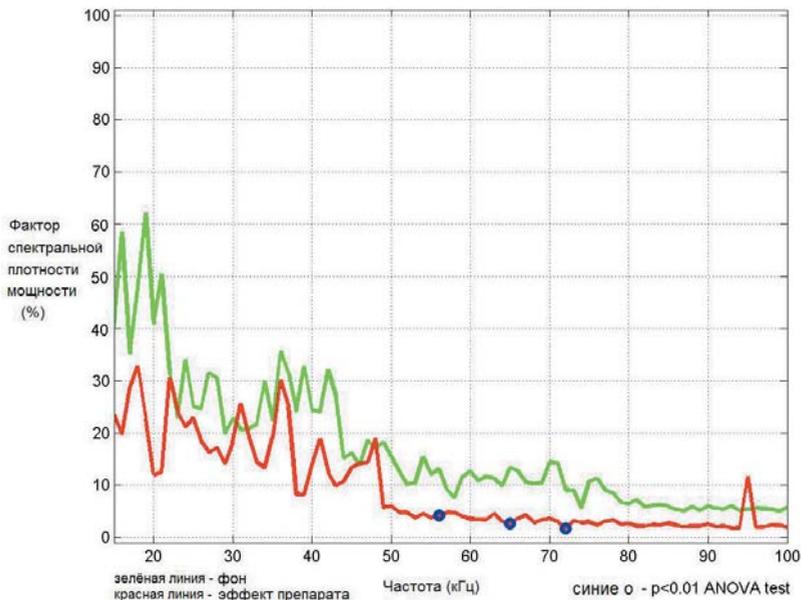


Рис. 3. УЗВ животных группы «Lar-Su».

преобладание частот «диапазона комфорта» (32-45 кГц) с максимумом в точке 37 кГц. Дополнительные пики имеются в «диапазоне тревоги» (20-30 кГц), однако их мощность почти в половину меньше, чем в преобладающем диапазоне. После курса применения Гликолакта картина УЗВ, в целом, аналогична полученной в фоновых измерениях. Наибольшая спектральная мощность отмечается в «диапазоне комфорта» (33-48 кГц, с пиком в точке 42 кГц), также имеются дополнительные пики в «диапазоне тревоги», однако их мощность ещё ниже, чем в фоне. Полученные результаты свидетельствует о том, что исследуемое средство поддерживает положительное эмоциональное состояние крыс на достаточно высоком уровне комфорта и даже несколько снижает тревожность и напряженность, обладает слабым седативным эффектом (за счет присутствия в составе аминокислоты глицина) [12].

Результаты фоновых измерений УЗВ опытной группы животных, на которых тестировалась пищевая добавка Lar-Su (рис. 3), имеют достаточно сложную интерпретацию. В психоэмоциональном состоянии крыс преобладают признаки тревоги и беспокойства, на что указывает преобладание частот в области 20 кГц. Мощность ультразвука в «диапазоне комфорта» на 20-30% ниже.

Однако после окончания курса применения Lar-Su график несколько выравнивается, мощность УЗВ в диапазонах «тревоги» и «комфорта» практически одинакова. Наблюдаемый эффект указывает на позитивное влияние исследуемого средства, применение которого, по всей видимости, способствует нормализации психоэмоционального состояния

крыс (предположительно, за счет присутствия в составе янтарной кислоты [13], являющейся непосредственным и очень важным участником энергетического обмена в организме, улучшающей самочувствие и снижающей ощущение усталости и недомогания), имеет достаточно выраженное седативное действие.

Выводы

1. Курсовое потребление (в течение месяца) пищевых добавок на основе пребиотиков способствует нормализации психоэмоционального состояния крыс, поддержанию его на достаточно высоком уровне комфорта и оказывает седативный эффект, что отражается в ультразвуковой вокализации животных.

2. Пищевые биологически активные добавки на основе лактулозы, янтарной и аминокислот не изменяют нормальных поведенческих реакций крыс, что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния данных средств.

3. Исследование свободного поведения и вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне может служить объективным методом оценки эффектов пребиотиков, БАДов и других средств аналогичного действия.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и её информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 4-23.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
3. Фокин Ю.В. Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения

- на вокализацию крыс в ультразвуке // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 84-91.
4. **Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н.** Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 17-21.
 5. **Фокин Ю.В.** Пептидная регуляция системного поведения крыс // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 92-97.
 6. **Blanchard R.J., Blanchard D.C., Agullana R., Weiss S.M.** Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems // *Physiol. Behav.* – 1991. – № 50. – P. 967-972.
 7. **Brudzynski S.M.** Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: Acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding // *Behav. Brain Res.* – 2007. – № 182. – P. 261-273.
 8. **Burgdorf J., Knutson B., Panksepp J., Shippenberg T.S.** Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs // *Psychopharmacology.* – 2001. – № 155. – P. 35-42.
 9. **Knutson B., Burgdorf J., Panksepp J.** Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats // *Psych. Bull.* – 2002. – № 128. – P. 961-977.
 10. **Sanchez C.** Stress-induced vocalization in adult animals. A valid model of anxiety? // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – № 463(1-3). – P. 133-43.
 11. **Thompson B., Leonard K.C., Brudzynski S.M.** Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: A quantitative mapping study and acoustic analysis // *Behav. Brain Res.* – 2006. – № 168. – P. 64-73.
 12. <http://visceralperm.ru/store/glikolakt.html>, режим доступа: свободный. – Загл. с экрана. Яз. рус.
 13. <http://visceralperm.ru/store/lar-su.html>, режим доступа: свободный. – Загл. с экрана. Яз. рус.

Effect of synthetic prebiotics on the psychoemotional state of rats

Yu.V. Fokin, A.M. Zubaliy, M.K. Chugreyev, M.M. Borisova, O.V. Alimkina

Dietary supplements based on prebiotics contribute to the normalization of psychoemotional state of rats, keeping it at a high level of comfort and have a sedative effect, which is reflected in the ultrasonic vocalizations of animals. A course of consumption of dietary supplements on the basis of lactulose, succinic acid and glycine does not alter the normal behavioral responses of rats, which may testify to lack of negative influence of these means. Analysis of free behavior and ultrasonic vocalization of rats can serve as an objective method for assessing the effects of prebiotics, dietary supplements and other means of similar effect.

Key words: prebiotics, dietary supplements, psychoemotional state, behavior, ultrasonic vocalization, rats.

Сравнительная оценка влияния ультрадисперсных систем на основе комплексов хитозана и его производных с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства эритроцитов

В.Г. Шамратова, Л.А. Шарафутдинова, З.Р. Хисматуллина,
М.В. Базунова, Е.И. Кулиш, Д.Р. Валиев

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа

Контактная информация: к.б.н., доц. Шарафутдинова Люция Ахтямовна, sharafa@yandex.ru

В статье представлены результаты исследования влияния растворов хитозана, натриевой соли сукциноила хитозана и их полимер-коллоидных комплексов с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов на модели кислотного гемолиза. Анализ кислотных эритрограмм позволил определить, что изученные соединения оказывают существенное влияние на функциональное состояние мембран клеток крови крыс. Показано влияние исследуемых веществ на характер распределения эритроцитов по степени их устойчивости и на кинетические параметры (начало, интенсивность и завершение процесса их разрушения) под действием повреждающего агента (соляной кислоты). Сравнительный анализ результатов убеждает, что растворы хитозана, сукциноила хитозана и дисперсных систем на основе полимер-коллоидных комплексов хитозана и сукциноила хитозана с коллоидными частицами йодида серебра способны различным образом модулировать матричные свойства эритроцитов крови.

Ключевые слова: гемосовместимость, кислотная резистентность эритроцитов, хитозан, коллоидные частицы йодида серебра.

Введение

Поиск и внедрение новых способов направленной доставки лекарственных веществ к пораженным участкам организма, новых методов пролонгирования терапевтического действия лекарств позволяет существенно повысить эффективность медикаментозного лечения [7]. В качестве средств направленной доставки лекарственных веществ пролонгированного действия часто используются наноразмерные системы на основе природных и синтетических биодegradуемых биосовместимых полимеров, в т.ч. хитозана (ХТЗ) и его производных.

Положительный заряд макромолекул ХТЗ способствует его проникновению через клеточные мембраны и плотные слои эпителия, обеспечивает хорошую адгезию к слизистым оболочкам и бактериостатические свойства.

При создании носителей лекарственных средств на основе ХТЗ и его производных особый интерес вызывают самопроизвольно формирующиеся агрегаты макромолекул данных полисахаридов. При этом размеры агрегатов зависят от содержания ассоциирующих и заряженных групп. Однако имеющиеся экспериментальные данные противоре-

чивы. Также имеются сведения о нестабильности ассоциированных систем на основе ХТЗ и его производных [5].

Немаловажное значение имеет размер полимерных наночастиц для направленной доставки лекарственных средств. Так, известно, что полимерные носители размером порядка 100-200 нм могут обеспечить направленный транспорт противотуберкулёзных препаратов непосредственно в макрофаги, т.к. макрофаги способны поглощать инородные объекты именно таких размеров [1]. Частицы меньшего размера (от 30-40 до 200 нм) могут пассивно аккумулироваться в противоопухолевых очагах по механизму, известному как увеличенная проницаемость и удержание. Происходит это из-за повышенного кровоснабжения и пониженного лимфатического дренажа в опухоли [12].

Одним из подходов для создания стабильных наноструктурированных систем с регулируемыми размерами является использование способности макромолекул к самосборке путем межмолекулярной ассоциации через нековалентные связи – на примере полимер-коллоидных комплексов (ПКК) ХТЗ и его производных (например, натриевой соли сукциноила хитозана (СХТЗ)) с неорганическими коллоидными частицами лиофобных зольей (например, золь йодида серебра). Коллоидные неорганические частицы лиофобных зольей могут выступать в качестве ядра при капсулировании маслорастворимых лекарственных веществ с использованием нано- и микроразмерных контейнеров [3].

Коллоидные системы доставки лекарств обычно разрабатываются как для перорального, так и для внутривенного введения препаратов [7]. Следователь-

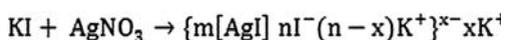
но, особую значимость приобретают данные о гемосовместимости растворов исходных полисахаридов ХТЗ и СХТЗ и дисперсных систем «ПКК ХТЗ : золь йодида серебра» и «СХТЗ : золь йодида серебра». Кровь как одна из биологических жидкостей организма отвечает качественными и количественными изменениями своего состава на какие-либо экзогенные и эндогенные факторы, а значит, служит своего рода информативным биомаркером, позволяющим установить критические точки перехода от резко выраженного токсического до стимулирующего эффекта. Таким образом, система крови играет основополагающую роль в резистентности организма к действию различных факторов. Эритроциты, как и другие клетки крови, реагируют на изменения внешней и внутренней среды, но в силу морфологической простоты, их патологические реакции малоинформативны. Поэтому действие отдельных химических веществ в субтоксических дозах, как правило, не вызывает микроскопически наблюдаемых изменений. Однако одним из проявлений их влияния могут быть сдвиги устойчивости клеток к воздействию гемолитических агентов. Нарушения функций биомембран под влиянием различных экзогенных веществ во многих случаях являются не только результатом, но и причиной патологических изменений в клетке и организме в целом [10].

В связи с вышесказанным, **целью** нашего исследования явилось изучение влияния образцов растворов ХТЗ, СХТЗ и ПКК ХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов на модели кислотного гемолиза.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ХТЗ (степень деацетилирования 82%, М.м.=80000 а.е.м.) и СХТЗ (М.м.=207 кДа, степень замещения 75%) производства ЗАО «Биопрогресс» (Россия).

Золи AgI получены по стандартной методике из 7-ми мл 0,01Н раствора нитрата серебра и 10 мл 0,01Н раствора йодида калия.



Размер частиц исходных мицелл AgI, определенный двумя независимыми методами (по данным турбидиметрии при длине волны 440 и 490 нм с помощью прибора ФЭК-56 и на анализаторе размеров частиц «Shimadzu Salid – 7101»), составил от 95 до 120 нм.

Дисперсные системы на основе ПКК СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра получены смешением водного раствора СХТЗ концентрацией 0,4% со свежеприготовленным золем AgI в объёмном соотношении 1:1 и 2:1 (далее – СХТЗ:золь AgI 1:1 и СХТЗ:золь AgI 2:1).

Дисперсные системы на основе ПКК ХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра получены смешением раствора ХТЗ в 1%-ной уксусной кислоте со свежеприготовленным золем AgI в объёмном соотношении 1:1 (далее – ХТЗ:золь AgI 1:1).

Размер частиц дисперсий СХТЗ:золь AgI 1:1, СХТЗ:золь AgI 2:1 и ХТЗ:золь AgI 1:1, определённый на анализаторе размеров частиц «Shimadzu Salid – 7101», составил от 100 до 375 нм.

Влияние растворов ХТЗ, СХТЗ и дисперсных систем на основе ПКК ХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов оценива-

ли методом регистрации кинетики кислотного гемолиза [2]. В эксперименте *in vitro* использовали кровь в количестве 0,5 мл, полученную из хвостовой вены крыс линии Wistar (n=20) массой 200-250 г, с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Страсбург, 1986) и Федеральным законом Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Изучение степени влияния ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных на физико-химические свойства белково-липидных комплексов плазматических мембран осуществляли на модельной системе ХО-эритроциты–HCl по изменению химической резистентности эритроцитов к воздействию HCl (0,08 мл) в изотоническом растворе NaCl (0,85%). Гемолиз эритроцитов проводили в кварцевых кюветах с наружными размерами 20x40x10 мм и рабочим объемом 5 мл. В качестве действующих агентов использовали исходный золь AgI, водный раствор СХТЗ концентрацией 0,2% мас., раствор ХТЗ в 1%-ной уксусной кислоте концентрацией 0,5% мас., дисперсии СХТЗ:золь AgI 1:1 и СХТЗ:золь AgI 2:1, ХТЗ:золь AgI 1:1.

Интенсивность процессов гемолиза во времени регистрировали фотометрически при помощи КФК-3. Определение экстинкции проводили каждые 15 с до полного прекращения ее изменений. Уменьшение экстинкции – следствие постепенного разрушения эритроцитов, причем сначала разрушаются те клетки, резистентность которых к соляной кислоте слабее. По полученным значениям

строили кислотные эритрограммы, наглядно изображающие распределение эритроцитов по стойкости: по оси абсцисс – время гемолиза, являющееся мерой стойкости; по оси ординат – процент эритроцитов. В контроле дифференциальная кривая распределения эритроцитов по стойкости имеет вид одновершинной кривой с круто спадающими ветвями. Анализ кинетики кислотных эритрограмм проводили по следующим показателям: время начала, окончания и пика гемолиза, ширина интервала доминирующей группы эритроцитов в популяции. Рассчитывали долю клеток с разной стойкостью в общей популяции эритроцитов.

Математико-статистическую обработку результатов проводили в пакете прикладных программ Statistica v. 7.0 («StatSoft Inc.», США). Сравнение показателей кислотных эритрограмм проводили с помощью непараметрического

критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney Test), нулевую гипотезу об отсутствии различий отвергали при $p < 0,05$.

Результаты исследований

На рис. 1 представлены эритрограммы кислотной резистентности эритроцитов. У эритроцитов контрольной пробы кислотная эритрограмма одновершинная, отсутствует строгая симметричность, которая свидетельствует о некой разнородности популяции эритроцитов. Вершина кривой приходится на $2 \pm 0,3$ мин от начала гемолиза. Продолжительность гемолиза составляет $5,5 \pm 0,1$ мин. Растяннутость правой ветви эритрограммы указывает на присутствие в кровяном русле молодых форм эритроцитов в результате умеренного напряжения эритропоэза. Доля низкостойких эритроцитов в диапазоне 0-1,5 мин составила $9,13 \pm 0,87\%$ (см. табл.). Доля основной популяции зрелых эритроцитов средней

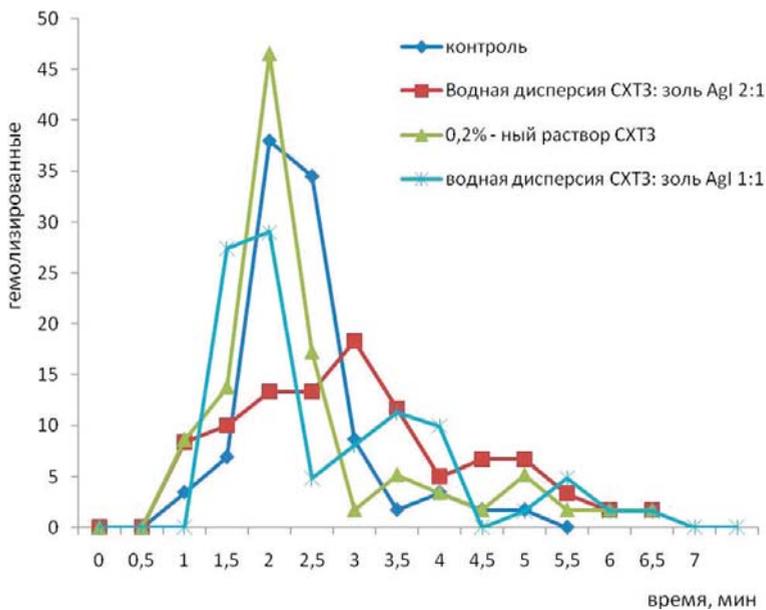


Рис. 1. Кислотные эритрограммы в контроле, после воздействия растворов натрия хлорида (СХТЗ) и полимер-коллоидных комплексов СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра.

Таблица

Показатели кислотной резистентности эритроцитов в контрольной группе и после воздействия растворов хитозана (ХТЗ), натриевой соли сукциноила хитозана (СХТЗ) и полимер-коллоидных комплексов (ПКК) хитозана и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	0,2% раствор СХТЗ	0,5% раствор ХТЗ в 1% уксусной кислоте	Водная дисперсия СХТЗ: золь AgI 2:1	Водная дисперсия СХТЗ: золь AgI 1:1	Водная дисперсия ХТЗ:Ag золь AgI 1:1
Время начала гемолиза, мин	0,5±0,01	1,00±0,1	1,5±0,4	1,00±0,1	1,5±0,2	1,5±0,3
Время окончания гемолиза, мин	5,5±0,1	6,5±0,2	6,5±0,4	6,5±0,3	6,5±0,2	6,5±0,4
Пик кислотной эритрограммы, мин	2,00±0,3	2,00±0,1	2,00±0,1	3,00±0,2*	2,0±0,1	3,00±0,2*
Ширина основания эритрограммы, мин	5,00±0,1	5,5±0,18	5,00±0,2	5,5±0,1	5,0±0,2	5,5±0,3
Процент высокостойких эритроцитов, %	12,9±1,6	11,5±1,4	13,16±2,1	34,1±4,7*	24,9±3,8*	24,6±2,9*
Процент эритроцитов повышенной устойчивости, %	4,78±0,31	8,6±1,1*	6,96±0,8	19,1±2,6*	13,00±2,1*	21,2±2,9*
Процент среднестойких эритроцитов, %	73,19±5,86	63,3±4,7	72,5±5,2	35,8±3,7*	52,3±4,6*	41,6±4,1*
Процент низкостойких эритроцитов, %	9,13±0,87	16,6±1,4*	7,38±0,6	11,0±1,8	11,29±2,3	12,6±2,5

Примечание: * – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

стойкости в интервале 1,5-3 мин составила $73,19 \pm 5,86\%$, высокой стойкости в интервале 3-4,5 мин – $12,9 \pm 1,6\%$, повышенной стойкости – $4,78 \pm 0,31\%$.

После инкубации с 0,2% водным раствором СХТЗ эритрограмма сохраняет одновершинный вид и характеризуется левым сдвигом. Судя по расположению вершины эритрограммы, наибольшая

доля клеток гемолизирует на 2-й мин после воздействия HCl. Однако, в отличие от интактных эритроцитов, значительная часть клеток подвергается гемолизу уже на первых минутах. Доля низкостойких эритроцитов, которые гемолизируют в интервале 0-1,5 мин составляет $16,6 \pm 1,4\%$, что выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Таким образом, 0,2% водный

раствор СХТЗ вызывает заметное ускорение гемолиза. Доля же среднестойких эритроцитов, гемолизирующих в интервале 1,5-3 мин, составляет 63,3±4,7%.

При инкубации с СХТЗ:золь AgI 2:1 кислотная эритрограмма заметно отличается от таковой в контрольной группе. Кривая гемолиза в целом смещается вправо, указывая на то, значительная часть эритроцитов в эритроцитарной популяции после воздействия СХТЗ:золь AgI 2:1 повышает стойкость к повреждающему действию соляной кислоты. Так, пик эритрограммы приходится на 3,00±0,2 мин, доля высокостойких эритроцитов, подвергнутых гемолизу в диапазоне 3-4,5 мин, составляет 34,1±4,7%, что примерно в 3 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Продолжительность гемолиза также выше и составляет 6,5±0,3 мин. Доля эритроцитов повышенной устойчивости составляет 19,1±2,6%,

что почти в 4 раза выше, чем в контроле ($p < 0,01$). Таким образом, СХТЗ:золь AgI 2:1 увеличивает время, необходимое для осуществления процесса гемолиза. Очевидно, в данной композиции СХТЗ:золь AgI не только не вызывает повреждений мембраны эритроцитов, но и проявляет стабилизирующий эффект, что, вероятно, связано с более высокой концентрацией СХТЗ.

При анализе кривой распределения эритроцитов по стойкости после инкубации с СХТЗ:золь AgI 1:1 отмечено повышение доли эритроцитов высокой и повышенной устойчивости (24,9±3,8% и 13,00±2,1% соответственно) по сравнению с интактными клетками ($p < 0,01$).

После воздействия ХТЗ:золь AgI 1:1 кривая кислотного гемолиза также отличается от таковой интактных эритроцитов контрольной группы (рис. 2). При заметном увеличении диапазона стойко-

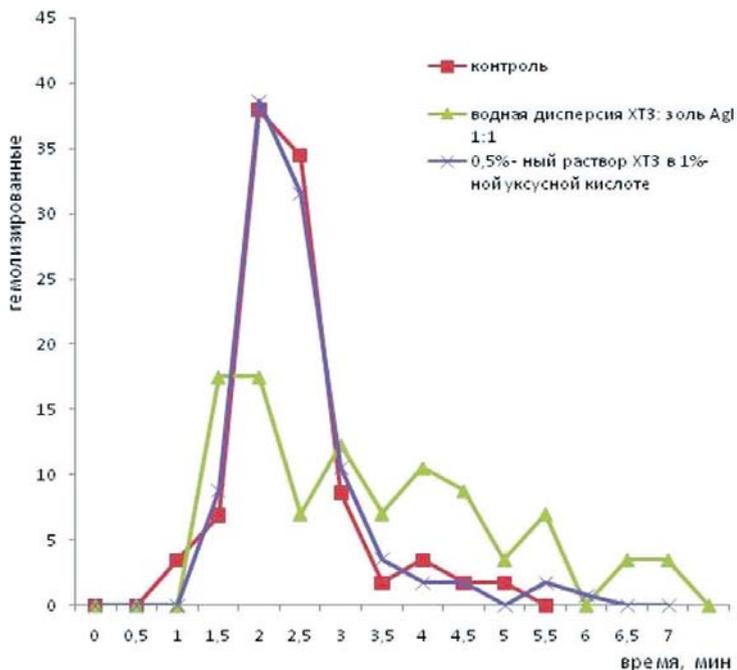


Рис. 2. Кислотные эритрограммы в контроле, после воздействия растворов хитозана (ХТЗ) и полимер-коллоидных комплексов хитозана с коллоидными частицами йодида серебра.

сти эритроцитов (6,5 мин) пик гемолиза приходится на $1,5 \pm 0,3$ мин. Однако процент гемолизированных эритроцитов к 3-й мин заметно ниже по сравнению с контролем и составляет $41,6 \pm 4,1\%$.

Контурсы кислотной эритрограммы после воздействия 0,5 % раствора ХТЗ в 1% уксусной кислоте совпадают с контрольной. Нами не было отмечено статистически значимых отличий параметров кривой распределения эритроцитов по стойкости ($p > 0,05$).

Обсуждение результатов

Характеристика функциональной полноценности клеток красной крови как интегрального показателя состояния организма имеет большое прогностическое значение. Совокупность физико-химических свойств мембран эритроцитов определяет их устойчивость к действию неблагоприятных факторов. В связи с этим, показатели устойчивости эритроцитов широко применяются в экспериментальной медицине для характеристики их функционального состояния. Нами предпринята попытка оценки устойчивости эритроцитов к кислотному гемолизу при воздействии растворов ХТЗ, СХТЗ и ПКК ХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра.

Результаты проведенных исследований показали, что изучаемые образцы оказывают существенное влияние на функциональное состояние мембран клеток крови крыс. Анализ кислотных эритрограмм позволил определить влияние ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных на характер распределения эритроцитов по степени их устойчивости, а также на кинетические параметры (начало, ин-

тенсивность и завершение процесса их разрушения) под действием повреждающего агента (HCl). Сравнительный анализ результатов убеждает, что протестированные объекты способны различным образом изменять структурно-функциональные свойства мембраны эритроцитов крови.

Исследование 0,2% водного раствора СХТЗ не обнаружило заметного влияния на исходную способность эритроцитов противостоять действию гемолитического агента. Данный образец ослаблял исходную базовую устойчивость эритроцитов к повреждающим воздействиям гемолитика.

Совершенно иную способность изменять функциональное состояние мембраны эритроцитов обнаружило соединение СХТЗ:золь AgI 2:1. Во все сроки наблюдения интенсивность разрушения красных клеток крови под действием соляной кислоты и общая продолжительность лизиса заметно различались с первоначальными характеристиками. Инкубация эритроцитарной массы с СХТЗ:золь AgI 2:1 увеличила долю стойких эритроцитов. По-видимому, в данной композиции СХТЗ оказывает стабилизирующий эффект на мембраны эритроцитов.

Оценивая степень резистентности после воздействия ХТЗ:золь AgI 1:1, следует отметить, что несмотря на некоторое уменьшение доли среднестойких эритроцитов ($41,6\%$), значительно увеличивается численность эритроцитов с высокой и повышенной устойчивостью по сравнению с контролем ($24,6 \pm 2,9\%$ и $21,2 \pm 2,9\%$ соответственно; $p < 0,01$). Обнаружено более позднее вовлечение эритроцитов в процесс гемолиза, что может свидетельствовать о некотором

протективном действии указанного соединения.

Таким образом, сопоставление результатов исследования влияния ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных на структурно-функциональные показатели эритроцитов продемонстрировало способность одних (СХТЗ:золь AgI 2:1, ХТЗ:золь AgI 1:1, СХТЗ:золь AgI 1:1) оказывать стабилизирующее действие на мембраны эритроцитов, а других (0,2% водный раствор СХТЗ) – вызывать снижение резистентности эритроцитов.

По мнению ряда авторов, химические агенты, в первую очередь, действуют на уровне циркулирующих клеток крови, регулируя их устойчивость [8]. В условиях непосредственного контакта с клетками в кровяном русле химические вещества увеличивают или уменьшают генетически детерминированную резистентность мембран, проявляя избирательность по отношению к клеткам популяций с исходно различной устойчивостью. Обнаруженное многообразие эффектов может определяться особенностями их влияния на характер связей между белковыми и липидными компонентами мембраны, уровень активности ферментных систем клетки, величину отрицательного заряда поверхности мембран [4, 6, 9]. Известно, что кислотная резистентность эритроцитов определяет, в основном, состояние фосфолипидного бислоя мембран эритроцитов [11]. Следовательно, можно предположить, что при воздействии ультрадисперсных систем на основе хитозана и его производных происходит перестройка липидного компонента мембран эритроцитов.

Заключение

Результаты настоящих исследований позволили предположить, что растворы хитозана, натриевой соли сукциноила хитозана и полимер-коллоидных комплексов хитозана и сукциноила хитозана с коллоидными частицами йодида серебра оказывают стабилизирующее и дестабилизирующее влияние на мембраны эритроцитов в зависимости от состава образца, что свидетельствует об их различной гемосовместимости и указывает на перспективность дальнейшего поиска комплексов с потенциально протекторными свойствами.

Список литературы

1. *Болотова Г.В.* Полимерные носители для противотуберкулезных лекарственных средств на основе хитозана // Молодой ученый. 2010. Т. 2. № 5. С. 208-210.
2. *Гительзон И.И., Терсков И.А.* Эритрограммы как метод клинического исследования крови. - Красноярск: Сибирское отделение АН СССР. 1959. С. 247.
3. *Иноземцева О.А.* Формирование и физико-химические свойства полиэлектролитных нанокompозитных микрокапсул // Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 9. С. 68-80.
4. *Калашиникова И.В.* Механизмы взаимодействия антибиотиков пенициллинового ряда с эритроцитами человека // Бюлл. эксп. биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 10. С. 419-423.
5. *Корчагина Е.В.* Агрегация хитозана и его производных в разбавленных водных растворах: автореф. дисс.... канд. физ.-мат. наук. - М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. 2012. 232 с.
6. *Крепс Е.М.* Липиды клеточных мембран. Адаптационная функция липидов. - Л. 1981. 339 с.
7. *Лампрехт А.* Нанолечения. Концепции доставки лекарств в нанонауке. - М.: Научный мир. 2011. 232 с.
8. *Микашинович З.И.* Действие различных факторов на кровь // Бюлл. эксп. биол. 1980. № 10. С. 418-420.
9. *Ольшанская А.Я., Одинокова В.А., Квит-*

- ко Н.Н. Эритроциты в тканевом и иммунном гомеостазе // Сов. медицина. 1984. № 11. С. 43-48.
10. Савлуков А.И., Самсонов В.М., Камилов Р.Ф., Шакирова Э.Д., Яппаров Р.Н., Шакиров Д.Ф. Состояние устойчивости эритроцитов как звено адаптации организма // Медицинский вестник Башкортостана. 2011. Т. 6. № 4. С. 13-17.
11. Сахау Н.Р., Мурсаева Г.Х., Камилов Ф.Х., Фазлыева Р.М. Клинико-диагностическая оценка состояния мембран эритроцитов у больных первичным хроническим пиелонефритом // Нефрология. 2005. Т. 9. № 1. С. 47-51.
12. Nel A.E., Madler L., Velegol D. Understanding biophysicochemical interactions at the nan-bio interface // Nature Materials. 2009. № 8. P. 543-557.

Comparative assessment of influence of ultradisperse systems on the basis of complexes of a hitozan and its derivatives with colloidal particles of silver iodide on the structural and functional properties of erythrocytes

**V.G. Shamratova, L.A. Sharafutdinova, Z.R. Khismatullina,
M.V. Bazunova, E.I. Kulish, D.R. Valiev**

Results of research of influence of solutions of a hitozan, sodium salt of a sukcinol of a hitozan and their polymer-colloidal complexes with colloidal particles of silver iodide on the structural and functional properties of erythrocyte membranes on the model of an acid hemolysis are presented in article. The analysis of acid eritrogramms allowed to define that the studied combinations have essential impact on a functional condition of membranes of blood cells of rats. The effect of test substances on the distribution of red blood cells in terms of their sustainability and on kinetic parameters (the beginning, intensity and completion of process of their destruction) under the influence of the damaging agent (HCl) is shown. The comparative analysis of results convinces that solutions of a hitozan, a sukcinol of a hitozan and of a disperse systems on the basis of polymer-colloidal complexes of a hitozan, a sukcinol of a hitozan with colloidal particles of iodide of silver are capable to modulate variously matrix properties of erythrocytes of blood.

Key words: hemocompatibility, acid resistance of erythrocytes, hitozan, colloidal particles of silver iodide.



Экспериментальное моделирование пузырчатки

А.А. Кубанов^{1,2}, Т.В. Абрамова², П.А. Калинина²

¹ – ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, Москва

² – ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.м.н., доц. Абрамова Татьяна Валерьевна, тел.: 8(495)964-11-52; e-mail: abtava@mail.ru

В статье представлен обзор литературы по экспериментальному моделированию пузырчатки – тяжелого аутоиммунного буллезного дерматоза, характеризующегося образованием пузырей и эрозий на коже и/или слизистых оболочках. Описаны модели, создаваемые *in vitro* (модели с использованием культур кератиноцитов, органных культур кожи человека), и *in vivo*, на лабораторных животных (модели с пассивным переносом антител, модели с переносом аутореактивных лимфоцитов, трансгенные модели, иммунизированные модели), воспроизводящие клинические, гистологические и иммунологические признаки пузырчатки. Создание экспериментальных моделей необходимо для изучения патогенеза пузырчатки и разработки методов терапевтического воздействия.

Ключевые слова: пузырчатка, антитела, лабораторные животные, кератиноциты, пузыри, кожа.

Введение

Пузырчатка – тяжелый, потенциально летальный аутоиммунный буллезный дерматоз, характеризующийся образованием пузырей и эрозий на коже и/или слизистых оболочках.

Определяющую роль в патогенезе пузырчатки играют антитела к структурным белкам десмосом, обеспечивающим межклеточную адгезию клеток эпидермиса: десмоглеину 1 типа (*Dsg1*) и десмоглеину 3 типа (*Dsg3*), которые представляют собой гликопротеины с молекулярной массой, соответственно, 130 кДа и 160 кДа [2]. Особенностью аутоантител при пузырчатке является

их способность активировать систему комплемента, в результате чего антитела оказывают прямое цитотоксическое воздействие на клетки эпидермиса и способствуют развитию акантолиза [11]. Описано развитие вульгарной пузырчатки у новорожденного, рожденного от матери, больной пузырчаткой, что объясняется проницаемостью плаценты для пемфигусных IgG [20]. Механизмы развития акантолиза при пузырчатке до сих пор остаются до конца не выясненными.

Значительный вклад в изучение патогенеза буллезных дерматозов внесли исследования, основанные на эксперимен-

тальном моделировании заболевания *in vitro* (культуры кератиноцитов, органические культуры кожи человека) и *in vivo*, на лабораторных животных (модели с пассивным переносом антител, модели с активным иммунитетом, к которым относятся модели с переносом аутореактивных лимфоцитов, трансгенные модели, иммунизированные модели), воспроизводящие клинические, гистологические и иммунологические признаки пузырчатки.

Моделирование пузырчатки *in vitro*

Для моделирования пузырчатки используют клеточные линии нормальных человеческих эпидермальных кератиноцитов (*NHEK, normal human epidermal keratinocytes*), клеточные линии сквамозно-клеточной карциномы (*SCC, squamous cell carcinoma*), иммортализованные линии человеческих кератиноцитов (*HaCaT, cultured human keratinocytes*) [16, 32].

Клеточная линия *NHEK* имеет ограничения при моделировании пузырчатки, т.к. данные клетки не синтезируют *Dsg1* в достаточном количестве.

Клетки *HaCaT* и *SCC*, которые экспрессируют *Dsg1* в монослоях, считаются более подходящей моделью [24]. Однако, несмотря на определенные недостатки, наиболее значительный вклад в изучение механизмов акантолиза при пузырчатке внесли модели, основанные на использовании и изучении культур кератиноцитов [32].

Культуры кератиноцитов традиционно используются в виде монослоя клеток, пролиферирующих в среде с низким содержанием кальция; уровень кальция в среде при этом имеет опре-

деляющее значение для формирования монослоя клеток в культуре. Показано, что в среде, обедненной кальцием, кератиноциты не формируют десмосом, а также не экспрессируют *Dsg1* [6, 10]. При высоком уровне кальция клетки в процессе развития начинают дифференцироваться и формировать десмосомы с образованием нескольких слоев клеток, что затрудняет изучение процессов акантолиза в культуре [13].

Органные культуры кожи человека

Одними из первых, кому удалось успешно воспроизвести акантолиз *in vitro* на модели органной культуры кератиноцитов человека, были В. Michel и С.С. Ко (1977). Авторы поместили эксплант человеческой кожи (на оберточной бумаге для оптических стекол) на поверхность жидкости, содержащей сыворотку крови больных пузырчаткой. С помощью метода прямой иммунофлуоресценции было показано, что аутоантитела против десмоглеинов накапливались в межклеточном пространстве эпидермиса [21]. Впоследствии данный эксперимент был воспроизведен рядом исследовательских групп [9, 15, 22, 28].

С.Н. Ну и соавт. [12] наблюдали супрабазальный акантолиз в органной культуре нормальных человеческих клеток кожи в присутствии специфических IgG, образующихся при пузырчатке. Уже через 12 ч после начала эксперимента с помощью электронного микроскопа исследователи наблюдали появление межклеточного пространства, а также разрушение межклеточного вещества в участках, свободных от десмосом. Через 24-48 ч происходило сокращение тонофиламентов, их концентрирование

вокруг ядра, потеря десмосомальных контактов. Через 72 ч в супрабазальных участках появлялись изолированные клетки, при этом базальные клетки с интактными полудесмосомами оставались на поверхности базальной мембраны. Структурный анализ культуры клеток показал, что изменения в данной модели соответствуют изменениям, происходящим *in vivo* в коже больных пузырчаткой.

Моделирование пузырчатки на органных культурах кератиноцитов внесло значительный вклад в изучение механизмов акантолиза, а также использовалось при тестировании лекарственных препаратов, применяемых для лечения пузырчатки. Так, на органной модели кератиноцитов была исследована эффективность гидрокортизона, дапсона, 6-меркаптопурина, метилпреднизолона, ингибиторов протеаз в подавлении процесса акантолиза [14, 15, 26, 29].

Преимущество данного вида моделирования пузырчатки заключается в использовании образцов человеческой кожи, сохраняющих архитектуру слоев эпидермиса. При этом специфические для каждого слоя морфологические изменения или локализация белков могут быть изучены с помощью методов световой или электронной микроскопии, а также с использованием реакции иммунофлуоресценции. Тем не менее, экспланты кожи являются менее подходящим материалом для изучения молекулярных сигнальных путей, чем культуры клеток, т.к. в экспланте клетки сохраняют все слои эпидермиса, в связи с чем диффузия IgG к ним в ходе эксперимента происходит неравномерно и требует более длительного времени [32].

Использование для моделирования пузырчатки органных культур керати-

ноцитов человека было популярно в 1980-х гг. В последние годы эти модели применяются редко, чаще в сочетании с другими экспериментальными моделями [7, 28, 31].

Моделирование пузырчатки на экспериментальных животных

В настоящее время применяется два основных вида моделей буллезных дерматозов на экспериментальных животных: а) модели с пассивным переносом антител; б) модели с активным иммунитетом, в т.ч. модели с переносом аутореактивных лимфоцитов, трансгенные модели, иммунизированные модели [5].

Модели с пассивным переносом антител

Дальнейшие попытки улучшить модели пузырчатки привели к воспроизведению акантолиза на неонатальных мышах.

Anhalt и соавт. [4] был проведен эксперимент по моделированию пузырчатки на новорожденных мышах. В ходе эксперимента новорожденным мышам линии BALB/c вводили фракцию IgG, полученную от больных пузырчаткой, в дозе 1,5-16 мг/г массы тела в день. При этом у 39-ти из 55-ти мышей наблюдалось появление на коже и слизистых оболочках эрозий и язв. В ходе эксперимента была выявлена прямая зависимость между титрами антител к *Dsg3* и *Dsg1* в сыворотке больных и тяжестью клинических проявлений пузырчатки у мышей. После прекращения введения IgG отмечалась эпителизация эрозий.

В 1985 г. Y. Takahashi и соавт. [30] неоднократно вводили новорожденным лабораторным мышам пемфигусные IgG с последующим исследованием сыворотки крови и биоптатов кожи. Биоло-

гические образцы крови и кожи были изучены с использованием реакции иммунофлуоресценции, электронной и иммуноэлектронной микроскопии. Уже через 1 ч после введения IgG, полученных от больных пузырчаткой, в сыворотке крови мышей методом иммуноферментного анализа было зафиксировано повышение уровня содержания антител к *Dsg3*; при гистологическом исследовании биоптатов кожи зафиксировано появление акантолитических щелей и полостей. Полная дезорганизация десмосом наблюдалась через 12-18 ч. Это исследование продемонстрировало, что ранние иммунологические и ультраструктурные изменения, которые типичны для вульгарной пузырчатки у человека, могут быть успешно воспроизведены у лабораторных мышей.

Существуют определенные различия при использовании в моделировании пузырчатки с пассивным переносом антител у новорожденных и взрослых мышей. Для динамического наблюдения долговременных эффектов действия антител или оценки эффективности различных терапевтических методов более подходящими считаются новорожденные животные. Однако кожа взрослых животных имеет ряд существенных отличий от кожи новорожденных мышей (морфогенез кожи и ее придатков у мышей считается незавершенным до 15-го дня жизни), поэтому результаты экспериментов, проведенные на неонатальных мышах, не могут быть прямо экстраполированы на взрослых людей [25]. К тому же, функция нейтрофилов у новорожденных и взрослых мышей отличается [18, 19].

Результаты экспериментов с пассивным переносом антител от больного

человека лабораторным животным с использованием взрослых мышей считаются более достоверными, т.к. пузырчаткой болеют преимущественно люди зрелого и пожилого возраста. В то же время, для развития пузырчатки у взрослых лабораторных животных требуется значительно большее количество специфических антител, чем при работе с новорожденными особями [5].

К. Schulze и соавт. изучали целесообразность использования взрослых лабораторных мышей для моделирования вульгарной пузырчатки. Данная группа исследователей обосновала свой выбор взрослых мышей тем, что у новорожденных мышей недоразвиты придатки кожи, включая волосяные фолликулы, а также ниши стволовых клеток. Авторы осуществляли пассивный трансфер моноклональных мышинных антител против *Dsg3* AK23 8-недельным мышам линии C57Bl/6J, волосяные фолликулы которых находились в синхронизированной пролонгированной фазе телогена. Через 2 ч после введения антител наблюдалось расширение межклеточных промежутков между десмосомами, активация рецепторов эпидермального фактора роста, а также увеличение экспрессии гена *Myc*. Это сопровождалось снижением содержания *Dsg3* в десмосомах, образованием пузырей на слизистых оболочках и в области скопления волосяных фолликулов, что типично для больных вульгарной пузырчаткой. По данным К. Schulze и соавт., взрослые мыши, которым был проведен пассивный перенос антител, являются достоверной моделью для изучения первичных изменений в эпидермисе, волосяных фолликулах и нишах стволовых клеток у взрослых людей, страдающих

пузырчаткой, а также для оценки эффективности различных методов терапии [27].

В 1989 г. С.А. Грандо и соавт. были проведены опыты по индуцированию проявлений пузырчатки у аллогенных и ксеногенных животных. Белок, полученный от сывороток ушей обыкновенных, находящихся в начальной стадии линьки, вводили дробно в течение суток подкожно до общей дозы 24 мг/г массы тела пяти ужом, находящимся вне фазы линьки, а также 12-ти новорожденным мышам линии BALB/c. При иммуногистохимическом и морфологическом изучении аутопсийного материала лабораторных животных были обнаружены выраженные изменения. У змей на мембранах кератиноцитов в верхних слоях эпидермиса выявлялись щели и микрополости, у мышей наблюдалось более интенсивное, чем исходное, люминесцентное окрашивание межклеточных промежутков кератиноцитов всего мальпигиева слоя эпидермиса; в ростковом слое – вакуольная дегенерация эпидермоцитов [1].

Несколько позже S.A. Grando и соавт. [8] получили экспериментальную модель пузырчатки на морских свинках. Животным вводили IgG, полученные от больных пузырчаткой, а также содержимое пузырей, в которых определялись атипичные моноклеары. Интраперитонеальное введение иммуноглобулинов вызывало дистрофию эпидермиса у экспериментальных животных, а подкожное введение содержимого пузырей животным – баллонную дистрофию. При морфологическом исследовании аутопсийного материала (кожи) морских свинок наблюдались: акантолиз, интраэпидермальные пузыри, при иммуноф-

лоресцентном исследовании – фиксация IgG в межклеточных промежутках шповатого слоя эпидермиса.

Модели с использованием человеческой кожи, пересаженной лабораторным животным

На примере данной модели возможно изучение акантолиза на образце человеческой кожи, однако с рядом преимуществ, которые дает «мышинная» модель. Перенос участков человеческой кожи лабораторным животным (мышам) обеспечивает введение в экспериментальную модель человеческих аутоантигенов. На данный момент опыт использования указанной модели ограничен. Так, при пересаживании образцов кожи здоровых добровольцев на спину иммунодефицитным мышам линии SCID (severe combined immunodeficiency) и последующей внутрикожной инъекции в имплант IgG, полученных от больных пузырчаткой, у мышей наблюдалась умеренная эритема. У животных, получивших инъекции анти-*Dsg1* иммуноглобулинов, гистологически определялся акантолиз и пузыри в шповатом слое или под роговым слоем эпидермиса. На имплантах животных, получивших инъекции анти-*Dsg3* иммуноглобулинов, наблюдались акантолитические щели над базальным слоем эпидермиса. По мнению некоторых авторов [32, 33], данная модель является многообещающей для изучения механизма акантолиза при пузырчатке.

Модели с активным иммунитетом

Для получения модели пузырчатки с развитием активного иммунитета у лабораторных животных вызывается продукция аутоантител к определенным антигенам. Экспериментальные модели с активным иммунитетом позволя-

ют выявить клетки иммунной системы, опосредующие аутоиммунный ответ к различным структурным компонентам кожи и определить их роль в развитии акантолиза. Путем добавления или удаления определенных субпопуляций клеток возможно изучение эффекта различных типов клеток на механизмы аутореактивности и толерантности. Таким образом, модели с развитием активного иммунитета дают также возможность разработки методов терапии, основанных на стимуляции или ингибировании определенных клеток [5].

Модели с переносом аутореактивных лимфоцитов

Механизмы развития потери толерантности к собственным антигенам были изучены при переносе лабораторным животным аутореактивных лимфоцитов, культивированных в нокаутных мышцах. В 2000 г. группа исследователей во главе с М. Amagai, используя нокаутных по *Dsg3* гену мышей, разработала модель заболевания *in vivo*. *Dsg3*^{-/-} мыши были иммунизированы рекомбинантным *Dsg3* для получения антител к *Dsg3*, взаимодействующих с аутоантигеном. Пересадка спленоцитов от иммунизированных мышей к иммунодефицитным *Rag2*^{-/-} мышам, имевшим *Dsg3*, приводила к развитию заболевания у последних [3].

Трансгенные модели

В 1997 г. была получена линия трансгенных мышей, не имеющих *Dsg3*. С их помощью было продемонстрировано, что *Dsg3* играет важную роль в межклеточной адгезии. Такие мыши рождались нормальными, но позже у них наблюдалось образование пузырей и эрозий на слизистых оболочках рта, а также отставание в росте и развитии, что объ-

яснялось затруднениями при поглощении пищи. Пузыри на коже появлялись только после механических воздействий [17].

Иммунизированные модели

В 2002 г. М. Ohyama и соавт. предложили модель пузырчатки, воспроизводимую на мышцах с дефицитом главного комплекса гистосовместимости класса II (*MHCII*), трансгенных по ассоциированному с вульгарной пузырчаткой человеческому *HLA* класса II (*DRB1*0402/DQB1*0302*) и человеческому *CD4*. Животные были иммунизированы рекомбинантным человеческим *Dsg3* с использованием различных адъювантов. Повторная иммунизация приводила к образованию антител к *Dsg3*, которые показали свою патогенность в ряде тестов *in vitro*, т.к. приводили к диссоциации кератиноцитов. У иммунизированных мышей развивались пузыри и эрозии, что демонстрировало кросс-реактивность человеческих антител с мышшиным *Dsg3* [23].

Заключение

Целью экспериментального моделирования пузырчатки является изучение патогенеза заболевания и методов терапии на основании максимально точного воспроизведения модели заболевания *in vitro* и *in vivo*.

Как показывают приведенные данные литературы, органные культуры и клеточные линии человека максимально приближены к человеческой коже, в частности, по экспрессии десмоглеинов и образованию зрелых десмосом. С помощью световой микроскопии, реакции иммунофлуоресценции и электронной микроскопии в биологических образцах моделей можно наблюдать акантолиз.

Для изучения патогенеза, выявления молекулярно-биологических мишеней, участвующих в развития пузырчатки, определения изменений в их локализации и взаимодействия друг с другом могут быть рекомендованы более простые культуры клеток, в частности, монослойные культуры кератиноцитов.

Экспериментальные модели пузырчатки, основанные на использовании лабораторных животных, позволяют изучить ряд патогенетических механизмов развития заболевания, оценить эффективность лекарственных препаратов. Для изучения практически всех аспектов патогенеза и эффективности терапии аутоиммунных пузырных дерматозов, включая долговременные схемы лечения, в наибольшей степени подходят модели с активным иммунитетом. Тем не менее, следует помнить, что хоть данная модель и полностью воспроизводит клинические, гистологические, ультраструктурные и иммунологические признаки пузырчатки у человека, она воспроизводится на лабораторных животных и не может быть в полной мере применена к человеку [5].

Таким образом, на настоящий момент выделить единственную, идеальную модель пузырчатки, невозможно. Для исследования патогенетических механизмов развития пузырчатки, разработки новых методов терапии необходимы различные экспериментальные модели, которые могут и должны дополнять друг друга.

Список литературы

1. Грандо С.А., Глухенький Б.Т., Соколова О.А., Кравченко Р.С., Гаврилов С.В. Результаты филогенетических и экспериментальных исследований этиологии вульгарной пузырчатки // Вестник дерматологии и венерологии.

1989. № 4. С. 7-9.
2. Матушевская Е.В., Свирицкая Е.В., Самсонов В.А., Хапилова В.И. Иммунология вульгарной пузырчатки и возможный механизм формирования заболевания // Вестник дерматологии и венерологии. 1996. № 2. С. 25-28.
3. Amagai M., Tsunoda K., Suzuki H., Nishifuji K., Koyasu S., Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus // J. Clin. Invest. 2000. V. 105. P. 625-631.
4. Anhalt G.J., Labib R.S., Voorhees J.J., Beals T.F., Diaz L.A. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease // N. Engl. J. Med. 1982. V. 306. P. 1189-1196.
5. Bieber K., Sun S., Ishii N., Kasperkiewicz M., Schmidt E., Hirose M., Westermann J., Yu X., Zillikens D., Ludwig R.J. Animal models for autoimmune bullous dermatoses // Exp. Dermatol. 2010. V. 19. P. 2-11.
6. Boyce S.T., Ham R.G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture // J. Invest. Dermatol. 1983. V. 81. P. 33s-40s.
7. Frušić-Zlotkin M., Pergamentz R., Michel B., David M., Mimouni D., Brégégère F., Milner Y. The interaction of pemphigus autoimmunoglobulins with epidermal cells: Activation of the Fas apoptotic pathway and the use of caspase activity for pathogenicity tests of pemphigus patients // Annals of the New York Academy of Sciences. 2005. V. 1050. P. 371-379.
8. Grando S.A., Glukhen'kiĭ B.T., Kutsenko N.S., Lastovetskaia G.I., Boiko I., Barabash T.M., Cherniavskii A.I. Modeling of pemphigus vulgaris in guinea pigs // Biull. Eksp. Biol. Med. 1990. V. 109. № 6. P. 604-605.
9. Hashimoto T. Experimental suprabasal bulla formation in organ cultured human skin with low calcium medium // J. Invest. Dermatol. 1988. V. 90. № 4. P. 501-504.
10. Hennings H., Michael D., Cheng C., Steinert P., Holbrook K., Yuspa S.H. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture // Cell. 1980. V. 19. P. 245-254.
11. Hertl M., Jedlickova H., Karpati S., Marinovic B., Uzun S., Yayli S., Mimouni D., Borradori

- L., Feliciani C., Ioannides D., Joly P., Kowalewski C., Zambruno G., Zillikens D., Jonkman M.F.* Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment - guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV) // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2015. V. 29. № 3. P. 405-414.
12. *Hu C.H., Michel B., Schiltz J.R.* Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study // *Am. J. Pathol.* 1978. V. 90. № 2. P. 345-362.
13. *Iwatsuki K., Sugaya K., Takigawa M.* Dynamic expression of pemphigus and desmosomal antigens by cultured keratinocytes // *Br. J. Dermatol.* 1993. V. 128. P. 16-22.
14. *Jacobi A., Shuler G., Hertl M.* Rapid control of therapy-refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor-alpha inhibitor infliximab // *Br. J. Dermatol.* 2005. V. 153. № 2. P. 448-449.
15. *Jeffes E.W.B., Kaplan R.P., Ahmed A.R.* Acantholysis produced in vitro with pemphigus serum: Hydrocortisone inhibits acantholysis, while dapsone and 6-mercaptopurine do not inhibit acantholysis // *J. Clin. Immunol.* 1984. V. 4. № 5. P. 359-363.
16. *Kee S.-H., Steinert P.M.* Microtubule Disruption in Keratinocytes Induces Cell-Cell Adhesion through Activation of Endogenous E-Cadherin // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. № 7. P. 1983-1993.
17. *Koch P.J., Mahoney M.G., Ishikawa H., Pulkkinen L., Uitto J., Shultz L., Murphy G.F., Whitaker-Menezes D., Stanley J.R.* Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris // *J. Cell Biol.* 1997. V. 137. P. 1091-1102.
18. *Krause P.J., Kristie J., Wang W.P., Eisenfeld L., Herson V.C., Maderazo E.G., Jozaki K., Kreutzer D.L.* Pentoxifylline enhancement of defective neutrophil function and host defense in neonatal mice // *Am. J. Pathol.* 1987. V. 129. P. 217-222.
19. *Liechty K.W., Schibler K.R., Ohls R.K., Perkins S.L., Christensen R.D.* The failure of newborn mice infected with *Escherichia coli* to accelerate neutrophil production correlates with their failure to increase transcripts for granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 // *Biol. Neonate.* 1993. V. 64. P. 331-340.
20. *Merlob P., Metzker A., Hazaz B., Rogovin H., Reisner S.H.* Neonatal pemphigus vulgaris // *Pediatrics.* 1986. V. 78. № 6. P. 1102-1105.
21. *Michel B., Ko C.S.* An organ culture model for the study of pemphigus acantholysis // *Br. J. Dermatol.* 1977. V. 96. № 3. P. 295-302.
22. *Morioka S., Naito K., Ogawa H.* The pathogenic role of pemphigus antibodies and proteinase in epidermal acantholysis // *J. Invest. Dermatol.* 1981. V. 76. № 5. P. 337-341.
23. *Ohyama M., Amagai M., Tsunoda K., Ota T., Koyasu S., Hata J., Umezawa A., Nishikawa T.* Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris // *J. Invest. Dermatol.* 2002. V. 118. P. 199-204.
24. *Schäfer S., Koch P.J., Franke W.W.* Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins // *Exp. Cell Res.* 1994. V. 211. P. 391-399.
25. *Schneider M.R., Schmidt-Ullrich R., Paus R.* The hair follicle as a dynamic miniorgan // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 3. P. 132-142.
26. *Schuh T., Besch R., Braungart E., Flaig M.J., Douwes K., Sander C.A., Magdolen V., Probst C., Wosikowski K., Degitz K.* Protease inhibitors prevent plasminogen-mediated, but not pemphigus vulgaris-induced, acantholysis in human epidermis // *Biol. Chem.* 2003. V. 384. № 2. P. 311-315.
27. *Schulze K., Galichet A., Sayar B.S., Scothern A., Howald D., Zymann H., Siffert M., Zenhäusern D., Bolli R., Koch P.J., Garrod D., Suter M.M., Müller E.J.* An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris // *J. Invest. Dermatol.* 2012. V. 132. P. 346-355.
28. *Spindler V., Drenckhahn D., Zillikens D., Washke J.* Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3 // *Am. J. Pathol.* 2007. V. 171. P. 906-916.
29. *Swanson D.L., Dahl M.V.* Methylprednisolone inhibits pemphigus acantholysis in skin cultures // *J. Invest. Dermatol.* 1983. V. 81. № 3. P. 258-260.
30. *Takahashi Y., Patel H.P., Labib R.S., Diaz L.A., Anhalt G.J.* Experimentally induced pem-

- phigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes // J. Invest. Dermatol. 1985. V. 84. P. 41-46.
31. Wang X., Brégègère F., Frusci-Zlotkin M., Feinmesser M., Michel B., Milner Y. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins // Apoptosis. 2004. V. 9. P. 131-143.
32. Wier G. Van Der, Pas H.H., Jonkman M.F. Experimental human cell and tissue models of pemphigus // Dermatol. Res. Pract. 2010: 143871.
33. Zillikens D., Schmidt E., Reimer S., Chimanovitch I., Hardt-Weinelt K., Rose C., Bröcker E.B., Kock M., Boehncke W.H. Antibodies to desmogleins 1 and 3, but not to BP180, induce blisters in human skin grafted onto SCID mice // J. Pathol. 2001. V. 193. № 1. P. 117-124.

Experimental models of pemphigus

A.A. Kubanov, T.V. Abramova, P.A. Kalinina

The article is presented the review of literature on experimental modeling of pemphigus – heavy autoimmune dermatosis which is characterized by formation of blisters and erosion on skin and/or mucous membranes. The models are created *in vitro* (models with using cultures of keratinocytes, organ cultures of skin) and *in vivo*, on laboratory animals (models with passive transfer of antibodies and active disease: models with transfer of the autoreactive lymphocytes, transgenic models, forced immunization models). The models reproduce clinical, histologic and immunological signs of pemphigus. Experimental models are necessary for studying the aspects of pemphigus pathogenesis and development of new therapy approaches.

Key words: pemphigus, antibodies, laboratory animals, keratinocytes, blisters, skin.



Количественный фармако-ЭЭГ анализ активности ноотропов и их комбинаций с Мелаксеном при глобальной ишемии головного мозга у крыс

Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин

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

Контактная информация: Ганцгорн Елена Владимировна, gantsgorn@inbox.ru

Посредством спектрального анализа ЭЭГ на модели глобальной церебральной ишемии у крыс изучались эффекты ноотропов и их комбинаций с Мелаксеном в условиях нарушения мозгового кровообращения. Установлено, что превентивное применение Винпоцетина с Мелаксеном значительно снижает количество летальных исходов, а также степень неблагоприятного воздействия циркуляторной ишемии на функциональное состояние головного мозга выживших животных. Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике для лечения ишемических и нейродегенеративных заболеваний головного мозга.

Ключевые слова: фармако-ЭЭГ, церебральная ишемия, ноотропы, Мелаксен.

Введение

Метод электроэнцефалографии (ЭЭГ) очень важен для мониторинга прогрессивных изменений нейрофизиологических функций при различных типах неврологических расстройств, включая ишемию головного мозга, дисциркуляторную энцефалопатию и т.д., а также для оценки эффективности фармакотерапии подобных цереброваскулярных заболеваний.

Метод ЭЭГ, включающий в себя регистрацию и анализ биопотенциалов, динамически варьирующих на поверхности коры головного мозга (ГМ), является одним из наиболее эффективных инструментов для неинвазивного исследова-

ния функционального состояния ГМ в условиях физиологической нормы и различного рода нарушений ЦНС, а также на фоне фармакологических воздействий [6, 8].

С целью изучения ЭЭГ-эффектов психотропных лекарственных препаратов (ЛП) был разработан комплекс методических приемов, названный количественной фармако-ЭЭГ (quantitative pharmacoelectroencephalography, QPEEG). Термин «количественная фармакоэлектроэнцефалография» (КФЭЭГ) впервые был предложен Т.М. Итил в 1974 г. [17] для обозначения процесса, который включает в себя использование компьютерного анализа спонтанной

ЭЭГ и серию статистических процедур, направленных на выявление центрального действия новых ЛП, предсказание их клинического (психотропного) действия, оценку эффективной дозы и продолжительности действия после приема разовой терапевтической дозы [16].

При этом изменение показателей ЭЭГ (реорганизация спектральных характеристик электрической активности, изменение латентности и амплитуды сенсорных вызванных потенциалов в неокортексе и др.) может служить дополнительным информативным критерием эффективности фармакотерапии, в т.ч. нарушений мозгового кровообращения (НМК) [2, 16].

Ввиду широкой распространенности, тяжести течения, высоких показателей инвалидизации и смертности от НМК, максимально детальное изучение патогенетических механизмов такого рода патологии и поиск новых подходов к ее эффективному лечению является одной из актуальных задач клинической неврологии и фармакологии [9, 10, 15].

Безусловно, важное место в фармакотерапии НМК отводится нейропротекторам. Актуальным является комбинированное применение агентов первичной нейропротекции, в частности, антиоксидантов и средств вторичной защиты, к числу которых относят и ноотропы [14]. Среди антиоксидантных средств особый интерес представляет мелатонин, обладающий значительным нейроантиоксидантным действием, что оправдывает целесообразность его использования при НМК в качестве оригинального нейропротектора [3, 19].

В связи с вышеизложенным, важную задачу представляет собой всестороннее изучение действия нейропротекторов,

в т.ч. их влияния на функциональное состояние ГМ. ЭЭГ-исследованиями у разных групп ноотропов (производных пирролидина, холинергических средств, церебральных вазодилататоров, антиоксидантов) выявлены общие тенденции в изменении основных ритмов: повышение мощности α -ритма и снижение медленных Δ - и θ -ритмов. Изменения β -ритма, судя по данным литературы, не столь однозначны, однако исследователи склоняются к мнению об его усилении под влиянием ноотропов [4, 5, 7, 13].

Вместе с тем, анализ параметров КФЭЭГ очень затруднен ввиду сложной композиции отдельных характеристик спектра психотропной активности ЛП этой группы, включающей различные соотношения ноотропного действия с неспецифическими стимулирующим и анксиолитическим эффектами, методической сложностью определения спектра их действия в клинко-фармакологических исследованиях [1, 11, 12].

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 112 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г. Животные содержались в условиях вивария при естественном освещении, в пластиковых клетках размером 55×45×15 см, по 6 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7 дней карантина. Все эксперименты были выполнены в соответствии с рекомендациями по гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденными этическим комитетом РостГМУ.

В соответствии с протоколом исследования, за 14 дней до экспериментальной ишемии головного мозга (ЭИГМ) животные были разделены на 7 групп (2 контрольные и 5 опытных), по 16 крыс в каждой. Из двух контрольных групп первую составили ложнооперированные животные (группа ЛО), у которых воспроизвели все этапы операции без перевязки общих сонных артерий (ОСА), а вторую – крысы, подвергшиеся ЭИГМ (группа ИШ); обе группы получали в течение 14-ти дней физ. раствор в дозе 0,2 мл/сут внутрибрюшинно. Крысам опытных групп в течение 14-ти дней внутрибрюшинно вводились изучаемые ЛП: Пирацетам – в дозе 300 мг/кг/сут (группа П_{иш}); Мелаксен – в дозе 0,25 мг/кг/сут (группа М_{иш}); Винпоцетин – в дозе 4 мг/кг/сут (группа В_{иш}); Пирацетам в сочетании с Мелаксеном (группа ПМ_{иш}) и Винпоцетин в комбинации с Мелаксеном (группа ВМ_{иш}) (все ЛП – в вышеуказанных дозах), а затем моделировалась ЭИГМ.

В связи с тем, что одной из актуальных проблем нейрофизиологии и психофармакологии является разработка электрофизиологических критериев ишемических явлений в ГМ, которые позволяли бы дифференцировать степень тяжести состояния ЦНС, а также объективно оценивать эффективность проводимой фармакотерапии, в рамках нашего исследования была поставлена задача провести сравнительный анализ относительных значений мощностей (ОЗМ) ЭЭГ-ритмов в контрольных и опытных группах крыс до и после ЭИГМ. Для выполнения данной задачи за 5 дней до моделирования ЭИГМ всем животным в область соматосенсорной

коры и гиппокампа (симметрично справа и слева) вживлялись электроды в соответствии с атласом стереотаксических координат ГМ крысы [18], индифферентный электрод локализовался в лобной пазухе. Операции проводились под эфирным наркозом с помощью стереотаксической установки СЭЖ-4 (производства Института физиологии им. А.А. Богомольца, Украина) и микроманипуляторов для погружения микроэлектродов. Фиксация электродов производилась с помощью стоматологической пластмассы холодной полимеризации «Протакрил» на голове животного. Спектральные характеристики электрограмм мозга определялись с помощью быстрого преобразования Фурье в диапазоне 1-30 Гц. ЭЭГ животных регистрировались монополярно на 8-канальном электроэнцефалографоанализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» до и через 24 ч после моделирования ЭИГМ. Были изучены показатели ОЗМ (%) для Δ (дельта) - (1-4 Гц), θ (тета) - (5-7 Гц), α (альфа) - (8-12 Гц) и β (бета) - (13-30 Гц) частотных диапазонов ЭЭГ крыс.

ЭИГМ моделировалась путем одновременной перевязки левой и правой ОСА. Операционную рану обрабатывали 5% спиртовым раствором йода и послойно ушивали. Все хирургические процедуры проводили в стерильных условиях под тиопенталовым (120 мг/кг внутрибрюшинно) наркозом. Сутки спустя отмечали количество выживших крыс во всех группах и регистрировали у них ЭЭГ, после чего под эфирным наркозом производили эвтаназию животных.

Статистическую обработку полученных данных проводили на ПК с

использованием общепринятых методов параметрической статистики (критерий Фишера) при помощи пакета программ Statistica 6.0 (ANOVA/MANOVA) (Statsoft, USA). Статистически значимыми считали изменения при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

Проведенный анализ выживаемости крыс (табл. 1) показал, что в группе ЛО 24-часовую двухстороннюю окклюзию ОСА переживали 100% крыс. В группе ИШ (контроль II уровня) с предварительным введением физ. р-ра суточная выживаемость была минимальной и составила всего 34,8%. В течение 24 ч постишемического периода процент выживаемости в группе животных, получавших Пирацетам, отличался от группы контроля на 9,6%, составив 44,4%. На фоне введе-

ния Мелаксена и Винпоцетина показатель выживаемости через сутки после ЭИГМ был выше и равнялся 50% и 61,5%, соответственно. При превентивном введении комбинации Пирацетама и Мелаксена выживаемость крыс составила 53,3%, а при совместном введении Винпоцетина с Мелаксеном – 80,0%.

В рамках количественного анализа ЭЭГ – как до операции, так и сутки спустя после нее – было зафиксировано характерное изменение представительства частотных диапазонов на фоне применения различных ЛП в сравнении с контрольными группами крыс, получавшими физ. раствор.

Параметры ОЗМ (%) в контрольных и опытных группах крыс до операции и через 24 ч после проведения окклюзии ОСА представлены, соответственно, в табл. 2 и 3.

Таблица 1
Влияние изучаемых ЛП на показатели выживаемости крыс при ЭИГМ

Группы животных	Количество прооперированных животных	Количество животных, переживших 24-часовую двухстороннюю окклюзию ОСА	Количество животных, умерших после 24-часовой двухсторонней окклюзии ОСА	Выживаемость, %
ИШ	46	16	30	34,8
П _{иш}	36	16	20	44,4*
М _{иш}	32	16	16	50,0*
В _{иш}	26	16	10	61,5**
ПМ _{иш}	30	16	14	53,3**
ВМ _{иш}	20	16	4	80,0**

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,05$;

** – статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,01$.

Таблица 2

Показатели ОЗМ (%) в контрольных и опытных группах крыс до моделирования ЭИГМ (либо ложной операции)

Диапазон ЭЭГ Группа	Δ	θ	α	β
ЛО	26,94±0,73	35,38±1,33	15,65±0,31	18,78±0,53
ИШ	24,55±1,40*	36,91±1,17	15,35±0,57	18,48±0,50
П _{иш}	13,11±0,73** ##	36,79±1,27	22,57±0,69** ##	27,09±0,70** ##
М _{иш}	24,84±0,77*	38,47±0,39* #	15,47±0,29	19,45±0,58
В _{иш}	16,97±0,45** ##	44,74±0,52** ##	16,60±0,48	20,96±0,43* #
ПМ _{иш}	16,10±1,44** ##	40,60±0,45** ##	16,67±0,74	26,80±1,30** ##
ВМ _{иш}	19,54±0,39** ##	39,68±0,64** ##	17,64±0,37* #	21,99±0,46** ##

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,05$;

** – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,01$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,05$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,01$.

Таблица 3

Показатели ОЗМ (%) в контрольных и опытных группах крыс через 24 ч после моделирования ЭИГМ (либо ложной операции)

Диапазон ЭЭГ Группа	Δ	θ	α	β
ЛО	28,94±0,84	33,80±1,80	14,71±1,33	18,39±0,56
ИШ	31,67±0,89*	25,59±1,09**	10,88±1,24**	13,89±0,59**
П _{иш}	23,92±0,84** ##	21,51±0,68** ##	16,16±0,62* ##	18,74±0,80##
М _{иш}	29,37±0,62##	26,96±0,36** #	12,06±1,22* #	15,22±0,94**
В _{иш}	26,81±1,38* ##	23,47±0,58** #	12,11±0,74**	15,55±0,68** #
ПМ _{иш}	27,83±1,21##	22,81±0,74** ##	12,66±0,29* #	19,51±0,73##
ВМ _{иш}	27,42±0,37##	32,05±0,79##	14,26±0,46#	19,13±1,33##

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,05$;

** – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,01$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,05$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,01$.

Обсуждение результатов

Приведенные выше данные по показателю выживаемости крыс свидетельствуют о том, что ЭИГМ, вызванная одномоментной двусторонней необратимой перевязкой ОСА, приводила к гибели более чем половины экспериментальных животных в течение суток после операции. Превентивное курсовое применение изучаемых ЛП в разной степени повышало выживаемость крыс. Эффект применения Мелаксена был сопоставим с эффектом Пирацетама, а применение Мелаксена в комбинации с Винпоцетином оказалось более эффективным, нежели в комбинации с Пирацетамом. При этом сочетанный прием Винпоцетина с Мелаксеном в целом был наиболее эффективным: в данной опытной группе крыс количество летальных исходов было почти в 2,5 раза ($p \leq 0,01$) ниже, чем у животных группы ИШ, не получавших ЛП.

Результаты проведенного сравнительного анализа показателей ОЗМ демонстрируют, что введение на протяжении 14-ти дней исследуемых ЛП и их комбинаций определенным образом отражается на биоэлектрической активности ГМ крыс до, а также после моделируемой ЭИГМ или ложной операции.

До операции минимальные значения ОЗМ Δ -частотного диапазона наблюдались в группах $\Pi_{\text{иш}}$ и $\Pi\text{M}_{\text{иш}}$, максимальные показатели ОЗМ θ -ритма (доминирующего у крыс в норме и характеризующего нормальную активность их ГМ) отмечались в группах $\text{B}_{\text{иш}}$ и $\text{BM}_{\text{иш}}$. Быстроволновая активность наиболее выражено изменялась в экспериментальных группах, получавших комбинации исследуемых ЛП. Что касается группы $\text{M}_{\text{иш}}$, то показатели ОЗМ

в ней существенно не отличались от контрольных.

Спустя сутки после операции показатели ОЗМ всех частотных диапазонов в группе ЛО практически возвращались к исходным, а некоторые расхождения с таковыми (незначительное увеличение мощности Δ -диапазона на фоне уменьшения мощности θ - и α -частотных диапазонов) можно объяснить неполным восстановлением животных после перенесенных наркоза и оперативного вмешательства.

Нарушения со стороны функциональной активности ГМ у животных контрольной группы ИШ и всех опытных групп через 24 ч после ЭИГМ, наоборот, продолжали нарастать. Об этом свидетельствовало неуклонное снижение ОЗМ θ -частотного диапазона, представительства быстроволновой активности, а также тот факт, что несмотря на некоторое уменьшение представительства Δ -частотного диапазона, оно значительно превышало таковое у θ -ритма (это служит критерием выраженной гипоксии и подтверждает развитие ИГМ).

Исключение составляла лишь группа крыс $\text{BM}_{\text{иш}}$, предварительно получавших Винпоцетин в комбинации с Мелаксеном.

Только в ней отмечалось распределение частотных диапазонов, близкое к фоновому: хотя экспериментальные значения ОЗМ θ -, α - и β -ритмов и были несколько ниже своих первоначальных значений, но θ -частотный диапазон доминировал над Δ -частотным диапазоном. До операции в группе $\text{BM}_{\text{иш}}$ значение ОЗМ Δ -частотного диапазона было ниже, чем в группе, получавшей физ. раствор, а мощность θ -, α - и β -ритмов превышала аналогичные показатели

контрольной группы. После ИГМ в этой группе наблюдалась наибольшая сохранность ритмов и их распределения в ЭЭГ. При этом ОЗМ θ - и α -частотных диапазонов были близки, в то время как значения ОЗМ Δ -ритма даже несколько ниже, а β -ритма – выше таковых в контрольной группе ЛО. Это свидетельствовало о бодрствующем состоянии ГМ крыс этой группы и являлось важным критерием эффективности превентивного применения комбинации данных ЛП в целях нейропротекции.

Выводы

1. Анализ биоэлектрической активности ГМ целесообразно использовать для объективизации его состояния в процессе антиишемической фармакопрофилактики и проводимой противоишемической фармакотерапии, а также для разработки критериев ее эффективности в силу возможности количественно охарактеризовать динамику изменений функций ГМ.

2. Используемая модель глобальной ишемии ГМ у крыс вызывает значительное нарушение церебрального кровообращения, что отражается на динамике частотно-амплитудных показателей ЭЭГ. Параметры КФЭЭГ рационально использовать в качестве маркеров церебральной ишемии и информативных показателей для оценки особенностей влияния изучаемых ЛП на функциональное состояние ГМ.

3. На фоне применения комбинации Винпоцетина и Мелаксена происходит наиболее выраженная нормализация биоэлектрической активности ГМ крыс.

4. На модели глобальной церебральной ишемии у крыс комбинация Винпоцетина и Мелаксена способна повышать устойчивость ГМ к гипоксии, а

также оказывать благоприятное влияние на его биоэлектрическую активность. В связи с этим, при фармакотерапии и фармакопрофилактике острых НМК целесообразным, на наш взгляд, является включение в стандартный перечень применяемых лекарственных средств нейрого르몬а мелатонина.

Список литературы

1. *Авруцкий Г.Я., Нисс А.И.* Фармакология ноотропов (экспериментальное и клиническое изучение) // Сб. трудов НИИ фармакологии АМН СССР. - М. 1989. С. 112.
2. *Арушанян Э.Б.* Лекарственное улучшение познавательной деятельности мозга. – Ставрополь: СтГМА. 2004. С. 401.
3. *Арушанян Э.Б.* Изучение психотропной активности гормона эпифиза мелатонина – оригинальное направление наших исследований // Эксперим. и клин. фармакол. 2007. № 6. С. 55-60.
4. *Воронина Т.А.* Гипоксия и память. Особенности эффектов и применения ноотропных препаратов // Вестник Российской АМН. 2000. № 9. С. 27-34.
5. *Воронина Т.А.* Отечественный препарат нового поколения мексидол – основные эффекты, механизм действия, применение. – М. 2005. С. 20.
6. *Гринштейн А.Б., Шнайдер Н.А.* Применение метода компьютерной ЭЭГ при некоторых заболеваниях ЦНС // Методические рекомендации для системы последипломного образования врачей. - Красноярск: ГОУ ВПО КрасГМА. 2007. С. 45.
7. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия мозга. - М.: Медицина. 2001. С. 328.
8. *Зенков Л.Р.* Клиническая электроэнцефалография с элементами эпилептологии. – М.: МЕДпресс-информ. 2004. С. 367.
9. *Исайкин А.И.* Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта // Трудный пациент. 2010. № 4. С. 21-24.
10. *Ларина Н.В., Самохвалова В.В.* Ишемический инсульт: генетические и возрастные аспекты // Пробл. старения и долголетия. 2012. Т. 21. № 1. С. 73-96.
11. *Мосолов С.Н.* Основы психофармакологии. – М: Восток. 1996. С. 288.

12. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Давыдова И.А., Телешова Е.С. «Быстрые» и «медленные» компоненты психотропного действия препаратов с ноотропными свойствами // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2000. Т. 100. № 6. С. 33-37.
13. Панюшкина С.В., Аведисова А.С. Изменение узкополосных составляющих спектра ЭЭГ при действии ноотропов // Эксперим. и клин. фармакол. 1992. № 3. С. 14-17.
14. Румянцева С.А., Афанасьев В.В., Силина Е.В. Патопфизиологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2009. Т. 109. № 3. С. 64-68.
15. Demaerschalk В.М., Hwang Н.М., Leung G. US cost burden of ischemic stroke: a systematic literature review // Am. J. Manag. Care. 2010. V. 16 (7). P. 525-533.
16. Hammond D.C. Quantitative electroencephalography patterns associated with medical conditions // Biofeedback. 2006. V. 34(3). P. 87-94.
17. Itil T.M. Quantitative pharmaco-electroencephalography. // Psychotropic Drugs and the Human EEG. Modern Problems in Pharmacopsychiatry. - New York: Karger. 1974. V. 8. P. 43-75.
18. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th Edition. – Published by Elsevier Inc. 2007. P. 451.
19. Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L.J., Reiter R.J. One molecule, many derivatives: a neverending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? // J. Pineal. Res. 2007. V. 42, P. 28-42.

Quantitative pharmaco-EEG analysis of nootropics and nootropics with Melaxen combination activity at global cerebral ischemia in rats

E.V. Gantsgorn, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin

On the base of EEG spectral analysis we've studied the effects of nootropics and its combinations with Melaxen during cerebral blood flow disturbances in a rat global cerebral ischemia model. It was established that preventive combined Vinpocetine and Melaxen usage significantly reduces the number of deaths and circulatory ischemia adverse effects influence on survived experimental animals' brain functional state. The obtained results can be used in clinical practice for the treatment of ischemic and neurodegenerative brain diseases.

Key words: pharmaco-EEG, cerebral ischemia, nootropics, Melaxen.

Изучение психотропных свойств экстракта семян лотоса орехоносного

Н.А. Ломтева¹, Е.И. Кондратенко¹, М.А. Самотруева²

¹ – ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Астрахань

² – ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань

Контактная информация: Ломтева Наталья Аркадьевна, molecula01@yandex.ru

Для оценки анксиолитического и антидепрессивного действия экстракта семян лотоса орехоносного (*Nelumbo nucifera*) астраханской популяции проводили оценку поведения животных в Суок-тесте и тесте Порсолта. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у экстракта семян лотоса орехоносного (*Nelumbo nucifera*) выраженных психотропных свойств.

Ключевые слова: экстракт семян лотоса орехоносного, анксиолитическая активность, антидепрессивная активность, Суок-тест, тест Порсолта.

Введение

Перспективными для фармакологической коррекции нарушений, возникающих при функциональных расстройствах нервной системы, являются средства растительного происхождения, обладающие широким спектром биологической активности и низкой токсичностью. Интерес представляет лотос орехоносный (*Nelumbo nucifera*), биологически активные вещества которого обладают многопрофильным воздействием на организм, а именно проявляют адаптогенную, антидепрессивную, седативную, антиоксидантную, гиполипидемическую, антиканцерогенную и др. виды активности [3, 5, 6, 12-15]. При этом предполагается, что психотропные эффекты лотоса орехоносного (*Nelumbo nucifera*) реализуются через холинергические, допаминергические, норадренергические и серотонинергические нейротрансмиттерные системы путем

активации цАМФ в гиппокампе и префронтальной коре [10, 14].

Лотос орехоносный (*Nelumbo nucifera*) относится к семейству Лотосовые (*Nelumbonaceae*). Представитель астраханской популяции произрастает на мелководных участках устья Волги вдоль берегов небольших рек, ериков, дельты. Гелофит. Травянистый длиннокорневищный поликарпик, прибрежно-водный гипергликофит, гидрофит [4].

Целью настоящего исследования явилось экспериментальное изучение динамики психотропного действия экстракта семян лотоса орехоносного (*Nelumbo nucifera*) астраханской популяции.

Материалы и методы

Семена лотоса орехоносного заготавливали в сентябре на участках вблизи населенных пунктов Астраханской области.

Методом газо-жидкостной хроматографии [7] определено содержание высших жирных кислот из липидной фракции экстракта после их превращения в метиловые эфиры при обработке диазометаном. Оценено общее содержание фенолов и флавоноидов в экстрактах семян *Nelumbo nucifera* [9].

Исследование выполнено на 116 самках белых беспородных крыс средней массой 220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. В первой экспериментальной серии самки получали растворы в течение 1, 2, 3, 4, 5 и 6 недель, после чего каждую группу тестировали в Суок-тесте. Во второй серии эксперимента для уточнения специфической антидепрессивной активности поведение животных оценивали в тесте Порсолта после 3-недельного введения экстракта семян лотоса орехоносного. Животные были разделены на 2 группы (n=8): животные, получавшие физ. раствор (контроль), и животные, которым вводили экстракт семян лотоса орехоносного в дозе 50 мг/кг.

Водно-спиртовой экстракт семян лотоса орехоносного был приготовлен согласно протоколу WHO CG-04 [16]. Из полученного раствора спирт отгоняли с помощью вакуумного испарителя. Выход активного экстракта составлял около 5% вязкого смолообразного вещества. Экстракт для исследования был получен однократно. Экстракт семян лотоса орехоносного вводили в дозе 50 мг/кг, растворяя в физ. растворе, и вводили животным внутрижелудочно с помощью зонда.

Оценку анксиолитической активности экстракта семян лотоса орехоносного проводили на основании изучения пове-

дения экспериментальных животных в Суок-тесте (СТ), рекомендуемом в психофармакологии для скрининга психотропных эффектов препаратов [2]. Регистровали: латентный период (ЛП) выхода из центра; время, проведенное в темном и светлом отсеках СТ; продолжительность актов кратковременного груминга; число падений вниз; число соскальзывания задних лап; число посещенных сегментов; стойки; число и продолжительность остановок; число исследовательских заглядываний вниз; количество направленных в стороны движений головой при вытянутом положении тела в черном и белом отсеках. Каждую группу животных тестировали в СТ однократно через 30 мин после последнего введения растворов. Время наблюдения: 5 мин.

Изучение антидепрессивного действия экстракта семян лотоса орехоносного проводили в тесте Порсолта [1]. Регистровались следующие параметры: время активного и пассивного плавания, латентный период до проявления первой иммобильности и первого движения, продолжительность иммобильности. Время наблюдения: 3 мин.

Изучение поведения самок в СТ и тесте Порсолта проводили в стадии диэструса.

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Достоверно значимыми считали изменения при $p < 0,05$.

Результаты исследований

При оценке показателей, полученных методом газо-жидкостной хроматографии, было установлено наличие в составе экстракта семян лотоса орехоносного астраханской популяции таких жирных

кислот, как лауриновая (35,26%), линолэлаидиновая (18%), линолевая (12,76%), миристиновая (11,37%) и пальмитиновая (10,10%). Определено содержание фенольных соединений (1,7 г / 100 г) и флавоноидов (0,82 г / 100 г).

Анализ психотропной активности экстракта семян лотоса орехоносного астраханской популяции проводили на основании изучения поведения лабораторных животных в СТ (и в светлом, и в темном отсеках), что позволило выявить наиболее значимые изменения у особей, получавших исследуемый экстракт в те-

чение 3-х недель. Так, в данной группе животных наблюдалось достоверное снижение латентации выхода из центральной зоны СТ, количества остановок, при одновременном увеличении количества стоек, посещенных сегментов и времени, проведенного в светлом отсеке, по сравнению с сопоставимыми показателями контрольной группы животных. Уменьшение соскальзывания лап с аллеи теста отмечалось у всех групп животных, получавших экстракт семян лотоса орехоносного, по сравнению с контрольными животными (табл. 1, 2).

Таблица 1

Влияние экстракта семян лотоса орехоносного *Nelumbo nucifera* (50 мг/кг) на поведение животных в светлом отсеке Суок-теста (M±m)

Исследуемые параметры	Группы животных	Динамика введения экстракта				
		1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя	6 неделя
ЛП выхода из центра, с	экстракт	3,9±0,56	2,7±0,47	4,0±0,60 *	18,9±8,48	24,5±10,83
	контроль	6,0±1,76	3,5±0,67	23,0±7,81	5,3±1,36	11,8±4,97
Длительность остановки, с	экстракт	61,2±24,45	34,5±9,81	33,7±11,38	11,5±7,64	62,0±18,94
	контроль	22,6±1,01	28,1±10,42	27,6±22,26	22,3±8,72	94,4±23,21
Число посещенных сегментов	экстракт	14,0±5,01	16,5±3,39	16,2±4,99*	10,3±5,66	12,7±4,46
	контроль	22,0±7,52	22,3±4,41	4,4±3,97	9,5±3,28	11,9±5,73
Стойки	экстракт	0	0,3±0,15	0,2±0,22	0,1±0,10	0
	контроль	0	0,6±0,27	0	0,3±0,21	0,3±0,15
Остановки	экстракт	1,9±0,70	2,4±0,65	1,7±0,48*	0,8±0,61	1,8±0,32
	контроль	2,7±1,01	2,3±0,62	0,2±0,13	0	1,6±0,65
Заглядывания вниз	экстракт	3,3±0,99	5,3±1,18	5,4±1,95	3,6±1,38	5,2±1,33
	контроль	2,4±0,87	7,6±1,76	2,9±0,95	4,3±0,97	7,7±1,32
Направленные движения головой	экстракт	0,4±0,31	3,1±0,71	1,2±0,36	0,8±0,42	0,6±0,31
	контроль	1,7±0,69	2,2±0,55	1,1±0,48	1,2±0,42	2,4±0,92
Проведенное время в отсеке, с	экстракт	64,9±18,76	139,3±29,64	117,2±24,41*	69,6±35,93	117,8±28,52
	контроль	116,7±37,47	156,2±30,55	38,4±27,36	23,2±7,32	115,9±26,85
Кратковременный груминг, с	экстракт	12,0±6,41	11,5±3,99	18,6±5,44*	3,0±2,79	4,42±4,15
	контроль	7,9±7,28	4,5±3,01	3,7±2,56	0	7,0±3,42
Продолжительность остановок, с	экстракт	21,0±9,9	51,3±17,89	60,6±24,14	34,0±24,65	58,7±24,12
	контроль	27,1±16,23	41,4±13,32	29,0±26,85	0	29,2±13,24
Падения	экстракт	0	0	0	0	0
	контроль	0	0,2±0,13	0	0	0,2±0,13
Соскальзывания лап	экстракт	0,7±0,42	0,6±0,29*	1,2±0,32	0,6±0,34*	1,6±0,45*
	контроль	1,1±0,54	2,3±0,58	1,1±0,46	1,4±0,39	3,3±0,75

Примечание (здесь и в табл. 3): * – наличие достоверных различий по сравнению с контролем (p<0,05; t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони); ЛП – латентный период.

Таблица 2

Влияние экстракта семян лотоса орехоносного *Nelumbo nucifera* (50 мг/кг) на поведение животных в темном отсеке Суок-теста ($M \pm m$)

Изучаемые параметры	Группы животных	Динамика введения экстракта				
		1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя	6 неделя
Горизонтальная активность	экстракт	20,6±5,12	26,5±4,83*	14,3±3,95*	40,0±1,17	16,8±4,12
	контроль	22,2±9,64	14,3±2,24	3,8±2,85	27,4±5,53	20,3±3,58
Вертикальная активность	экстракт	0,3±0,21	0,3±0,15	0	0	0,2±0,12
	контроль	0,8±0,62	0,5±0,30	0	0,3±0,30	0
Остановки	экстракт	3,0±0,76	2,3±0,68	3,1±0,75*	3,2±0,61	2,9±0,65
	контроль	4,2±1,44	1,5±0,82	1,3±0,58	4,4±0,73	4,0±0,72
Заглядывания вниз	экстракт	4,5±1,44	4,7±1,22	5,1±1,17*	4,4±1,40	4,8±1,12
	контроль	4,9±1,74	3,6±0,73	0,7±0,37	6,9±1,38	5,3±1,35
Ориентация	экстракт	3,5±1,10	4,0±1,02	1,3±0,47	1,5±0,56*	2,3±0,49
	контроль	3,4±1,19	4,5±0,56	0,4±0,34	6,3±1,4	3,1±0,69
Проведенное время в отсеке, с	экстракт	134,7±31,06	127,9±28,75	147,4±32,76	152,7±40,03	135,8±29,17
	контроль	108,1±42,48	116,8±32,83	115,3±21,33	215,7±26,64	150,2±28,56
Груминг, с	экстракт	9,8±3,05	7,0±2,81	15,6±6,56	22,4±7,72	18,3±4,57
	контроль	4,9±3,23	4,1±1,80	0	9,6±4,74	10,2±3,49
Продолжительность остановок, с	экстракт	31,8±9,08	32,1±13,93	58,0±21,97	87,4±29,32	78,5±21,36
	контроль	22,0±7,76	31,8±19,44	71,0±36,11	47,8±12,47	54,5±18,52
Соскальзывания лап	экстракт	1,5±0,56	0,5±0,22	1,0±0,44	1,2±0,39	1,3±0,23
	контроль	1,5±0,65	0,8±0,33	0	2,7±0,68	0,8±0,35

Полученные результаты указывают на наличие у вводимого внутрижелудочно экстракта семян лотоса орехоносного астраханской популяции анксиолитической активности, которая проявляется в течение 3-х недель исследования.

На фоне введения экстракта семян лотоса орехоносного в тесте Порсолта отмечалось снижение ЛП до 1-го проявления двигательной активности и до 1-го эпизода «зависания», а также увеличение продолжительности активного

Таблица 3

Влияние экстракта семян лотоса орехоносного на поведение животных в тесте Порсолта ($M \pm m$), сек

Группы	ЛП до 1-го движения	ЛП до 1-ой иммобильности	Активное плавание	Пассивное плавание	Иммобильность
Контроль	16,4±2,1	60,5±5,9	117,4±4,3	60,0±6,4	18,8±1,2
Экстракт семян <i>Nelumbo nucifera</i>	7,8±1,5*	87,8±9,4*	131,2±4,3*	27,4±3,5*	21,4±1,9

плавания по сравнению с животными контрольной группы (табл. 3), что свидетельствует о повышении физической выносливости опытной группы животных в аверсивной для них водной среде и о проявлении экстрактом семян лотоса орехоносного выраженных антидепрессивных свойств.

Обсуждение результатов

Установленная в ходе исследования психотропная активность экстракта семян лотоса орехоносного астраханской популяции, вероятно, обусловлена наличием в нем комплекса биологически активных веществ: флавоноиды (кверцетин, нелумбозид), лейкоантоцианиды (лейкоцианидин), алкалоиды (неферин) и др. [6, 14, 15].

Таким образом, полученные в ходе работы результаты подтверждают наличие у экстракта семян лотоса орехоносного астраханской популяции анксиолитических и антидепрессивных свойств, степень выраженности которых определяется продолжительностью введения изучаемого средства, что актуализирует проведение дальнейших углубленных исследований в плане изучения спектра и механизмов фармакологической активности с целью возможного создания на его основе лекарственных препаратов.

Выводы

1. Оценка поведения в Суок-тесте животных, получавших внутривентрикулярно экстракт семян лотоса орехоносного астраханской популяции, показала наличие анксиолитической активности, проявляющейся в снижении латентного периода выхода из центральной зоны, увеличении числа стоек и посещенных

сегментов, а также времени, проведенного в светлом отсеке.

2. Изучение влияния экстракта семян лотоса орехоносного астраханской популяции на поведение лабораторных животных в тесте Порсолта позволило выявить наличие антидепрессивных свойств, которые проявлялись в снижении латентного периода до первого проявления двигательной активности и до первого эпизода иммобилизации, а также в увеличении продолжительности активного плавания.

3. Степень выраженности психотропных свойств экстракта семян лотоса орехоносного астраханской популяции определяется продолжительностью его введения; наиболее выраженная активность проявляется при внутривентрикулярном применении экстракта семян лотоса орехоносного в течение 3-х недель.

Список литературы

1. *Андреева Н.И.* Методические указания по изучению антидепрессивной активности фармакологических веществ // Рук-во по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. чл.-корр. РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина». 2005. – С. 244-252.
2. *Калуев А.В., Туохимаа П.* Суок-тест – новая поведенческая модель тревоги // Нейронауки. – 2005. – № 1. – С. 17-23.
3. *Кондратенко Е.И., Мохамед А.А., Ломтева Н.А., Касимова С.К. и др.* Динамика параметров липидного обмена крыс при внутривентрикулярном введении экстракта семян Лотоса орехоносного // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. – Т. 12. – № 1 (8). – С. 2062-2064.
4. *Лактионов А.П.* Флора Астраханской области: монография // А.П. Лактионов. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет» – 2009. – 296 с.
5. *Михайлов Г.М., Тюренков И.Н., Чуйков В.С., Варыханов А.А. и др.* Адаптогенные свойства Астраханской популяции Лотоса орехоносного

- го. Влияние на некоторые физиологические процессы и системы биохимической защиты организма от низкомолекулярных ксенобиотиков // Тез. докл. междунар. конф. «Каспий – настоящее и будущее». – Астрахань. 1995. – С. 256-258.
6. *Anonymous A., Badami S., Moorkoth S., Rai S.R.M.S., Kannan E., et al.* Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2003. – Vol. 26. – P. 1534-1537.
 7. *Farag R.S., Hallabo S.A.S., Hewedi F.M., Basyony A.E.* Chemical evaluation of rape seed // *Fette-Seifen Anstrichmittel*. – 1986. – Vol. 88. – № 10. – P. 391-397.
 8. *Chen Y., Fan G., Wu H., Wu Y., Mitchell A.* Separation, identification and rapid determination of liensine, isoliensinine and neferine from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* GAERTN. by liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2007. – Vol. 43. – P. 99-104.
 9. *Chen J., Liu J.H., Wang T., Xiao H.J., Yin C.P., Yang J.* Effects of plant extract neferine on cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate levels in rabbit corpus cavernosum in vitro // *Asian Journal of Andrology*. – 2008. – Vol. 10. – № 2. – P. 307-312.
 10. *Chung H.-S., Lee H.J., Shim I., Bae H.* Assessment of anti-depressant effect of *Nelumbinis* semen on rats under chronic mild stress and its subchronic oral toxicity in rats and beagle dogs // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2012. – Vol. 12. – P. 68-83.
 11. *Kang M., Pyun K.H., Jang C.G., Kim H., Bae H., Shim I.* *Nelumbinis* Semen reverses a decrease in hippocampal 5-HT release induced by chronic mild stress in rats // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 57. – № 5. – P. 651-656.
 12. *Lafaka T., Sinanoglou V., Lazos E.S.* On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes // *Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 104. – P. 1206-1214.
 13. *Park S.-Y., Park K.-K., Chung W.-Y.* Inhibitory effects of betulinic acid isolated from *Nelumbo nucifera* (Lotus) on breast cancer-mediated bone destruction // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72. – P. 34.
 14. *Sugimoto Y., Furutani S., Nishimura K., Itoh A., et al.* Antidepressant-like effects of neferine in the forced swimming test involve the serotonin_{1A} receptor in mice // *Eur. J. of Pharmacology*. 2010. – Vol. 634. – P.62-67.
 15. *Sugimoto Y., Furutani S., Itoh A., Tanahashi T., et al.* Effects of extracts and neferine from the embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system // *Phytomedicine*. – 2008. – Vol. 15. – P. 1117-1124.
 16. WHO: protocol CG-04. Preparation of alcoholic extract for bioassay and phytochemical studies (APJF/IP, 1001 A). Geneva, World Health Organization, 1983.

The study of psychotropic properties of *Nelumbo nucifera* seed extract

N.A. Lomteva, E.I. Kondratenko, M.A. Samotruева

For estimation of anxiety and antidepressant action of the seed extract *Nelumbo nucifera* Astrakhan population we studied behaviour of animals at the Suok-test and the Porsolt test. Our results indicate the presence of the expressed psychotropic action of the *Nelumbo nucifera* seed extract.

Key words: *Nelumbo nucifera* seed extract, anxiolytic activity, antidepressant action, Suok-test, Porsolt test.

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

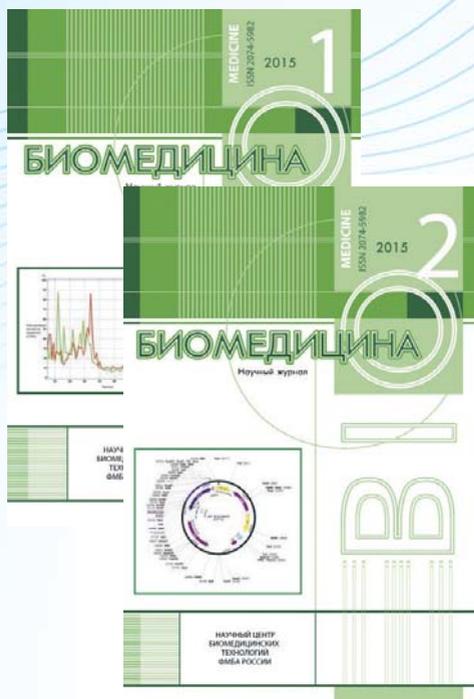
Наш адрес: Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 9 (Виварий)
ООО "Лабораторкорм"

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 «Биомедицина»

ISSN PRINT: 2074-5982

Главный редактор:
Н.Н.Каркищенко

Описание:

Научный журнал «Биомедицина» основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий Российской академии медицинских наук (в настоящее время ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Журнал издается на русском и английском языках. В журнале публикуются исследования по новым биомедицинским технологиям, спортивной медицине, новым регуляторным пептидам, спортивному питанию, лабораторным животным, методам биомедицинских исследований, генетике лабораторных животных, фармакологии и клинической фармакологии, восстановительной и спортивной медицине, лечебной физкультуре. Журнал предназначен для ученых, аспирантов, преподавателей и студентов ВУЗов, специалистов, работающих в области биологии, ветеринарии, медицины и биомедицины. В журнале опубликованы статьи авторов из 119 различных организаций (медицинских и биологических ВУЗов, НИИ, центров повышения квалификации специалистов), география организаций включает в себя Москву, Санкт-Петербург, Астрахань, Урал, Саратов, Кабардино-Балкарию, Томск, Дальний Восток, Нидерланды.

Импакт-фактор: 0,355

Полнотекстовая (бесплатная) версия журнала размещена на странице Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России:
http://www.scbmt.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=53&Itemid=61 , а также в РИНЦ: <http://elibrary.ru/titles.asp>

Подписной индекс в общероссийском каталоге «Роспечать. Издания органов НТИ» – 57995.