

4

2015

MEDICINE
ISSN 2074-5982

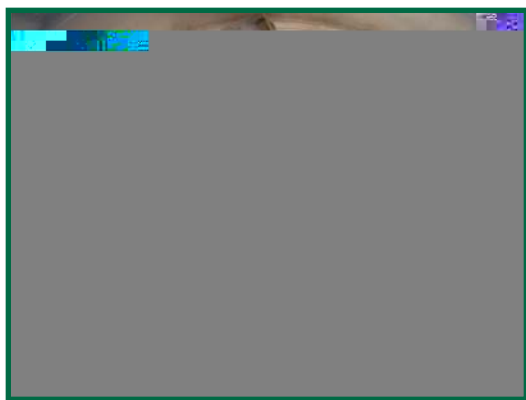
2015

4

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

**Уважаемые коллеги!
Сердечно поздравляю
Вас с Новым годом
и Рождеством!**



Прошедший 2015 год ознаменовался новыми успехами и достижениями журнала. Мы рады сообщить, что в составе редакционного совета и редакционной коллегии журнала – 5 академиков РАН, 5 членов-корреспондентов РАН, 18 докторов наук, а также зарубежные ученые из Болгарии, Грузии и Казахстана. В журнале публикуются статьи авторов из 120 различных организаций. География авторов журнала включает в себя не только Москву и Санкт-Петербург, но и Астрахань, Курск, Ставрополь, Ярославль, Алтай, Кабардино-Балкарию, Нижний Новгород, Ижевск, Оренбург, Пермь, Грузию, Нидерланды, Финляндию. 248 журналов цитируют статьи наших авторов. В числе цитирующих – «Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований», «Международный журнал экспериментального образования», «Успехи современного естествознания», «Современные наукоемкие технологии», «Экспериментальная и клиническая фармакология», «Современные проблемы науки и образования», «Фундаментальные исследования», «Спортивная медицина: наука и практика», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» и другие научные журналы. Естественно, что основная тематика цитирований относится к области медицины и здравоохранения, а также биологии, физики и химии. За «годы жизни» журнала его статьи были процитированы в 866 журнальных статьях, 39 книгах, 30 диссертациях, 28 сборниках трудов конференций и 12 сборниках и главах книг. Журнал находится на 659 месте из 3123 с показателем 0,421 в рейтинге SCIENCE INDEX и располагается между «Известиями высших учебных заведений» и «Обозрением психиатрии и медицинской психологии им. В.М.Бехтерева» (основанным в 1896 году). Импакт-фактор РИНЦ журнала «Биомедицина» составляет 0,332. Журнал входит в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук. Мы надеемся, что в наступающем году журнал станет еще лучше, сотрудничество с авторами – еще приятнее, география их – еще шире.

Желаю всем крепкого здоровья, новых ярких статей, успехов в научной работе.

*Главный редактор
журнала «Биомедицина», академик
Н.Н.Каркищенко*

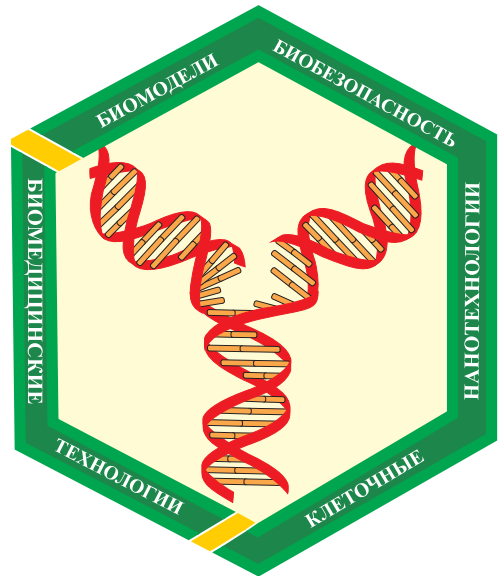
Научный журнал.

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

Главный 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 16.12.2015
Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Х.Х. Семёнов, С.В. Оковитый, С.В. Радько**
 Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α как критерий развития гипоксии тканей4
- Р.А. Клёсов, В.Н. Каркищенко, О.И. Степанова, Е.Б. Шустов**
 Влияние аллотрансплантации лимфоцитов селезёнки на развитие сахарного диабета 1 типа.....16

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, Ю.В. Фокин, О.В. Алимкина, Х.Х. Семёнов, Г.Д. Капаназе**
 Факторы, влияющие на физическую работоспособность лабораторных животных в кинезогидродинамическом исследовании.....23
- М.С. Зайцева, Д.Г. Иванов, Н.В. Александровская**
 Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины её вариабельности.....30
- Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.О. Ревякин, Г.Д. Капаназе, О.И. Степанова, Ж.О. Курищенко, Н.В. Петрова**
 Влияние трансплантации стволовых клеток мышей на регенерацию конечностей аксолотлей.....43
- Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов**
 Способ оценки нарушений микроциркуляторного русла брыжейки крыс, вызываемых изониазидом51
- О.В. Остапенко**
 Электронно-микроскопическая характеристика клеток поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом и его коррекцией Эпадалом.....61

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Д.А. Исаев, М.Ю. Мартынова, И.В. Володяев, А.О. Ревякин**
 Влияние трегалозы на сохранность мембран, подвижность и фрагментацию хроматина эпидидимальных сперматозоидов мышей при гипотермическом хранении в безэлектролитных средах69
- Е.А. Кислякова, Н.С. Тропская, Т.С. Попова**
 Энтеральное введение трибутирина как компонента нутритивной поддержки в коррекции нарушений электрической активности тонкой кишки при экспериментальной эндотоксемии.....77
- Р.Р. Сахаутдинова, Л.П. Ларионов, И.Е. Валамина, Т.М. Мельникова, Е.Ю. Мещерякова**
 Влияние кремний-, титан- и цинксодержащих глицерогидрогелей на процессы репарации в коже экспериментальных животных при местном курсовом лечении термических ожогов.....84

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- E.B. Shustov, N.N. Karkischenko, M.S. Dulya, Kh.Kh. Semenov, S.V. Okovitiy, S.V. Radko**
The expression of hypoxia-inducible factor HIF1 α as a criterion for the development of tissue hypoxia4
- R.A. Klesov, V.N. Karkischenko, O.I. Stepanova, E.B. Shustov**
Effect of transplantation of the spleen lymphocytes in the development of type 1 diabetes.....16

BIOMEDICAL METHODS

- V.N. Karkischenko, E.B. Shustov, Yu.V. Fokin, O.V. Alimkina, Kh.Kh. Semenov, G.D. Kapanadze**
Factors influencing the physical performance of laboratory animals in kinesis hydrodynamic studies23
- M.S. Zaytseva, D.G. Ivanov, N.V. Alexandrovskaya**
The rat work capacity in forced swimming test with load and causes it variability30
- G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, Zh.O. Kurishchenko, N.V. Petrova**
Effect of transplantation of stem cells from mice to regenerate limbs axolotls.....43
- E.N. Muzalevskaya, V.A. Nikolaevsky, Yu.N. Chernov**
Method of the assessment of rats mesenterial microcirculatory bed disturbances caused by isoniazid51
- O.V. Ostapenko**
The electron microscopic characteristics of cells in the pancreas of rats with postoperative hypothyroidism and its correction by Epadol61

NON-CLINICAL RESEARCHES

- D.A. Isaev, M.Yu. Martynova, I.V. Volodyaev, A.O. Revyakin**
Effect of trehalose on the safety membrane, motility and epididymal sperm chromatin fragmentation mice during hypothermic storage in electrolyte-free buffer69
- E.A. Kislyakova, N.S. Tropskaya, T.S. Popova**
Enteral administration of tributyrin as an element of nutritional support in the treatment of disruption of the intestinal electrical activity during experimental endotoxemia.....77
- R.R. Sakhautdinova, L.P. Larionov, I.E. Valamina, T.M. Mel'nikova, E.U. Mescheryakova**
The influence of silicon, titanium and zinc-containing glycerohydrogels on repair skin of experimental animals in the local exchange treatment of thermal burns.....84



Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α как критерий развития гипоксии тканей

Е.Б. Шустов¹, Н.Н. Каркищенко¹, М.С. Дуля¹, Х.Х. Семенов¹,
С.В. Оковитый², С.В. Радько²

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

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

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

Целью исследования была оценка пригодности применения уровня экспрессии гипоксия-индуцированного фактора HIF1 α для диагностики степени тяжести гипоксии тканей. Экспрессия HIF1 α является типовой ответной реакцией генома клеток на гипоксическое воздействие, запускающей многоплановые механизмы адаптации к гипоксии и повышения способности тканей к переживанию неблагоприятных воздействий. Экспериментальная гипоксия создавалась подъемом лабораторных крыс Wistar в барокамере на высоты 6, 8, 10, 11 и 12 км. Длительность экспозиции варьировала от 30 до 5 мин в зависимости от высоты. Сразу же после спуска животных забирались биологические материалы (цельная кровь, почки, печень, сердце, мозг), в которых методом ПЦР в реальном времени определялась экспрессия HIF1 α . В качестве гена стандартизации использовался ген «домашнего хозяйства» TSPO (митохондриальный транслокаторный белок). Показано, что и HIF1 α , и TSPO обладают выраженной тканеспецифичностью. В условиях гипоксии экспрессия TSPO по высотам характеризуется высокой вариативностью. Динамика экспрессии HIF1 α по высотам показывает принципиальную возможность использования этого показателя для оценки выраженности тканевой гипоксии, не зависящей от способа моделирования гипоксического воздействия.

Ключевые слова: гипоксия, гипоксия-индуцибельный фактор, лабораторные животные, экспрессия, HIF1 α , ПЦР в реальном времени.

Введение

Несмотря на достаточное количество работ по моделированию гипоксических состояний, единых критериев оценки степени тяжести гипоксических состояний, а также единых подходов к соотнесению результатов разных методов создания гипоксии друг с дру-

гом в настоящее время не создано. Однако необходимость разработки таких критериев, особенно в рамках развития медицины экстремальных состояний и фармакологии защиты профессиональной деятельности человека в неблагоприятных условиях, является весьма высокой.

Мы предположили, что универсальный критерий тяжести гипоксического состояния может быть разработан на основе анализа интенсивности генного ответа тканей на гипоксическое воздействие. Несоответствие между потребностями организма в кислороде и его доставкой приводит к активации ряда стабилизирующих механизмов. Наиболее типичным и важнейшим стабилизирующим механизмом геномного ответа на гипоксическое воздействие является экспрессия транскрипционного гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α , вовлеченного в такие процессы, как гликолиз, гематопоз, ангиогенез, регуляцию сосудистого тонуса [23], и ряд других адаптационных механизмов.

HIF представляет собой гетеродимер, состоящий из экспрессируемой конститутивно HIF-1 β субъединицы (также известной как ARNT-ядерный транслокатор арил-углеводного рецептора) [27], и одной из трех различных кислородзависимых и транскрипционно активных α -субъединиц, среди которых HIF-1 α и -2 α являются промоторами адаптации к гипоксии. У HIF-3 α отсутствует C-концевой домен трансактивации, и некоторые из HIF-3 α ингибируют HIF-1 α и функцию HIF-2 α [15].

В условиях нормоксии гетеродимерный комплекс HIF-1, состоящий из 2 белковых цепей (HIF-1 α и HIF-1 β), в цитоплазме ассоциируется с белком теплового шока HSP70 и кошапероном CHIP (C terminus of HSP70 Interacting Protein), которые обеспечивают убиквитирование белка и его деградацию в протеасомах. В условиях гипоксии в клетке появляются денатурированные белки, к которым, в силу более высокого сродства, присоединяется HSP70, диссоциируя из комплекса с HIF-1, что ведет к пре-

кращению убиквитирования и последующей протеасомной деградации HIF-1. Накапливающийся в цитоплазме HIF-1 мигрирует к ядру клетки, транслоцируется в него и выполняет свои функции транскрипционного фактора [1].

Сотни HIF-1-регулируемых генов идентифицированы на сегодняшний день. Белковые продукты этих генов играют ключевую роль в ангиогенезе, сосудистом ремоделировании, энергетическом метаболизме, пролиферации клеток и их выживании, эритропоэзе и гомеостазе железа. HIF-1 увеличивает экспрессию эритропоэтина [22], трансферрина, который транспортирует в клетки Fe³⁺ [21] и его рецепторов, которые связываются с трансферрином и позволяют клеткам его поглощать [2, 13, 26], церулоплазмину (также известного как ферроксидазы), который необходим для окисления Fe²⁺ в Fe³⁺ [17]. Увеличение активности этих генов обеспечивает поступление железа в эритроидные ткани.

Под влиянием HIF-1 повышается экспрессия VEGF, являющегося самым мощным эндотелиальным митогеном и непосредственно участвующим в ангиогенезе путем привлечения эндотелиальных клеток в гипоксические и аваскулярные области и стимулирующим их пролиферацию [4, 18]. Таким образом, индуцирование VEGF и других различных проангиогенных факторов приводит к увеличению плотности сосудов и, следовательно, к уменьшению недостатка кислорода. Кроме того, HIF-1 регулирует гены, участвующие в управлении сосудистым тонусом, такие как синтазы оксида азота (NOS2) [16], гемоксигеназа-1 [12], эндотелин-1 (ET1) [9], аденомедуллин (ADM) [19], а также гены $\alpha_{1\beta}$ -адренергических рецепторов [5].

HIF-1 увеличивают содержание практически всех ферментов гликолиза, а также переносчиков глюкозы 1 и 3 (GLU1, GLU3) [3]. Кроме того, продукты метаболизма гликолиза, такие как лактат и пируват, как показали исследования, вызывают накопление HIF-1 α при нормоксии и регулируют экспрессию гипоксия-индуцируемых генов, следовательно, создавая потенциальную положительную обратную связь [14].

HIF-1 индуцируют факторы роста, такие как инсулин-подобный фактор роста-2 (IGF2) и трансформирующий фактор роста- α (TGF- α) [6, 11]. Связывание подобных факторов роста с родственными им рецепторами активирует пути передачи сигналов, которые приводят к клеточной пролиферации/выживанию, и стимулирует экспрессию HIF-1 α [24].

HIF1 α и HIF2 α могут модулировать экспрессию изоформ цитохрома с оксидазой так, чтобы максимизировать эффективность электрон-транспортной цепи [8]. Дефекты в этой реакции приводят к нарушению продукции АТФ и повышенной продукции окислителей при гипоксии.

Регулирование обмена веществ является главной и изначальной функцией HIF-1. В условиях гипоксии HIF-1 опосредует переход от окислительного метаболизма в гликолитический путем регулирования четырех факторов: PDK1, LDHA, BNIP3 и BNIP3L. PDK1 кодирует киназу-1 пируватдегидрогеназы (PDH), которая фосфорилирует и инактивирует PDH, тем самым препятствуя превращению пирувата в ацетил-коэнзим А, вступающего в цикл трикарбоновых кислот [10, 20]. LDHA кодирует лактатдегидрогеназу А, которая преобразует пируват

в лактат [23]. HIF-1 также опосредует переключатель субъединиц цитохром С-оксидазы, что повышает эффективность переноса электрона в условиях гипоксии [7].

В работе [25] иммуногистохимическими методами и методами иммуноблоттинга было показано, что в условиях нормоксии HIF-1 определяется практически во всех тканях (хотя в некоторых органах – например, в печени и легких – на пределе чувствительности методик). При формировании гипоксических состояний (нормобарическая гипоксия, снижение содержания кислорода во вдыхаемом воздухе с 21 до 6%) отмечено нарастание содержания HIF-1. Интересным является выявленный авторами факт, что даже кратковременная реоксигенация (4-8 мин) способна вызвать резкое снижение содержания HIF-1, вероятно, за счет его быстрой деградации.

Целью исследования была оценка пригодности применения уровня экспрессии гипоксия-индуцированного фактора HIF1 α для диагностики степени тяжести гипоксии тканей.

Материалы и методы

Для оценки влияния гипоксии на экспрессию гена *HIF-1 α* был выполнен следующий эксперимент. Лабораторные животные (белые крысы-самцы популяции линий Wistar) массой 180-220 г подвергались барокамерному подъему на высоту 6000, 8000, 10000, 11000 и 12000 м со средней скоростью подъема 150 м/с. По достижению заданной высоты удерживалась площадка с продолжительностью воздействия 30 мин для высот 6 и 8 км, 20 мин – для высоты 10 км, 10 мин – для высоты

11 км и 5 мин – для высоты 12 км, после чего животные спускались с высоты до уровня моря с той же скоростью (150 м/с). Сразу же после прекращения гипоксического воздействия животные выводились из эксперимента и у них забирались образцы цельной крови, почек, печени, сердца и головного мозга. Пробы замораживались в жидком азоте и хранились до выполнения исследования в низкотемпературном холодильнике при температуре -140°C. Контролем служили аналогичные животные, помещаемые в работающую барокамеру без ее герметизации и создания гипоксии («холостой прогон», позволяющий снизить значимость стрессового фактора на животных). В каждой группе было по 5 животных. Условия, характеризующие гипоксическое воздействие, представлены в табл. 1.

Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля согласно протоколу производителя к комплекту реагентов для экстракции

РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Москва). Синтез первой цепи кДНК проводили согласно инструкции «Комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК РЕВЕРТА-L» («ИнтерЛабСервис», Москва).

Аmplification с последующим определением уровня экспрессии гена *HIF-1 α* крыс проводили методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) и специфических праймеров и зондов к гену *HIF-1 α* крыс («ДНК-Синтез», Россия). Праймеры для последовательностей *HIF-1 α* и *TSPO* (гену «домашнего хозяйства», митохондриальный белок-переносчик) были подобраны с помощью программы Vector NTI. Последовательности мРНК *HIF-1 α* и *TSPO* были взяты в базе данных NCBI GenBank и синтезированы фирмой ЗАО «ДНК-Синтез» (Москва) (табл. 2).

Таблица 1

Характеристика гипоксического воздействия на лабораторных животных по экспериментальным группам

| Группа | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|-----|------|------|------|------|-----|
| Высота, км | 0 | 6 | 8 | 10 | 11 | 12 |
| Парциальное давление кислорода, мм рт.ст. | 159 | 75 | 56 | 43 | 36 | 30 |
| Эквивалентное содержание кислорода, % | 21 | 9,9 | 7,3 | 5,6 | 4,8 | 4 |
| Насыщение гемоглобина, % | 98 | 65 | 38 | 18 | 10 | 2 |
| Дефицит парциального давления кислорода, мм рт.ст. | 0 | 84 | 103 | 116 | 120 | 126 |
| Экспозиция, мин | | 30 | 30 | 20 | 10 | 5 |
| Доза гипоксии, мм рт.ст.*мин | | 2520 | 3090 | 2320 | 1200 | 630 |

Праймеры и зонды для Real-Time PCR

| Исследуемая мишень | Олигонуклеотидные праймеры и зонды |
|---|--|
| Ген <i>HIF-1</i> | HIF_1a_F: 5- ACTCATCATGACATGTTTACTAAAGGAC -3 HIF_1a_R: 5-TGTCAAACGGGAAGATGGCAG-3 Z HIF_1a: 5-ROX-TCACCACAGGACAGTACAGGATGCTTGC-BHQ1-3 |
| Ген «домашнего хозяйства» крысы <i>TSPO</i> | TSPO_F: 5- AGGCTGTGGATCTTTCCAGAAC -3 TSPO_R: 5- GGCTGGGCACCAGAGTGA-3 ZTSPO: 5-FAM-CAATCACTATGTCTCAATCCTGGGTACCCG-BHQ1-3 |

Стадию амплификации кДНК *HIF-1α* крыс в режиме реального времени проводили в 25 мкл смеси: ПЦР-буфер (×10): 700 mM Трис-НСl, рН 8,6; 25°C, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, Taq-полимераза, на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США).

Условия проведения амплификации кДНК *HIF-1α* с праймерами HIF-1α_F/HIF-1α_R и зонда Z HIF-1α: 95°C – 15 мин, затем 50 циклов: 95°C – 30 с, 65°C – 50 с, 72°C – 30 с.

Количество исследуемых кДНК (копийных ДНК, полученных из РНК путем обратной транскрипции) в образцах рассчитывали путем определения пороговых

циклов ПЦР. Для оценки уровня экспрессии гена *HIF-1α* в качестве стандарта сравнения использовался ген *TSPO*, экспрессия которого считается стабильной для животного. Нормализация количества изучаемых транскриптов к общему количеству кДНК в пробе проводилась с помощью отношения *HIF-1α*/*TSPO*.

Результаты и их обсуждение

Первичным показателем экспрессии генов в реакции Real-Time PCR является количество циклов амплификации, необходимое для детектирования продукта анализируемого гена (Cq). Типичная картина выполнения исследования представлена на рис. 1.

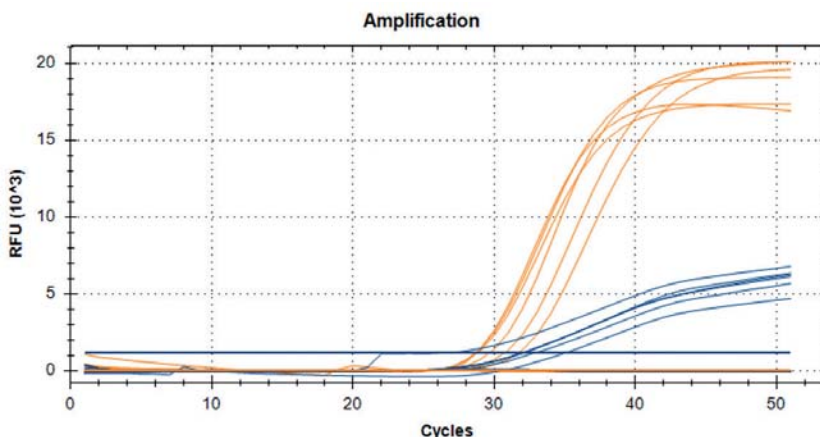


Рис. 1. Результаты амплификации генов *HIF-1α* и *TSPO* в образце мозга лабораторных животных.

Для исследования возможности применения экспрессии гена *TSPO* для оценки уровня экспрессии гена *HIF-1 α* был выполнен однофакторный дисперсионный анализ по трем независимым контролируемым факторам: тканеспецифичности, чувствительности к гипоксии и ее уровням. Результаты дисперсионного анализа представлены в табл. 3.

Однофакторный дисперсионный анализ экспрессии гена *TSPO* показал, что анализируемый ген характеризуется высокой тканеспецифичностью (73% всей вариации его экспрессии определяется тканевой принадлежностью пробы, $p=1 \cdot 10^{-7}$) и низкой чувст-

вительностью к гипоксическому воздействию (только 4% всей вариации его экспрессии определяется фактом гипоксического воздействия, $p=0,92$; и 2% – его выраженностью, $p=0,82$). Следовательно, в пределах тканевой специфичности ген *TSPO* может быть использован для оценки уровня экспрессии гена *HIF-1 α* в условиях гипоксического воздействия.

Тканеспецифичность экспрессии гена *TSPO* в условиях нормоксии отражена на рис. 2. Показателем уровня экспрессии гена при этом было число тысяч копий продукта гена, накопленного к концу процесса амплификации.

Таблица 3

Результаты дисперсионного анализа факторов тканеспецифичности и чувствительности к гипоксии на экспрессию гена *TSPO*

| Фактор | D* | F** | Fcr*** | P**** |
|-----------------------------|------|-------|--------|-------------------|
| Тканеспецифичность | 0,73 | 16,01 | 2,53 | $1 \cdot 10^{-7}$ |
| Чувствительность к гипоксии | 0,04 | 0,27 | 2,53 | 0,92 |
| Уровень гипоксии | 0,02 | 0,20 | 3,35 | 0,82 |

Примечание: * – D – коэффициент детерминации модели, ** – F – критерий Фишера, *** – Fcr – критическое значение F для оценки достоверности, **** – P – достоверность модели (уровень значимости).

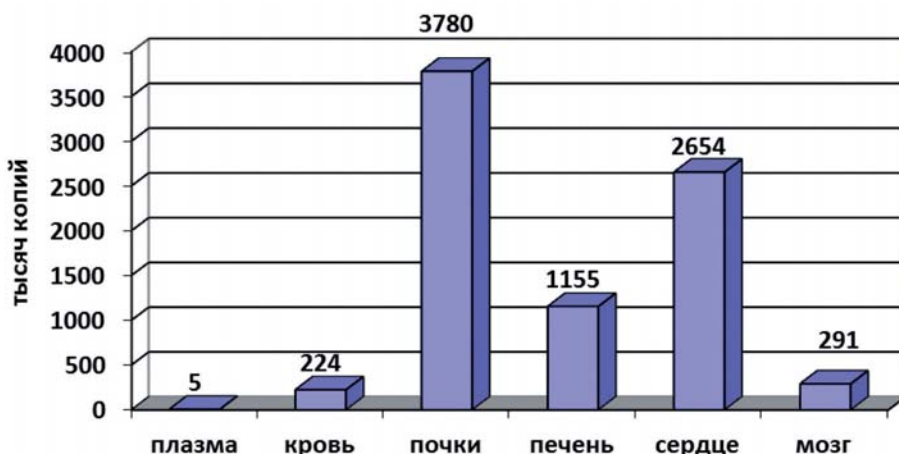


Рис. 2. Тканеспецифичность экспрессии гена *TSPO* в условиях нормоксии.

Таким образом, ген *TSP0* в условиях нормоксии на максимальном уровне экспрессируется в почках, на высоком уровне экспрессируется в сердце, на среднем уровне – в печени, на низком уровне – в клетках крови и мозга. В плазме крови экспрессия гена *TSP0* выявляется на следовом уровне, вероятно, переходя из клеток крови в процессе центрифугирования цельной крови.

Анализ вариативности экспрессии гена *TSP0* в условиях воздействия гипоксии не выявляет закономерных изменений (рис. 3).

Анализ рис. 3 показывает, что экспрессия гена *TSP0* на разных высотах может отличаться более чем в 10 раз (например, для миокарда – от 14 до 233% от уровня нормоксии, для печени – от 27 до 243% от уровня нормоксии), что делает некорректным нормирование экспрессии в условиях гипоксии других генов по уровню экспрессии *TSP0*.

Т.к. предварительный анализ показал возможность использования гена *TSP0* для оценки динамики уровня экспрессии гена *HIF-1α* в условиях нормоксии в качестве тканеспецифического стандарта, то дальнейший анализ результатов проводился для показателя относительного уровня экспрессии. Особенности экспрессии гена *HIF-1α* в разных тканях в условиях нормоксии представлены на рис. 4.

Анализ рис. 4 показывает, что уровень экспрессии гена *HIF-1α* в крови и почках соответствует базовому уровню экспрессии генов «домашнего хозяйства» лабораторных животных, в сердце – идет в 3 раза более интенсивно, в печени – в 17 раз более интенсивно, а в тканях мозга – в 272 раза интенсивнее. Можно предположить, что столь интенсивная экспрессия гена *HIF-1α* в мозге даже в обычных условиях связана с его высокой чувствительностью к

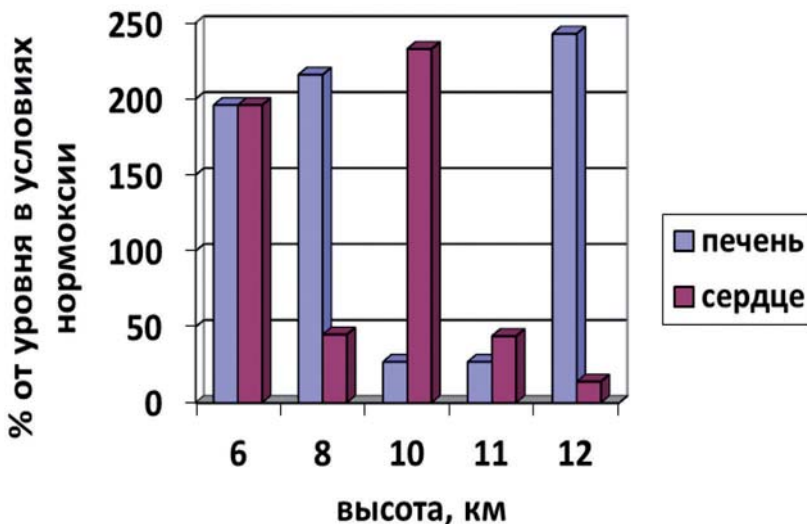


Рис. 3. Вариативность экспрессии гена *TSP0* в условиях воздействия гипоксии (на примере печени и сердца).

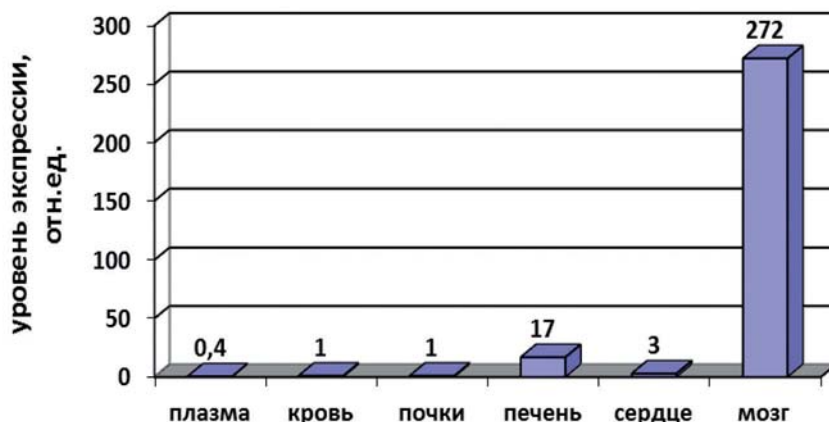


Рис. 4. Особенности экспрессии гена *HIF-1 α* в разных тканях в условиях нормоксии.

гипоксическому воздействию и необходимостью создания определенного «резерва» генной регуляции на случай экстремального воздействия. Также высоко чувствительными к гипоксии являются ткани печени и миокарда, о чем свидетельствует повышенный уровень экспрессии этого гена. Обращает на себя внимание тот факт, что в плазме крови экспрессия гена *HIF-1 α* определяется на уровне гематокритного показателя цельной крови, т.е. соответствует ее клеточной фракции и может быть исключена из дальнейшего анализа.

Данные, отражающие относительный уровень экспрессии гена *HIF-1 α* в условиях гипоксии, нормированный по соответствующим гипоксическим значениям экспрессии гена *TSPO*, представлены в табл. 4.

При анализе табл. 4 обращают на себя внимание «выпадающие» из общей динамики отдельные показатели (например, экспрессия гена в крови на высотах 10 и 12 км, в почках – на высоте 12 км, в печени – на высотах 6 и 12 км, в сердце – на высотах 10 и 12 км, в мозге – на высотах 11 и 12 км). Сопоставление данных для этих точек с динамикой экс-

Таблица 4

Относительный уровень экспрессии гена *HIF-1 α* в условиях гипоксии, нормированный по соответствующим гипоксическим значениям экспрессии гена *TSPO* (отн. ед.)

| Ткань | Высота, км | | | | | |
|--------|------------|-----|----|-----|----|-----|
| | 0 | 6 | 8 | 10 | 11 | 12 |
| Кровь | 1 | 31 | 27 | 10 | 44 | 0,3 |
| Почки | 1 | 0,1 | 1 | 1,4 | 3 | 34 |
| Печень | 17 | 7 | 58 | 43 | 47 | 2 |
| Сердце | 3 | 1,4 | 3 | 0,4 | 5 | 20 |
| Мозг | 272 | 30 | 40 | 50 | 1 | 119 |

прессии гена *TSPO* (табл. 5) показывает, что зачастую они находятся в противофазе и отражают не столько собственно экспрессию гена *HIF-1α* в условиях гипоксии, сколько вариативность экспрессии нормирующего гена *TSPO* в условиях гипоксии. Так, например, резкое снижение (в 10 раз) относительной экспрессии гена *HIF-1α* в почках на высоте 6 км на самом деле отражает рост в 30 раз уровня экспрессии гена *TSPO* в этих условиях, а рост в 34 раза на высоте 12 км включает в себя компонент, связанный со снижением в 7 раз экспрессии гена *TSPO*. Аналогичная картина наблюдается и для других тканей.

В связи с этим возникает методическая задача корректного нормирования

изменения экспрессии гена *HIF-1α* в условиях гипоксии, которая бы учитывала как высокую тканеспецифичность экспрессии этого гена (фактор тканеспецифичности описывает 95% всей вариативности показателя, $p=5 \cdot 10^{-19}$), так и само гипоксическое воздействие. Мы считаем целесообразным использование следующего методического подхода: для учета тканеспецифичности все данные об экспрессии гена *HIF-1α* первоначально нормируются по экспрессии гена *TSPO* в условиях нормоксии, а затем, для выявления динамики в условиях гипоксического воздействия, анализируются в % относительно нормоксических условий. Полученные результаты отражены в табл. 6 и на рис. 5.

Таблица 5
Динамика экспрессии гена *TSPO* в разных тканях по высотам гипоксического воздействия (% от уровня нормоксии)

| Высота, км | 0 | 6 | 8 | 10 | 11 | 12 |
|------------|-----|--------|-------|-------|--------|-------|
| Кровь | 100 | 4,8 | 0,7 | 15,0 | 5,7 | 350,6 |
| Сердце | 100 | 195,9 | 45,1 | 232,9 | 44,1 | 13,6 |
| Печень | 100 | 195,9 | 215,8 | 27,2 | 27,2 | 242,8 |
| Почки | 100 | 2924,3 | 204,2 | 80,1 | 50,3 | 13,1 |
| Мозг | 100 | 92,7 | 11,7 | 88,9 | 6139,3 | 52,9 |

Таблица 6
Динамика по высотам относительного уровня экспрессии гена *HIF-1α*, нормированного по тканеспецифической экспрессии гена *TSPO* в условиях нормоксии (% к условиям нормоксии)

| Высота | Кровь | Почки | Печень | Сердце | Мозг |
|--------|-------|-------|--------|--------|------|
| 6 | 153 | 172 | 86 | 100 | 10 |
| 8 | 19 | 209 | 757 | 55 | 17 |
| 10 | 154 | 111 | 70 | 34 | 16 |
| 11 | 260 | 133 | 78 | 87 | 24 |
| 12 | 125 | 445 | 30 | 99 | 23 |

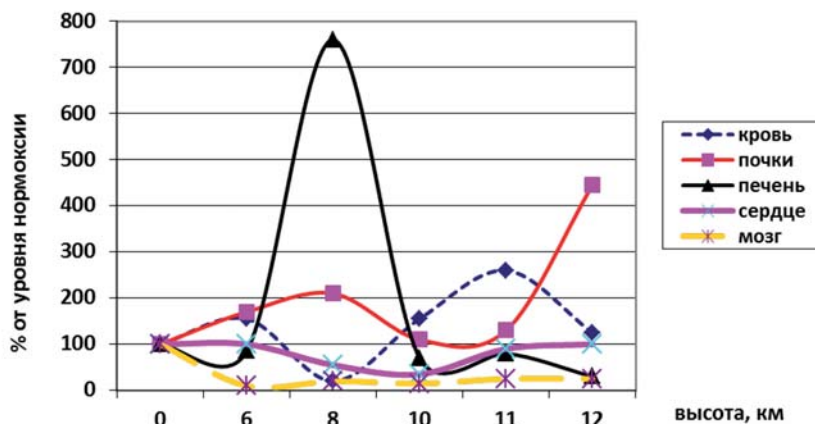


Рис. 5. Динамика относительного уровня экспрессии гена *HIF-1 α* , нормированного по тканеспецифической экспрессии гена *TSPO* в условиях нормоксии, по высотам гипоксического воздействия.

Анализ табл. 6 и рис. 5 показывает, что на гипоксическое воздействие разной интенсивности формируются тканеспецифические ответные реакции экспрессии гена *HIF-1 α* .

Наиболее своеобразная картина формируется в отношении ткани мозга. Напомним, что в условиях нормоксии именно для мозга была характерна максимальная экспрессия гена *HIF-1 α* (в 272 раза интенсивнее, чем для гена «домашнего хозяйства» клетки). В условиях гипоксии практически однотипно для разных высот происходит резкое снижение экспрессии гена *HIF-1 α* (до уровня 10-25% для разных высот). Вероятно, при гипоксии происходит резкое изменение программ генетического ответа на гипоксию, возможно, реализуемое по HIF-1 α -независимому механизму. При этом в тканях мозга происходит эффективное расходование предварительно накопленного в силу высокого уровня экспрессии в нормоксических условиях этого транскрипционного фактора.

В сердце происходит снижение экспрессии гена *HIF-1 α* в условиях гипоксии. Вероятно, что на выраженной гипоксии (точки 11 и 12 км) в силу короткой гипоксической экспозиции (10 мин на высоте 11 км и 5 мин на высоте 12 км) такое снижение экспрессии не успевает развиваться.

В печени при переходе от умеренной (6 км) к средней выраженности гипоксического воздействия (8 км) отмечается резкое повышение (в 7,5 раз) экспрессии гена *HIF-1 α* с последующим снижением на критических высотах (12 км).

В почках гипоксическое воздействие вызывает умеренное усиление экспрессии гена *HIF-1 α* (в 1,7-2,1 раза) для высот 6-8 км, затем – ее снижение до уровня, характерного для нормоксических условий (для высот 10-11 км), и резкое повышение (в 4,5 раза) на критической высоте.

Для клеток крови также характерно умеренное (примерно в 1,5 раза) повышение уровня экспрессии гена *HIF-1 α* для высот 6-10 км, и более выраженное (в 2,5 раза) повышение экспрессии для высоты 11 км.

Заключение

Проведенное исследование показало, что экспрессия гена *HIF-1α* отражает специфический тканевой ответ на гипоксическое воздействие, оценка уровня экспрессии гена *HIF-1α* может быть использована для диагностики выраженности гипоксии тканей. Т.к. генетический ответ на гипоксию не зависит от способа формирования гипоксии, предложенный методический подход может рассматриваться как универсальный, не зависящий от способа моделирования гипоксии у данного вида лабораторных животных.

Для гипоксии умеренной степени (высота 6 км) характерна умеренная активация экспрессии гена *HIF-1α* (в 1,5-1,7 раза) при сохранении на уровне, близком к нормоксическим условиям, экспрессии *HIF-1α* в печени и миокарде, и резком снижении (в 10 раз) в тканях мозга. Типичным признаком гипоксии средней тяжести (высота 8 км) является резкая активация экспрессии гена *HIF-1α* в почках (в 7,5 раз по сравнению с условиями нормоксии) и менее выраженная (в 2,1 раза) – в почках. Для выраженной гипоксии (высота 11 км) типичным признаком служит высокий уровень экспрессии гена *HIF-1α* в клетках крови (более чем в 2,5 раза). Признаком критического (но менее длительного) гипоксического воздействия является выраженная активация экспрессии гена *HIF-1α* в почках (в 4,5 раза) при снижении уровня экспрессии этого гена в печени (в 3 раза).

Список литературы

1. *Мальшев И.Ю.* Стресс-белки в биологии и медицине. - М.: ГЕОТАР-Медиа, 2012. - 176 с.
2. *Bianchi L., Tacchini L., Cairo G.* HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation // *Nucleic Acids Res.*, 1999; 27: 4223-4227.
3. *Chen J., Zhao S., Nakada K., Kuge Y., Tamaki N., Okada F., Wang J., Shindo M., Higashino F., Takeda K.* Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism // *Am. J. Pathol.*, 2003; 162: 1283-1291.
4. *Conway E.M., Collen D., Carmeliet P.* Molecular mechanisms of blood vessel growth // *Cardiovasc. Res.*, 2001; 49: 507-521.
5. *Eckhart A.D., Yang N., Xin X., Faber J.E.* Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 9487-9492.
6. *Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza G.L.* Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2 // *Cancer. Res.*, 1999; 59: 3915-3918.
7. *Fukuda R., Zhang H., Kim J.W., Shimoda L., Dang C.V., Semenza G.L.* HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells // *Cell*, 2007; 129: 111-122.
8. *Gordan J.D., Thompson C.B., Simon M.C.* HIF and c-Myc: Sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation // *Cancer. Cell*, 2007; 12: 108-113.
9. *Hu J., Discher D.J., Bishopric N.H., Webster K.A.* Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense-strand // *Biochem. biophys. res. commun.*, 1998; 245: 894-899.
10. *Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., Dang C.V.* HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia // *Cell Metab.*, 2006; 3: 177-185.
11. *Krishnamachary B., Berg-Dixon S., Kelly B., Agani F., Feldser D., Ferreira G., Iyer N., LaRusch J., Pak B., Taghavi P.* Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1 // *Cancer. Res.*, 2003; 63: 1138-1143.
12. *Lee P.J., Jiang B.H., Chin B.Y., Iyer N.V., Alam J., Semenza G.L., Choi A.M.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the hemeoxygenase-1 gene in response to hypoxia // *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 5375-5381.

13. Lok C.N., Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene // J. Biol. Chem., 1999; 274: 24147-24152.
14. Lu H., Forbes R.A., Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis // J. Biol. Chem., 2002; 277: 23111-23115.
15. Makino Y., Cao R., Svensson K., Bertilsson G., Asman M., Tanaka H. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression // Nature, 2001; 414: 550-554.
16. Melillo G., Musso T., Sica A., Taylor L.S., Cox G.W., Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter // J. Exp. Med., 1995; 182: 1683-1693.
17. Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Fox P.L. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency // J. Biol. Chem. 2000; 275: 21048-21054.
18. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors // FASEB J., 1999; 13: 9-22.
19. Nguyen S.V., Claycomb W.C. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999; 265: 382-386.
20. Papandreou I., Cairns R.A., Fontana L., Lim A.L., Denko N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption // Cell Metab., 2006; 3: 187-197.
21. Rolfs A., Kvietikova I., Gassmann M., Wenger R.H. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1 // J. Biol. Chem., 1997; 272: 20055-20062.
22. Semenza G.L., Neffelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3 to the human erythropoietin gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1991; 88: 5680-5684.
23. Semenza G.L., Jiang B.H., Leung S.W., Passantino R., Concordet J.P., Maire P., Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 // J. Biol. Chem., 1996; 271: 32529-32537.
24. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // Nat. Rev. Cancer., 2003; 3: 721-732.
25. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A.H., Bauer C., Gassmann M., Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // FASEB J., 2001. V. 15. N. 11. P. 2445-2453.
26. Tacchini L., Radice L., Bernelli-Zazzera A. Differential activation of some transcription factors during rat liver ischemia, reperfusion, and heat shock // J. Cell Physiol., 1999; 180: 255-262.
27. Wang G.L., Semenza G.L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 // J. Biol. Chem., 1995; 270: 1230-1237.

The expression of hypoxia-inducible factor HIF1 α as a criterion for the development of tissue hypoxia

E.B. Shustov, N.N. Karkischenko, M.S. Dulya, Kh.Kh. Semenov,
S.V. Okovitiy, S.V. Radko

The aim of the study was to evaluate the suitability of the use of the expression level of hypoxia-inducible factor HIF1 α to diagnose the severity of tissue hypoxia. Expression HIF1 α is a typical response of the genome of the cells in the hypoxic effects, triggering multidimensional mechanisms of adaptation to hypoxia, and improve the ability of tissues to experience adverse effects. Experimental hypoxia was created by the rise of laboratory Wistar rats in the chamber at a height of 6, 8, 10, 11 and 12 km. Duration of exposure varied from 30 to 5 minutes depending on altitude. Immediately after the descent of animals climbed the biological materials (whole blood, kidney, liver, heart, brain), in which method the real-time PCR determined the expression of HIF1 α . As the standardization gene used was the gene "household" TSPO. It is shown that HIF1 α , and TSPO have pronounced tissue-specific. Under hypoxic conditions the expression of TSPO elevation is characterized by high variability. Dynamics of expression of HIF1 α elevation shows the possibility of using this indicator to assess the severity of tissue hypoxia-independent method of modeling hypoxic exposure.

Key words: hypoxia, hypoxia-inducible factor, laboratory animals, expression of HIF1 α , real-time PCR.

Влияние аллотрансплантации лимфоцитов селезёнки на развитие сахарного диабета 1 типа

Р.А. Клёсов, В.Н. Каркищенко, О.И. Степанова, Е.Б. Шустов

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

Контактная информация: Клёсов Роман Алексеевич, klesrom@mail.ru

В работе представлены данные по аллотрансплантации спленоцитов от крыс с сахарным диабетом 1 типа генетически здоровым животным, у которых был сформирован симптомокомплекс, соответствующий клиническим, биохимическим и гистологическим проявлениям данного заболевания. Экспериментально доказано наличие переноса иммунной информации в процессе формирования у животных сахарного диабета 1 типа.

Ключевые слова: биомодель, сахарный диабет 1 типа, крысы, спленоциты, лимфоциты.

Введение

Сахарный диабет 1 типа (СД 1 типа) – метаболическое заболевание, характеризующееся гипергликемией, в основе которого лежит деструкция β -клеток, приводящая к абсолютному дефициту инсулина. Разрушение β -клеток (в большинстве случаев – среди людей европейской популяции) имеет аутоиммунную природу (с участием клеточного и гуморального звена иммунной системы) [6].

При манифестации СД 1 типа почти всегда обнаруживается воспалительная реакция в поджелудочной железе – инсулит. Иммуногистохимическое исследование показало [7], что в островках Лангерганса поджелудочной железы крыс с аутоиммунным СД 1 типа среди клеток инфильтрата преобладают Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллеры и макрофаги. При этом инфильтрат образуется только в тех островках, в которых есть β -клетки. В островках, продуцирующих глюкагон, соматостатин, но не содержащих β -клеток, нет и инфильтрата. Такая локальность, то-

чечность реакции, указывает на то, что причиной ее являются компоненты и свойства, присущие только β -клеткам. Как показывают многие наблюдения, специфичность повреждения β -клеток может быть следствием клеточной аутоиммунной реакции.

Известно, что в условиях хронического патологического процесса во всех органах иммунной системы (костный мозг, тимус и селезенка) [2] наступают морфофункциональные изменения, которые характеризуются развитием вторичного иммунодефицитного состояния с ослаблением клеточного и гуморального иммунитета, цитокиновым дисбалансом, перераспределением иммунных клеток в организме и нарушением их информационной и миграционной активности [3]. При хроническом заболевании в тканеспецифическом повреждении органов активно участвуют Т-лимфоциты. Именно Т-лимфоцитам присуща способность активно участвовать в переносе иммунной информации о патологическом процессе [1].

Целью работы являлась оценка возможности переноса лимфоцитами селезёнки патогенетической иммунной информации генетически здоровым животным и создание аутоиммунной биомодели СД 1 типа.

Материалы и методы

Исследования проводились в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России на белых лабораторных крысах-самцах популяции линий Wistar массой $242 \pm 8,3$ г в возрасте 2-3 мес. Животные поступили из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и были взяты в эксперимент методом случайной выборки.

Кормление осуществлялось стандартным полнорационным гранулированным (экструдированным) комбикормом для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5, доступ к воде и корму – свободный. Крыс содержали в микроизоляторной системе RairIsoSystem по 5 особей, при температуре 20-22°C. Содержание животных осуществлялось в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные были разделены на контрольную (n=20) и экспериментальную группы (n=25). Исходно все животные были генетически здоровы.

Источником спленоцитов, несущих иммунную информацию о патологическом процессе при формировании СД 1 типа, была группа крыс, у которых предварительно был создан аутоиммунный СД 1 типа [4]. Аутоиммунный процесс формировался путём последовательного введения животным стрептозотоцина и неполного адьюванта Фрейнда. Верификация СД 1 типа была подтверждена

клиническими, биохимическими и гистологическими методами.

Для проведения аллотрансплантации спленоцитов под эфирным наркозом у крыс с моделью СД 1 типа проводили лапаротомию и спленэктомию. Селезенку переносили в стерильный стеклянный гомогенизатор с физиологическим раствором в объеме 15 мл. Тщательно гомогенизировали селезенку до практически полного ее разрушения, затем этот раствор наслаивали на раствор Ficoll-Paque ($1,077 \text{ г/см}^3$). Пробирку центрифугировали в течение 40 мин при 500 об/мин. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки (лимфоциты) из интерфазы собирали и ресуспендировали в физиологическом растворе для отмывки от раствора Ficoll-Paque. Производили подсчет выделенных клеток (рис. 1). Выделенные спленоциты вводили внутрибрюшинно [5] в количестве 450-550 тыс. клеток в 0,5 мл физиологического раствора.



Рис. 1. Выделенные и подготовленные для введения Т-лимфоциты (селезенки) крыс с СД 1 типа, ув. x200.

Для выявления клинических, биохимических и гистологических признаков СД 1 типа у экспериментальных животных были проведены исследования в динамике.

Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяли на приборе Nycocard REDER II (Норвегия). Тест основан на методе боратного аффинного анализа, диапазон измерения – от 3 до 18%.

Содержание глюкозы в крови измеряли на приборе Ассу-СНЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови наносили на тест-полоску. Диапазон измерения составлял от 0,6 до 33,3 ммоль/л.

Проводился постоянный контроль массы тела животных и суточного объёма выпитой воды.

Для гистологических исследований использовался микроскоп Nikon Eclipse TS 100 (Япония) с программным обеспечением, срезы окрашивались гематоксилин-эозином.

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования было показано, что уже на третью-четвёртую не-

дели после введения спленоцитов у животных экспериментальной группы отмечалось развитие клинических признаков СД 1 типа (полиурия, полифагия, снижение веса). На 4-ю неделю эксперимента замечено достоверное снижение массы тела животных экспериментальной группы ($219 \pm 7,2$ г) по сравнению с животными контрольной группы ($276 \pm 9,6$ г).

Через 3 мес. после аллотрансплантации спленоцитов клинические и морфологические показатели животных экспериментальной группы имели достоверные отличия от таковых, полученных в контрольной группе (повышение уровня глюкозы в крови до $13,5 \pm 0,76$ ммоль/л, в то время как уровень HbA1c оставался в пределах нормы – $4,1 \pm 0,34\%$). К 5-му мес. исследования отмечалось достоверное и значительное повышение уровня глюкозы в крови до $26,3 \pm 0,88$ ммоль/л (рис. 2) и повышение уровня HbA1c до $9,4 \pm 0,25\%$ (рис. 3).

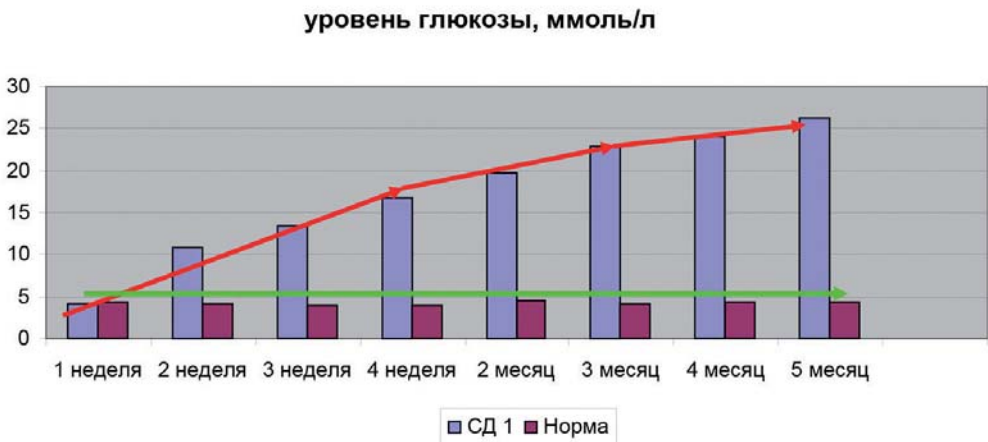


Рис. 2. Динамика изменения содержания глюкозы в крови после аллотрансплантации спленоцитов.

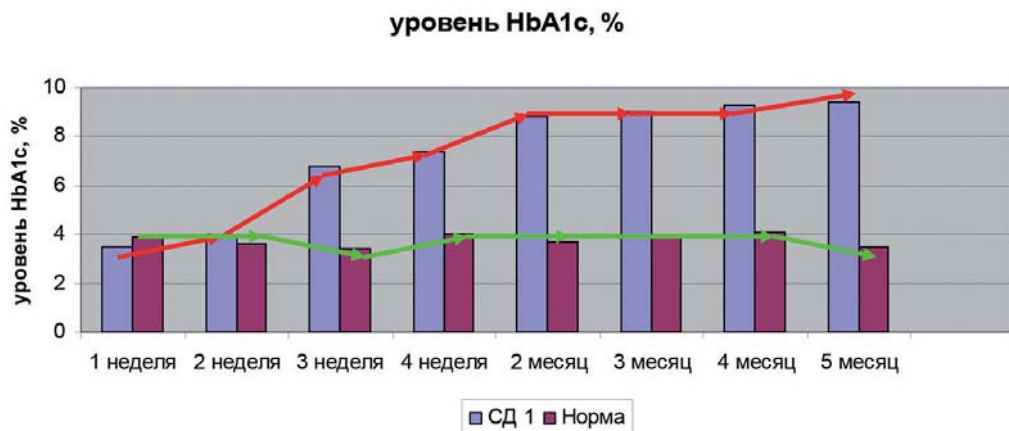


Рис. 3. Динамика изменения HbA1c в крови лабораторных животных после аллотрансплантации спленоцитов.

Масса животных экспериментальной группы уменьшалась на протяжении всего эксперимента: так, к 5-му мес. она составляла $174 \pm 12,5$ г, в то время как у животных контрольной группы – $364 \pm 18,4$ г (рис. 4).

При гистологическом исследовании органов, участвующих в патогенезе СД 1 типа, получены следующие результаты.

В гистологической картине органов животных контрольной группы отличий от нормы не выявлено.

Поджелудочная железа (рис. 5): дольковое строение поджелудочной железы экспериментальных животных сохранено. Экзокринная часть представлена панкреатическими ацинусами, вставочными внутри- и междольковыми протоками, между ацинусами отмечаются сосуды умеренного кровенаполнения (кровеносные капилляры, междольковые артериолы и артерии), единичные нервные стволы. Инсулиновые островки не просматриваются. Протоки поджелудочной железы выст-

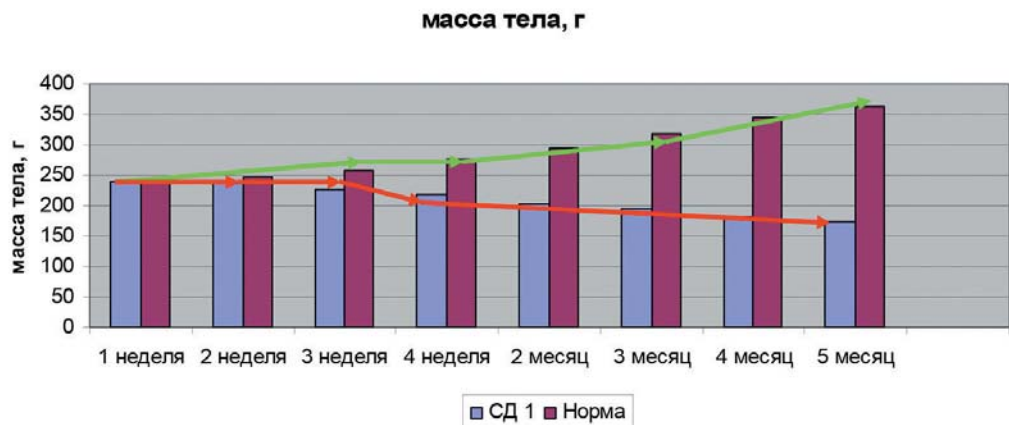


Рис. 4. Динамика изменения массы тела животных после аллотрансплантации спленоцитов.

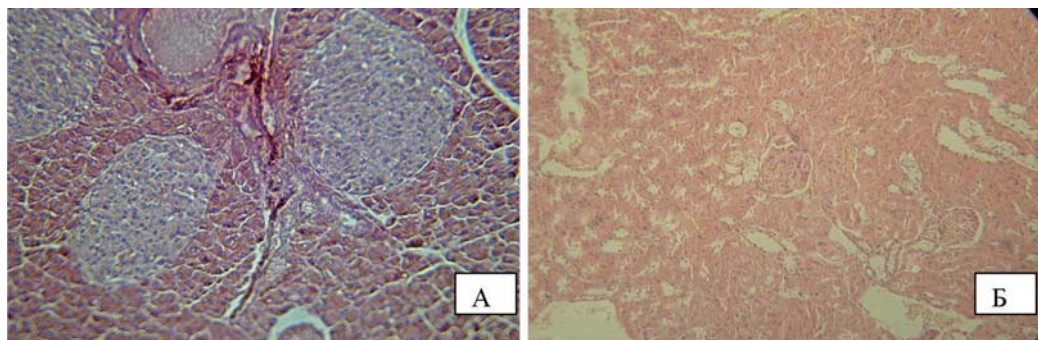


Рис. 5. Ткань поджелудочной железы крыс через 5 мес. после переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД 1 типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

ланы однорядным кубическим эпителием с базально-расположенными небольшими ядрами без видимых ядрышек. В некоторых полях зрения умеренное разрастание соединительной ткани в строме с ее разволокнением, перекалибровкой долек.

Печень (рис. 6): полнокровие центральных вен, синусоидов, мелко-, среднекапельная жировая дистрофия гепатоцитов экспериментальных животных. Гепатоциты всех отделов долек в состоянии выраженной, преимущественно мелкокапельной, жировой дистрофии, с признаками пылевидного ожирения гепатоцитов. Отмечаются признаки гибели части гепатоцитов, преимуще-

ственно центральных отделов долек, с кариопикнозом и фрагментацией ядер, появлением гиперплазированных двуядерных гепатоцитов.

Почка (рис. 7): выраженное полнокровие капиллярных петель клубочков, коллапс капиллярных петель клубочков, некроз эпителия дистальных и проксимальных канальцев экспериментальных животных. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев некротизирован, слущен в просвет (плазморексис, плазмолизис, кариорексис, кариолизис), отмечаются участки фокального и тотального тубулорексиса. Выраженный отек стромы мозгового вещества, выраженное полнокровие сосудов мозгового

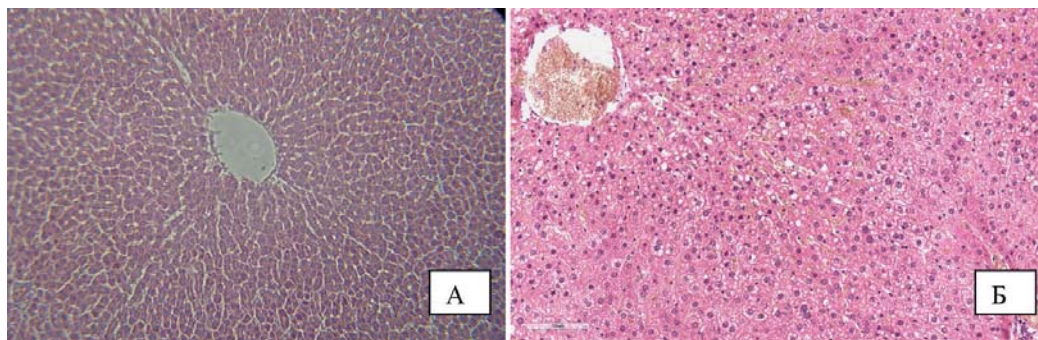


Рис. 6. Ткань печени крыс через 5 мес. после адаптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД 1 типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

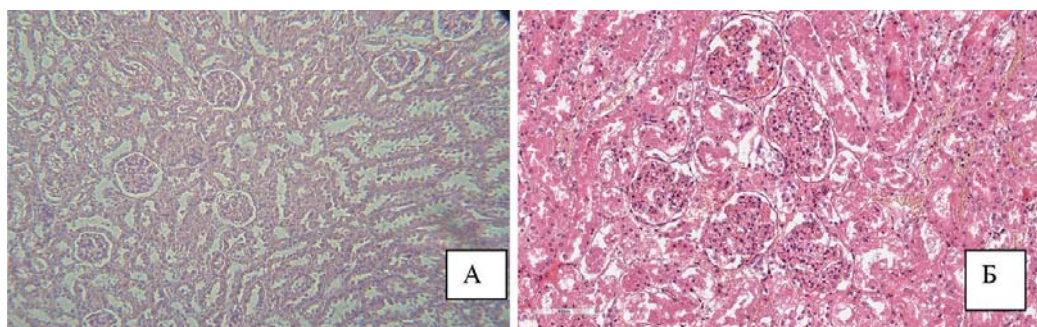


Рис. 7. Ткань почки крыс через 5 месяцев после адаптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД I типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

вещества с мелкими и крупными перитубарными кровоизлияниями.

Селезёнка (рис. 8): нарушение гистоструктуры селезёнки экспериментальных животных за счёт обширных участков некрозов без полиморфноклеточной инфильтрации, обширных участков апоптоза, полнокровие сосудов красной пульпы. По периферии селезёночной артерии отмечаются остаточные скопления малых лимфоцитов, полнокровие сосудов красной пульпы, гиалиноз трабекул.

Полученные биохимические и морфологические показатели животных

экспериментальной группы соответствуют типичной картине СД 1 типа.

Выводы

1. Клинические и биохимические исследования, проводившиеся на крысах, перенесших аллотрансплантацию спленоцитов от животных со сформированным аутоиммунным СД 1 типа, выявили стойкие изменения исследуемых показателей, свидетельствующие о развитии СД 1 типа, проявлявшиеся в стойком и достоверном снижении массы животных, стабильной гипергликемии, полидипсии и полиурии.

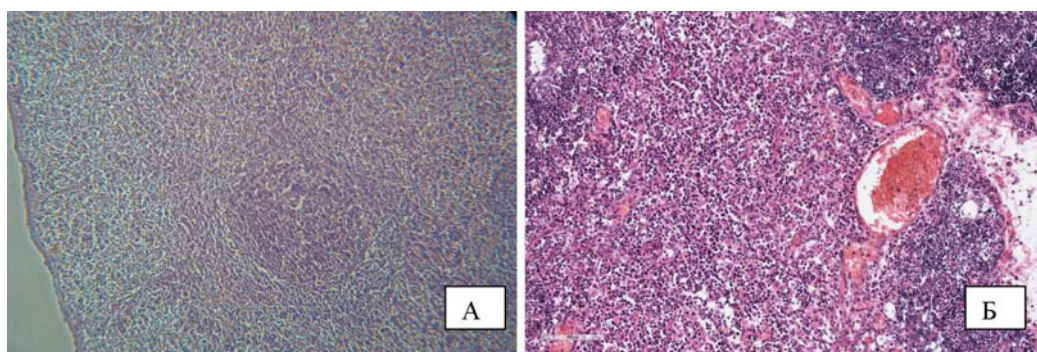


Рис. 8. Ткань селезёнки крыс через 5 мес. после адаптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД I типа. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. А – контрольная группа; Б – экспериментальная группа.

2. Типичные для СД 1 типа изменения начинаются через 3-4 недели после аллотрансплантации.

3. Через 5 мес. после аллотрансплантации спленоцитов генетически здоровым животным проявляются структурно-морфологические изменения в поджелудочной железе, почках, печени и селезёнке.

4. Метод аллотрансплантации спленоцитов может быть рекомендован для биомоделирования СД 1 типа у генетически здоровых животных.

Список литературы

1. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А.* Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. - М.: Изд. РАМН, 2009. 107 с.
2. *Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др.* Состояние пулов стволовых клеток при экспериментальном сахарном диабете // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 3. С. 123-127.
3. *Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О., Князькин И.В.* Нейроиммуноэндокринология тимуса. - СПб. 2005. 157 с.
4. *Клёсов Р.А., Каркищенко В.Н., Степанова О.И., Ревякин А.О.* Оптимизация биомодели сахарного диабета 1 типа // Биомедицина. 2014. № 4. С. 25-30.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2 С. 2010. 358 с.
6. *Genuth S., et al.* Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus // Diabetes Care. 2003. No. 26. P. 3160-3167.
7. *Yoon J.W., Jun H.S.* Autoimmune destruction of pancreatic beta cells // Am. J. of Therapeutics. 2005. No. 12(6). P. 580-591.

Effect of transplantation of the spleen lymphocytes in the development of type 1 diabetes

R.A. Klesov, V.N. Karkischenko, O.I. Stepanova, E.B. Shustov

The paper presents data on transplantation of splenocytes of rats with type 1 diabetes to genetically healthy animals that have been generated syndrome, appropriate clinical, biochemical and histological manifestations of the disease. Experimentally proved the existence of the transfer immune information in the formation of type 1 diabetes in animals.

Key words: biomodel, type 1 diabetes, rats, splenocytes, lymphocytes.



Факторы, влияющие на физическую работоспособность лабораторных животных в кинезогидродинамическом исследовании

В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, Ю.В. Фокин, О.В. Алимкина,
Х.Х. Семёнов, Г.Д. Капанадзе

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

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

В статье представлена разработка условий стандартизации методики кинезогидродинамического исследования физической работоспособности лабораторных животных. Организация исследований была построена по принципу однофакторного эксперимента. Анализируемыми факторами были возраст животных, температура воды в гидроканале, обучение и тренировка животных, предшествующее утомление, стресс, голод и гипоксия. Показано, что оптимальным условием для выполнения данных исследований является использование взрослых самок крыс, предварительно обученных методике и прошедших цикл тренировок, при температуре воды в гидроканале +24°C. Предварительное гипоксическое воздействие вызывает практически полный срыв работоспособности и невозможность выполнения кинезогидродинамического исследования. Не компенсированное естественными восстановительными процессами утомление, стресс и голод вызывают ухудшение показателей физической работоспособности.

Ключевые слова: лабораторные животные, биомоделирование, физическая работоспособность, кинезогидродинамическое исследование, факторный анализ.

Введение

Одной из нерешенных методических проблем биомедицинских исследований в области спортивной медицины и доклинического изучения фармакологических средств, влияющих на физическую работоспособность, является несопоставимость результатов, полученных разными исследователями, в силу методических вариаций и расхождений в условиях проведения исследований [4]. Универсальной мето-

дикой, сочетающей способность одновременно оценивать неспецифическую динамическую работоспособность в аэробном диапазоне нагрузок и специфическую выносливость для такого вида спорта, как плавание, является кинезогидродинамическое исследование [1-3]. Методика позволяет в одном исследовании оценивать скоростные характеристики, работоспособность, выносливость и утомляемость животных [6].

Материалы и методы

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [5]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Тестируемые животные. Исследования проводились на белых лабораторных крысах-самках линии WAG/GY, в возрасте 1,5-3,5 мес., средней массой 160-240 г, конвенционального статуса. Животные были распределены по группам в соответствии с задачами эксперимента (в каждой группе по 10 особей), уравнены по массе, условиям кормления и содержания.

Условия кормления и содержания. Крыс содержали в микроизоляторной системе «RairIsoSystem». В качестве подстилки использовали стерильные

древесные опилки. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Кинезогидродинамическая модель плавания. Исследование проводится в специальном гидроканале с изменяющимся встречным потоком воды, который должно преодолевать лабораторное животное. Гидроканал построен из прозрачного пластика прямоугольной и равнобокой трапециевидной формы в поперечном сечении (0,4x0,2x0,4 м). Длина канала составляет 1,2 м. Высота уровня жидкости равна 0,2 м. Он оснащен с торцевых сторон водосборниками, обеспечивающими ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощностью прокачки, теплообменниками для нагрева или охлаждения прокачиваемой жидкости. После включения циркулярного насоса система стабилизируется на скорости квазиламинарного потока воды не ниже 5 м/мин и температуре воды 24±1°C. «Правильное» направление движения в гидроканале у животных вырабатывается в ходе предварительного обучения с использованием в конце маршрута домика-приманки (плавающий плотик, который по ходу обучения можно отодвигать дальше к торцу гидроканала) или ими-

тации домика-норки (типа «скворечник»). В процессе эксперимента регистрируется время прохождения рабочей дистанции (1,2 м) и количество выполненных заплывов, до отказа животного от плавания. Скорость встречного потока – 0,25 м/с.

Расчетными показателями модели являются:

- максимальная скорость плавания (V_{max})

$$V_{max} = V_p + L / T_{min},$$

где V_p – скорость потока, L – длина мерного участка (1,2 м), T_{min} – минимальное время проплыва мерного участка;

- выносливость (A) – количество выполненных заплывов;

- работоспособность (R) – суммарное преодоленное расстояние

$$R = L * A + V_p * T_{sum},$$

где L – длина мерного участка (1,2 м), A – количество выполненных заплывов, V_p – скорость потока, T_{sum} – суммарное время плавания по всем заплывам;

- утомляемость (U) – тангенс угла наклона эргографической кривой (определяется как угловой коэффициент линейной регрессии зависимости продолжительности заплывов от их количества);

- средняя скорость плавания

$$V_s = R / T_{sum}.$$

В качестве контролируемых факторов анализировались возраст животных (юные – 1,5 мес., взрослые – 3-5 мес.), температура воды (24 и 34°C соответственно), фактор обучения и тренировки, фактор предшествующего утомления (выполнение предварительно физической нагрузки за 1 ч до тестирования), предшествующего стрессового воздействия (электрокожное раздражение, 30

В, 30 сек, за 10-15 мин до тестирования), голод (депривация пищи в течение 6 ч до тестирования), предшествующее гипоксическое воздействие (барокамерный подъем на критическую для крыс высоту 11500 м).

Статистическая обработка. Оценка значимости влияния контролируемых факторов проводилась методом однофакторного дисперсионного анализа (приложение «Пакет анализа» к процессору таблиц Microsoft Office Excel 2010).

Результаты и их обсуждение

Все животные, в т.ч. и контрольных групп, прошли кинезогидродинамическое исследование. В экспериментальных группах при воздействии неблагоприятных факторов отмечались отказы животных от исследований, несмотря на токовую стимуляцию. Так, в условиях голода 10% животных отказалось от плавания, в условиях стресса – 20%, в условиях предшествующего утомления – 20%, на фоне предшествующего гипоксического воздействия – 90% (что сделало невозможным проведение статистической обработки данной серии исследований).

Параметры кинезогидродинамического исследования анализировались по отдельности. Полученные результаты дисперсионного факторного анализа представлены в табл. 1-6.

На максимальную скорость плавания животных негативно влияют повышенная температура воды, предшествующие тренировки, утомление, стресс и голод (табл. 1). На среднюю скорость плавания негативно влияют юный возраст животных, предшествующее утомление и голод, повышенная температура воды (табл. 2).

Таблица 1

Результаты однофакторного дисперсионного анализа контролируемых факторов, влияющих на максимальную скорость плавания животных

| Контролируемый фактор | Центроиды групп (м/мин) | | Отличия групп, % | Параметры дисперсионного анализа | |
|------------------------------|-------------------------|------------------|------------------|----------------------------------|--------------------|
| | 1 | 2 | | D | p |
| Фактор возраста | Юные 24,8 | Взрослые 25,6 | 103 | 0,02 | 0,44 |
| Температура воды | +24° С 25,6 | +34° С 23,2 | 89 | 0,29 | 0,02 |
| Фактор обучения и тренировки | До 23,8 | После 20,9 | 87 | 0,19 | 6*10 ⁻⁷ |
| Фактор утомления | До 25,1 | После 21,6 | 86 | 0,29 | 0,02 |
| Фактор голода | Фон 25,5 | Голод 24,1 | 95 | 0,10 | 0,18 |
| Фактор стресса | Фон 25,6 | Стресс 22,0 | 86 | 0,34 | 0,01 |
| Фактор гипоксии | Фон 25,4 | Гипоксия 19,4 | 76 | | |

Примечание (здесь и далее в табл. 1-6): D – коэффициент детерминации модели, p – уровень значимости.

Таблица 2

Результаты однофакторного дисперсионного анализа контролируемых факторов, влияющих на среднюю скорость плавания животных

| Контролируемый фактор | Центроиды групп (м/мин) | | Отличия групп, % | Параметры дисперсионного анализа | |
|------------------------------|-------------------------|------------------|------------------|----------------------------------|-------|
| | 1 | 2 | | D | p |
| Фактор возраста | Юные 23,1 | Взрослые 22,8 | 99 | 0,005 | 0,67 |
| Температура воды | +24° С 22,9 | +34° С 21,1 | 92 | 0,20 | 0,06 |
| Фактор обучения и тренировки | До 19,7 | После 20,1 | 102 | 0,03 | 0,43 |
| Фактор утомления | До 22,7 | После 20,9 | 92 | 0,26 | 0,03 |
| Фактор голода | Фон 22,0 | Голод 21,2 | 96 | 0,22 | 0,04 |
| Фактор стресса | Фон 22,8 | Стресс 20,1 | 88 | 0,43 | 0,003 |
| Фактор гипоксии | Фон 22,3 | Гипоксия 17,7 | 79 | | |

Таблица 3

Результаты однофакторного дисперсионного анализа контролируемых факторов, влияющих на выносливость животных

| Контролируемый фактор | Центроиды групп (ед.) | | Отличия групп, % | Параметры дисперсионного анализа | |
|------------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|----------------------------------|--------|
| | 1 | 2 | | D | p |
| Фактор возраста | Юные 2,8 | Взрослые 5,6 | 198 | 0,29 | 0,0006 |
| Температура воды | +24° С 5,3 | +34° С 4,2 | 89 | 0,29 | 0,02 |
| Фактор обучения и тренировки | До 4,8 | После 5,2 | 108 | 0,03 | 0,43 |
| Фактор утомления | До 4,3 | После 1,5 | 35 | 0,25 | 0,025 |
| Фактор голода | Фон 4,8 | Голод 4 | 83 | 0,02 | 0,59 |
| Фактор стресса | Фон 7,0 | Стресс 5,7 | 81 | 0,02 | 0,63 |
| Фактор гипоксии | Фон 6,2 | Гипоксия 0,4 | 6 | | |

На показатель выносливости (табл. 3) положительно влияют фактор обучения и тренировки и взрослый возраст животных, отрицательно – все остальные контролируемые факторы.

Суммарное время плавания (табл. 4) имеет более высокие значения у взрослых животных и резко снижается на

фоне предшествующего утомления. Суммарная дистанция проплыва (табл. 5), наиболее полно характеризующая работоспособность животных, находится под положительным влиянием факторов возраста и тренировок, и под отрицательным влиянием фактора температуры воды и предшествующего утомления.

Таблица 4

Результаты однофакторного дисперсионного анализа контролируемых факторов, влияющих на суммарную продолжительность плавания животных

| Контролируемый фактор | Центроиды групп (с) | | Отличия групп, % | Параметры дисперсионного анализа | |
|------------------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------------------------|-------|
| | 1 | 2 | | D | p |
| Фактор возраста | Юные 24,0 | Взрослые 44,3 | 185 | 0,23 | 0,003 |
| Температура воды | +24° С 47,1 | +34° С 43,7 | 93 | 0,002 | 0,86 |
| Фактор обучения и тренировки | До 60,6 | После 69,7 | 115 | 0,08 | 0,01 |
| Фактор утомления | До 33,3 | После 17,1 | 52 | 0,16 | 0,10 |
| Фактор голода | Фон 40,8 | Голод 43,4 | 106 | 0,002 | 0,86 |
| Фактор стресса | Фон 52,6 | Стресс 51,6 | 97 | 0,001 | 0,97 |
| Фактор гипоксии | Фон 51,2 | Гипоксия 69,6 | 136 | | |

Таблица 5

Результаты однофакторного дисперсионного анализа факторов, влияющих на работоспособность (суммарная дистанция проплыва) животных

| Контролируемый фактор | Центроиды групп (м) | | Отличия групп, % | Параметры дисперсионного анализа | |
|------------------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------------------------|-------|
| | 1 | 2 | | D | p |
| Фактор возраста | Юные 8,8 | Взрослые 16,6 | 189 | 0,27 | 0,001 |
| Температура воды | +24° С 17,7 | +34° С 14,9 | 84 | 0,009 | 0,69 |
| Фактор обучения и тренировки | До 19,4 | После 21,6 | 111 | 0,09 | 0,006 |
| Фактор утомления | До 12,7 | После 6,1 | 48 | 0,17 | 0,09 |
| Фактор голода | Фон 15,0 | Голод 15,2 | 101 | 0,001 | 0,98 |
| Фактор стресса | Фон 20,3 | Стресс 17,2 | 85 | 0,02 | 0,58 |
| Фактор гипоксии | Фон 19,0 | Гипоксия 2,1 | 11 | | |

Утомляемость имеет более высокие значения у юных животных, на фоне предшествующего утомления и стресса, при более высокой температуре воды (табл. 6). Голод, обучение и тренировки не оказывали достоверного влияния на утомляемость.

Таблица 6

Результаты однофакторного дисперсионного анализа контролируемых факторов, влияющих на утомляемость животных

| Контролируемый фактор | Центроиды групп (ед.) | | Отличия групп, % | Параметры дисперсионного анализа | |
|------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|----------------------------------|--------|
| | 1 | 2 | | D | p |
| Фактор возраста | Юные 22,5 | Взрослые 12,1 | 54 | 0,36 | 0,0001 |
| Температура воды | +24° С 16,1 | +34° С 32,9 | 204 | 0,17 | 0,07 |
| Фактор обучения и тренировки | До 13,5 | После 15,6 | 116 | 0,04 | 0,28 |
| Фактор утомления | До 21,2 | После 48,8 | 230 | 0,39 | 0,006 |
| Фактор голода | Фон 19,4 | Голод 21,1 | 109 | 0,003 | 0,83 |
| Фактор стресса | Фон 12,4 | Стресс 25,2 | 203 | 0,14 | 0,14 |
| Фактор гипоксии | Фон 16,6 | Гипоксия 15,0 | 90 | | |

Выводы

Фактор возраста существенно влияет на утомляемость (у взрослых крыс – ниже, чем у юных), выносливость и работоспособность животных (у взрослых крыс – выше) и не оказывает влияния на скоростные характеристики плавания.

Фактор температуры воды ухудшает скоростные характеристики (как максимальную, так и среднюю скорость плавания) и повышает утомляемость животных (на уровне статистических тенденций). На показатели выносливости и работоспособности, при общем негативном влиянии, повышение температуры воды не оказывает статистически достоверного влияния.

Фактор предшествующего утомления существенно снижает скоростные характеристики плавания, выносливость и работоспособность животных. В наибольшей степени это влияние проявляется в повышении утомляемости.

Фактор обучения и тренировки оказывает неоднозначное влияние на показатели кинезогидродинамического исследования. При умеренном повышении выносливости и работоспособности отмечается ухудшение скоростных характеристик плавания животных, в особенности – в отношении максимальной скорости плавания (снижение на 13%).

Факторы голода и предшествующего стресса не оказывают существенного влияния на выносливость и работоспособность животных, однако несколько ухудшают скоростные характеристики плавания.

Фактор предшествующей гипоксии вызывает практически полный срыв работоспособности. 90% животных экспериментальной группы полностью отказались от выполнения теста физической нагрузки.

Список литературы

1. *Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н.* Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. – 2013. – № 1. – С. 7-17.
2. *Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В.* Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 15-21.
3. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н.* Кинезогидродинамическая модель для оценки выносливости и работоспособности лабораторных животных // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 6-14.
4. *Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б.* Очерки спортивной фармакологии. Т.1. Векторы экстраполяции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. – М., СПб.: Айсинг. – 2013. – 288 с.
5. Руководство по лабораторным животными альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. – 2010. – 358 с.
6. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Касинская Н.В.* Кинезогидродинамическая оценка скоростных характеристик физической работоспособности животных в фармакологических исследованиях // Биомедицина. – 2013. – № 3. – С. 6-17.

Factors influencing the physical performance of laboratory animals in kinesis hydrodynamic studies

**V.N. Karkischenko, E.B. Shustov, Yu.V. Fokin, O.V. Alimkina,
Kh.Kh. Semenov, G.D. Kapnadze**

The article presents the development of conditions of standardization techniques kinesis hydrodynamic study of physical health of laboratory animals. Organization of research was built on the principle of single-factor experiment. Analyzed factors were the age of the animals, the water temperature in hydraulic canals, education and training of animals prior to tiredness, stress, starvation and hypoxia. It is shown that the optimal conditions for the implementation of this research is the use of adult female rats prior training methodology and training cycle held at a temperature of water in hydraulic canals +24°C. Preliminary hypoxic exposure causes almost a complete breakdown of health and inability to perform kinesis hydrodynamic research. Uncompensated natural processes reducing tiredness, stress and hunger cause deterioration in physical performance.

Key words: laboratory animals, biomodeling, physical performance, kinesis hydrodynamic study, factor analysis.

Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины её вариабельности

М.С. Зайцева, Д.Г. Иванов, Н.В. Александровская

ФГУП «НЦ «Сигнал», Москва

Контактная информация: Зайцева Марина Сергеевна, zaiceva.mar@yandex.ru

Исследовано влияние способа введения, массы тела животных и атмосферного давления на динамику показателя работоспособности крыс при плавании с грузом 10% от массы тела. Работоспособность тестировали у животных на первые, восьмые, пятнадцатые и двадцать вторые сутки внутрижелудочного и внутримышечного введения дистиллированной воды. Динамика длительности плавания крыс при обоих способах введения характеризовалась увеличением значений показателя на восьмые, пятнадцатые и двадцать вторые сутки по сравнению с результатами первого тестирования. На пятнадцатые сутки эксперимента длительность плавания животных, на которых применялось внутрижелудочное введение, была больше, чем при внутримышечном введении. Показатель длительности плавания животных имел обратную регрессионную зависимость от массы тела и относительной массы эпидидимального жира. Атмосферное давление не оказывало влияния на среднegrupповые значения длительности плавания животных. Имелись животные с индивидуальной чувствительностью к уровню атмосферного давления, количество которых было больше в группе с внутримышечным введением.

Ключевые слова: работоспособность, вынужденное плавание с грузом, крысы.

Введение

Распространённым методом исследования работоспособности на этапе доклинических испытаний лекарственных средств является тест «Вынужденное плавание с грузом». Для получения воспроизводимых результатов и возможности их сравнения с результатами других исследователей необходима стандартизация условий проведения тестирования.

Критическим условием при выполнении теста «Вынужденное плавание с грузом» является интенсивность предъявляемой нагрузки. Известно, что при плавании с грузом $4,95 \pm 0,10\%$ от массы тела у крыс устанавливается «устойчивое состояние», соответствующее уровню лактата в крови $7,17 \pm 0,16$ ммоль/л [24]. На основании этого, вынужденное

плавание мелких лабораторных животных с грузом утяжеления $\leq 5\%$ от массы тела можно считать моделью аэробной нагрузки, плавание с грузом 10-13% от массы тела является преимущественно анаэробной нагрузкой. Об этом свидетельствуют данные [25], согласно которым плавание с грузом ниже или равным 5% от массы тела в течение 30 мин не приводит к увеличению лактата крови выше уровня, соответствующего «устойчивому состоянию», и не влияет на обмен белка в мышцах. При увеличении массы груза (при плавании с грузом 6,5% от массы тела) с 5-й мин наблюдается катаболизм белка в камбаловидной мышце и регистрируется повышение уровня лактата в крови.

На результаты теста вынужденного плавания с грузом также оказывает

влияние тренировки животных, которая сопровождается адаптационными изменениями физиологических показателей у крыс. Адаптация к аэробной плавательной нагрузке характеризуется увеличением в трехглавой мышце экспрессии коактиватора-1 рецепторов γ , активируемых пролифераторами пероксисом (PCG-1), и индуцирующего митохондриальный биогенез; увеличением содержания транспортера глюкозы типа 4 (GLUT4); активности цитратсинтазы, цитохром С оксидазы и δ -аминолевуленат синтазы, а также ядерных респираторных факторов NFR-1 и NFR-2 – транскрипционных факторов синтеза вышеуказанных ферментов [6]. Распределение мышечных волокон в прямой мышце живота при аэробной плавательной нагрузке смещается в сторону преобладания медленных оксидативных и быстрых (смешанных – тип ПА) оксидативно-гликолитических [22]. Гипертрофии сердца не наблюдается, но увеличивается площадь сечения левого желудочка, снижается частота сердечных сокращений (ЧСС) [14]. При выполнении животными анаэробных плавательных нагрузок у них наблюдается гипертрофия сердца, сопровождающаяся уменьшением площади сечения левого желудочка, без изменения ЧСС [14].

На характер нагрузки и результаты тестирования влияет высота столба жидкости. По нашим наблюдениям, в неглубоких емкостях животные склонны садиться на дно, что увеличивает длительность плавания до утомления, дисперсию средних значений показателя и ухудшает воспроизводимость результатов. Это согласуется с данными [5], в соответствии с которыми при увеличении столба воды в тесте принуди-

тельного плавания, используемого для изучения депрессивно-подобных состояний у мелких лабораторных животных, значительно снижается время неподвижности крыс и повышается уровень лактата в крови. В большинстве работ при проведении теста «Вынужденное плавание с грузом» высота столба воды составляет 50-60 см.

Важным критерием при проведении данного теста, требующим постоянного контроля, является температура воды. В диапазоне 10-28°C длительность плавания до утомления с грузом 6% от массы тела у крыс Wistar изменяется приблизительно от 2,5 до 12 мин и имеет линейную зависимость от значений температуры воды. При 30°C длительность плавания крыс с грузом 6% от массы тела в среднем составляет 150 мин [8]. При дальнейшем увеличении температуры воды длительность плавания крыс снижается [7]. Оптимальной считается температура воды ниже температуры тела животного примерно на 10°C, поэтому работоспособность крыс обычно тестируется при температуре воды 30±1°C. Повышение или понижение этого значения изменяет процессы терморегуляции, углеводного и липидного обмена [20].

Нельзя не отметить, что результаты тестирования зависят и от индивидуальных особенностей животных, связанных с видом, породой, полом и возрастом, а также условиями содержания [8, 11]. При этом контекстуальные условия теста (размер комнаты, цвет стен и освещение) не оказывают влияния на результаты тестирования [18].

Известно, что на двигательную активность крыс в условиях свободного поведения в тесте «Открытое поле»

оказывают влияние метеорологические факторы, а именно направление и скорость ветра, температура и относительная влажность воздуха, атмосферное давление, высота нижней границы облачности [4]. Однако в доступных литературных источниках не проанализировано влияние погодных условий (например, атмосферного давления) на результаты теста «Вынужденное плавание с грузом». Также можно предположить, что на физическую работоспособность будет оказывать влияние путь введения исследуемых веществ. Пероральный путь введения вызывает стрессовую реакцию [23], внутримышечное введение (особенно при длительных курсах) может быть причиной образования инфильтрата в мышцах, обусловленного повреждением ткани и возможным заносом микроорганизмов в области введения [1]. На результаты определения работоспособности животных при плавании с грузом также может влиять повторное тестирование, что связано со способностью крыс вырабатывать определенную стратегию поведения в стрессовых условиях [2] и физически адаптироваться к нагрузке.

На основании вышеизложенного, **целью** данной работы было изучение работоспособности крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» в серии повторных еженедельных тестирований с периодичностью один раз в неделю, сравнение динамики работоспособности с динамикой длительности активного плавания крыс в тесте принудительного плавания при аналогичной схеме тестирования, а также оценка влияния способа введения, массы тела и изменений атмосферного давления на длительность плавания животных.

Материалы и методы

Исследование проводили на 108 белых нелинейных крысах-самцах массой 200-300 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин.

Условия работы с экспериментальными животными соответствовали приказу Минздрава РФ от 23.08.2010 №708Н «Об утверждении правил лабораторной практики» и директиве ЕП и СЕС от 22 сентября 2010 г. «По охране животных, используемых в научных целях». Животные содержались по 6 особей в клетках 1500U Eurostandart Type IV S («Tecniplast», Италия), при температуре воздуха 20-22°C и относительной влажности 40-60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8:00, на стандартном комбикорме со свободным доступом к воде и пище. Депривация корма осуществлялась за 2 ч до начала теста.

Физическую работоспособность животных в тесте «Вынужденное плавание с грузом» оценивали по длительности плавания с грузом 10% от массы тела, прикрепленным резиновой лигатурой к корню хвоста животного. Массу животных определяли с точностью до 1 г. Длительность плавания регистрировали секундомером с точностью до 1 с. Моментом окончания эксперимента считали утомление животного в виде неспособности всплыть на поверхность воды в течение 8 с или отказ животного от плавания (погружение на дно более чем на 10 с). Утомление часто сопровождалось нарушением моторно-координационной функции (вращением и заваливанием на бок в толще воды).

Плавание проводили в сосудах из оргстекла с внутренним диаметром 30

см и высотой 75 см. Высота столба воды составляла 60 см, температура воды – $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Тестирование животных проводили с 10 до 12 ч мск.

В течение эксперимента животные тестировались 4 раза с недельным интервалом: на 1-е, 8-е, 15-е и 22-е сутки введения. Исследовали работоспособность животных, подвергавшихся введению растворителя (дистиллированной воды) в область икроножной мышцы в удельном объеме 0,5 мл/кг (группа «В/М») и внутрижелудочному введению воды в удельном объеме 3 мл/кг (группа «В/Ж»). Введение дистиллированной воды проводили ежедневно за 40 мин до начала тестирования.

Тестирование животных по указанной схеме проводили в 5-ти экспериментальных сериях в течение года с внутрижелудочным введением и в 3-х экспериментальных сериях с внутримышечным введением. В пределах одной серии тестировалось не более 12-ти животных.

У 22-х крыс, на которых использовалось внутрижелудочное введение, на 29-е сутки исследования извлекали эпидидимальный жир и определяли его массу.

Для выявления эффектов повторных тестирований, связанных с поведением крыс, на работоспособность животных в тесте «Вынужденное плавание с грузом» в отдельном эксперименте исследовали активность животных в тесте «Принудительное плавание» [21] в серии из 3-х последовательных тестирований с недельным интервалом (на 1-е, 8-е и 15-е сутки). При этом плавание животных осуществлялось в цилиндрах из оргстекла, описанных выше, которые на высоту 35 см наполняли водой с тем-

пературой $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Соседние цилиндры были отгорожены друг от друга ширмами из черного пластика. Животные в цилиндрах исследовались по одному. Смену воды в цилиндрах осуществляли после 3-4-х животных. Каждое тестирование проводили в два этапа. На первом этапе животных помещали в цилиндры на 15 мин для ознакомления, в это время их поведение не регистрировали. Через 24 ч животных помещали в цилиндр с водой на 5 мин и секундомером регистрировали длительность пассивного плавания (нахождения животного на поверхности воды без активных движений лапами и попыток выбраться) как характеристику депрессивно-подобного поведения; длительность карабканья на стены цилиндра (активное выпрыгивание на стены). Для сопоставления результатов тестов время активности животного рассчитывали как разницу между общим периодом тестирования (5 мин) и длительностью карабканья и пассивного плавания. Далее поведенческую активность животных в тесте оценивали по времени активности и длительности карабканья.

Выборки результатов для каждого способа введения формировали по данным всех серий. Указывали суммарные средние арифметические значения ($X_{\text{ср}}$), дисперсию (σ) и коэффициент вариации (CV) показателя работоспособности, число животных в выборке (n), величину асимметрии (A_s) и эксцесса (E_x). Нормальность распределения длительности плавания по частоте оценивали методом Колмогорова-Смирнова.

Дисперсия длительности плавания у крыс группы «В/Ж» на 1-е, 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента статистически значимо отличалась по критерию Ливе-

на ($p < 0,001$), что делало некорректным применение дисперсионного анализа, поэтому сравнения средних значений длительности плавания животных в группах в течение эксперимента производили с помощью непараметрических методов. Длительность плавания животных при внутрижелудочном и внутримышечном введении сравнивали по U-критерию Манна-Уитни, используемому для сравнения двух независимых выборок [3]. Сравнение средних значений длительности плавания животных на 1-е, 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента при каждом способе введения проводили с помощью критерия Т-Вилкоксона, используемого для сравнения зависимых выборок, с корректировкой по методу FDR-контроля [9]. Уровень значимости отличий принимали равным 5%. Значения уровней статистической значимости отличий, достигнутых при отдельных сравнениях, выстраивали в ряд по возрастанию. Также строили ряд рассчитанных критических значений уровня значимости, первым членом которого был принятый уровень значимости 0,05, деленный на число сравнений; вторым членом – число, в два раза большее, чем первый член ряда; третьим – число, в три раза большее и т.д. Критические значения уровня значимости округляли до тысячных, отбрасывая цифру в четвертом знаке после запятой. Статистически значимыми считали отличия, у которых при сопоставлении двух рядов достигнутый уровень значимости был меньше соответствующего по месту в ряду критического значения (критические значения p , соответствующие по месту в ряду достигнутого уровня значимости, указывали в нижнем индексе).

Влияние массы животных и количества эpidидимального жира на результаты тестирования исследовали методом регрессионного анализа. Определяли коэффициент регрессии R и коэффициенты k и b уравнения линейной регрессии $y=kx+b$.

Наличие связи между атмосферным давлением до дня тестирования ($P_{до}$), в день теста ($P_{тест}$) и суточного изменения атмосферного давления, давления перед тестированием ($P_{тест}-P_{до}$) со среднегрупповыми значениями показателя физической работоспособности животных в тесте «Принудительное плавание» исследовали методом корреляционного анализа по Спирмену. Анализировали взаимосвязь длительности плавания у каждой отдельной крысы на 1-е, 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента с показателями атмосферного давления. Количество «метеочувствительных» животных, длительность плавания которых коррелировала со значениями $P_{до}$, $P_{тест}$ и $P_{до}-P_{тест}$ при внутрижелудочном и внутримышечном введении, сравнивали с помощью точного критерия Фишера для двусторонних гипотез.

Результаты исследований

На 1-е, 8-е и 22-е сутки эксперимента частотное распределение длительности плавания крыс групп «В/М» и «В/Ж» не отличалось от нормального распределения по критерию Колмогорова-Смирнова (см. табл. 1). При этом в каждой выборке присутствовали единичные особи с высокими значениями длительности плавания, не выходящими за пределы $\pm 2\sigma$. Поэтому значения A_s и E_x распределений длительности плавания крыс по частоте у крыс групп «В/М» и «В/Ж» были больше своих ошибок.

На 15-е сутки эксперимента распределение длительности плавания крыс по частоте в обеих группах не соответствовало нормальному. В группе «В/Ж» распределение длительности плавания крыс по частоте отличалось от нормального по критерию Колмогорова-Смирнова ($Z=1,63$; $p=0,010$). Значение среднегрупповой длительности плавания составило $160,0$ с ($\sigma=73,7$ с; $n=57$), A_s было равно $2,25\pm 0,32$, $E_x - 7,23\pm 0,62$. Это обусловлено наличием двух животных (3,5% от общего числа крыс), время плавания которых отличалось от среднего значения больше чем 2σ . После выбраковки этих значений распределение длительности плавания крыс по частоте не отличалось от нормального (см. табл. 1).

В группе «В/М» на 15-е сутки распределение длительности плавания крыс по частоте отличалось от нормального по критерию Колмогорова-Смирнова ($Z=2,16$; $p<0,001$). Значение среднегрупповой длительности плавания составило $181,5$ с ($\sigma=162,0$ с; $n=35$), A_s было равно $2,52\pm 0,40$, $E_x - 5,73\pm 0,78$. Это обусловлено наличием в выборке 4-х особей (11,4% от общего числа крыс), длительность плавания которых отличалась от среднего значения больше чем 2σ , их данные были исключены из дальнейшего анализа.

При вскрытии животных, длительность плавания которых превышала среднегрупповую на 2σ , были верифицированы вздутие кишечника и эмфизема легких.

Таблица 1

Описательные статистические показатели длительности плавания крыс при внутрижелудочном и внутримышечном введении дистиллированной воды в течение 22-х суток

| Показатель выборки | 1-е сутки | 8-е сутки | 15-е сутки | 22-е сутки |
|---------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Внутрижелудочное введение | | | | |
| $X_{ср., с}$ | 106,5 | 134,1 ^a | 150,9 ^{a,б} | 130,0 ^{a,в} |
| σ | 21,5 | 45,6 | 54,3 | 39,0 |
| n | 60 | 58 | 55 | 56 |
| CV | 20,2 | 34,0 | 36,0 | 30,0 |
| A_s | 2,046 \pm 0,309* | 1,861 \pm 0,314 | 1,212 \pm 0,322 | 0,608 \pm 0,319 |
| E_x | 7,699 \pm 0,608 | 5,073 \pm 0,618 | 1,253 \pm 0,634 | 0,339 \pm 0,628 |
| Z | 1,037 | 1,102 | 1,226 | 0,740 |
| P | 0,232 | 0,176 | 0,099 | 0,645 |
| Внутримышечное введение | | | | |
| $X_{ср., с}$ | 109,0 | 128,5 ^a | 128,1 ^a | 137,6 ^a |
| σ | 24,1 | 45,8 | 45,6 | 33,6 |
| n | 36 | 36 | 31 | 26 |
| CV | 22,1 | 35,6 | 35,6 | 24,4 |
| A_s | 0,463 \pm 0,393 | 0,991 \pm 0,393 | 1,934 \pm 0,421 | -0,143 \pm 0,456 |
| E_x | -0,540 \pm 0,768 | 1,155 \pm 0,768 | 5,039 \pm 0,821 | 0,070 \pm 0,887 |
| Z | 0,508 | 0,687 | 1,041 | 0,408 |
| P | 0,959 | 0,733 | 0,228 | 0,996 |

Примечание: * – значения коэффициентов асимметрии (A_s) и эксцесса (E_x) приведены с ошибками;

^a – отличие от результата тестирования на 1-е сутки статистически значимо;

^б – отличие от результата тестирования на 8-е сутки статистически значимо;

^в – отличие от результата тестирования на 15-е сутки статистически значимо.

При внутрижелудочном введении в тесте «Вынужденное плавание с грузом» среднегрупповая длительность плавания на 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента превышала таковую на 1-е сутки тестирования на 25,9% ($p_{0,008}=0,001$), 41,7% ($p_{0,017}=0,001$) и 22,1% ($p_{0,025}=0,001$) соответственно. Длительность плавания на 15-е сутки исследования была больше относительно результатов 8-х суток на 12,5% ($p_{0,034}=0,003$) и 22-х суток – на 23,1% ($p_{0,042}=0,019$). На 22-е сутки эксперимента длительность плавания крыс группы «В/Ж» не отличалась от результатов тестирований на 8-е сутки ($p_{0,050}=0,648$).

При внутримышечном введении среднегрупповая длительность плавания животных в тесте «Вынужденное плавание с грузом» на 8-е, 15-е и 22-е сутки превышала значения, зафиксированные в 1-е сутки тестирования, на 17,9% ($p_{0,025}=0,016$), 17,5% ($p_{0,017}=0,007$) и 26,2% ($p_{0,008}=0,006$) соответственно. Длительность плавания крыс на 8-е сутки исследования не отличалась от результатов тестирования на 15-е ($p_{0,042}=0,180$) и 22-е сутки ($p_{0,034}=0,159$). Также не было установлено различий между значениями длительности плавания на 15-е и 22-е сутки ($p_{0,050}=0,721$).

Длительность плавания крыс группы «В/Ж» не отличалась от среднегрупповых значений этого показателя у жи-

вотных группы «В/М» на 1-е ($p=0,607$), 8-е ($p=0,465$) и 22-е ($p=0,246$) сутки эксперимента. На 15-е сутки эксперимента при внутрижелудочном введении длительность плавания у крыс была больше, чем при внутримышечном, на 13,4% ($p=0,019$).

В тесте «Принудительное плавание» при повторных тестированиях время активности изменялось сопоставимо показателю длительности плавания в тесте «Вынужденное плавание с грузом» (см. табл. 2). На 8-е и 15-е сутки показатели активности превышали таковые, зарегистрированные на 1-е сутки тестирования, на 40,5% ($p_{0,016}=0,006$) и на 33,9% ($p_{0,034}=0,012$) соответственно, но не различались между собой ($p_{0,050}=0,691$). Длительность карабканья на 8-е и 15-е сутки не отличалась от значения этого же показателя, зафиксированного на 1-е сутки эксперимента ($p_{0,016}=0,629$ и $p_{0,034}=0,932$).

В тесте «Вынужденное плавание с грузом» при внутрижелудочном введении методом регрессионного анализа была обнаружена зависимость длительности плавания животных от их массы на 1-е, 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента (см. табл. 3). При внутримышечном введении была выявлена зависимость длительности плавания от массы тела крыс только на 1-е сутки эксперимента.

Таблица 2

Динамика длительности плавания крыс в тесте «Принудительное плавание» при повторных тестированиях (n=15)

| Показатель | Период тестирования | | |
|----------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 1-е сутки | 8-е сутки | 15-е сутки |
| Время активности, с | 141,8±13,3 | 199,2±15,4 ^a | 189,9±19,1 ^a |
| Длительность карабканья, с | 27,9±5,3 | 32,9±8,5 | 28,7±7,8 |

Примечание: а – отличие от значения показателя на 1-е сутки статистически значимо.

Зависимость длительности плавания крыс при внутрижелудочном и внутримышечном введении дистиллированной воды от массы тела по результатам регрессионного анализа

| Период тестирований | Коэффициент регрессии (R) | Коэффициенты уравнения линейной регрессии $y=kx+b$ | |
|---------------------------|------------------------------|--|------------------------------------|
| | | k | b |
| Внутрижелудочное введение | | | |
| 1-е сутки | 0,329 $p=0,010$ $n=60$ | -0,442±0,167 $p=0,010$ $n=60$ | 208,5±38,5 $p=0,001$ $n=60$ |
| 8-е сутки | 0,238 $p=0,072$ $n=58$ | -0,528±0,288 $p=0,072$ $n=58$ | 272,1±75,6 $p=0,001$ $n=58$ |
| 15-е сутки | 0,388 $p=0,003$ $n=55$ | -0,860±0,281 $p=0,003$ $n=55$ | 392,3±79,1 $p=0,001$ $n=55$ |
| 22-е сутки | 0,385 $p=0,003$ $n=56$ | -0,524±0,171 $p=0,003$ $n=56$ | 285,4±51,0 $p=0,001$ $n=56$ |
| Внутримышечное введение | | | |
| 1-е сутки | 0,344 $p=0,040$ $n=36$ | 0,676±0,317 $p=0,040$ $n=36$ | -40,4±70,2 $p=0,568$ $n=36$ |
| 8-е сутки | 0,109 $p=0,527$ $n=36$ | -0,308±0,483 $p=0,527$ $n=36$ | 207,4±123,8 $p=0,103$ $n=36$ |
| 15-е сутки | 0,198 $p=0,285$ $n=31$ | 0,359±0,329 $p=0,285$ $n=31$ | 29,2±91,1 $p=0,751$ $n=31$ |
| 22-е сутки | 0,218 $p=0,284$ $n=26$ | -0,269±0,245 $p=0,284$ $n=26$ | 215,8±71,6 $p=0,006$ $n=26$ |

Взаимосвязи среднегрупповых значений длительности плавания и массы тела животных на 1-е, 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента при внутрижелудочном ($r=0,400$; $p=0,600$) и внутримышечном ($r=0,800$; $p=0,200$) способах введения обнаружено не было.

Анализ значений средней длительности плавания животных и абсолютной массы эпидидимального жира выявил наличие линейной регрессионной зави-

симости между показателями ($R=0,475$; $p=0,026$; $k=-18,4$; $b=208,8$; $p=0,001$).

Взаимосвязи среднегрупповой длительности плавания и коэффициента ее вариации от суточного атмосферного давления у крыс групп «В/Ж» и «В/М» в сроки – день, предшествующий тестированию, и день тестирования, а также от суточного изменения атмосферного давления установлено не было (см. табл. 4).

Взаимосвязь среднегрупповой длительности плавания и коэффициента ее вариации с атмосферным давлением в день, предшествующий тестированию, и день тестирования, и с суточным изменением атмосферного давления

| Показатель | Атмосферное давление | | |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | $P_{до}$ | $P_{тест}$ | $P_{до} - P_{тест}$ |
| Внутрижелудочное введение (n=20) | | | |
| Средняя длительность плавания, с | r=0,069 p=0,773 | r=0,240 p=0,308 | r=0,222 p=0,346 |
| CV длительность плавания | r=0,104 p=0,662 | r=0,257 p=0,273 | r=0,199 p=0,401 |
| Внутримышечное введение (n=11) | | | |
| Средняя длительность плавания, с | r=-0,282 p=0,400 | r=-0,411 p=0,209 | r=0,073 p=0,831 |
| CV длительность плавания | r=-0,169 p=0,620 | r=-0,575 p=0,064 | r=-0,229 p=0,499 |

В группе животных, где использовалось внутрижелудочное введение, были две крысы, индивидуальные значения длительности плавания которых в течение эксперимента коррелировали с уровнем атмосферного давления в день, предшествующий тестированию, что составляет 3,6% от общего количества крыс. У 4-х крыс (7,1%) индивидуальные значения длительности плавания в течение эксперимента коррелировали с уровнем атмосферного давления в день теста, а также у 3-х крыс (5,4%) – с суточным изменением атмосферного давления.

В группе животных с внутримышечным введением были 6 крыс (18,2% от общего количества), индивидуальные значения длительности плавания которых в течение эксперимента коррелировали с уровнем атмосферного давления в день, предшествующий тестированию. У пяти крыс (15,2%) индивидуальные значения длительности плавания в течение эксперимента коррелировали с

уровнем атмосферного давления в день теста. У одной крысы (3%) индивидуальные значения длительности плавания в течение эксперимента коррелировали с суточным изменением атмосферного давления.

При анализе с использованием точного критерия Фишера была выявлена статистически значимая разница ($p=0,040$) количества животных, длительность плавания которых коррелировала с уровнем атмосферного давления в день, предшествующий тестированию, в группах крыс с внутримышечным и внутрижелудочным способами введения.

Обсуждение результатов

В проведенном исследовании частотное распределение длительности плавания животных на 1-е, 8-е и 22-е сутки тестирования соответствовало нормальному. Это указывает на то, что внутригрупповая вариабельность значений показателя работоспособности опреде-

лялась влиянием случайной совокупности внешних факторов и их взаимодействием [3]. На 15-е сутки распределение длительности плавания по частоте отличалось от нормального, что было обусловлено наличием в выборке животных с высокими значениями показателя работоспособности. При вскрытии у последних наблюдались эмфизема легких, воспаление легких, и/или вздутие кишечника. Указанные патологические изменения могли быть причиной увеличения длительности плавания крыс, т.к. повышали плавучесть (снижали плотность тела) животных. Причиной обнаруженных патологических изменений у животных могло быть попадание воды в дыхательные пути и их окклюзия, ослабление иммунитета в ходе эксперимента из-за стрессогенности экспериментальных процедур, а также раздражение отдельных участков желудочно-кишечного тракта при внутрижелудочном введении [23].

Динамика работоспособности крыс при внутрижелудочном и внутримышечном введении дистиллированной воды в тесте «Вынужденное плавание с грузом» характеризовалась увеличением показателя длительности плавания в повторных тестированиях по сравнению с результатами первого исследования работоспособности. Такое увеличение работоспособности выглядело парадоксальным, т.к., во-первых, животные не подвергались тренировке, во-вторых, в течение эксперимента у животных увеличивалась масса тела, хотя, согласно результатам проведенного исследования и по данным литературы [15], крысы с большей массой тела, как правило, обнаруживают меньшую работоспособность в тесте «Вынужденное плавание

с грузом». Возможно, выявленная динамика длительности плавания у крыс в эксперименте связана с изменением нейромедиаторного пейзажа в головном мозге после первого плавания. Отчасти на это указывает схожая динамика времени активности крыс в тесте «Принудительное плавание», проводившемся по аналогичной схеме. Известно [10], что однократное принудительное плавание в течение 6 мин увеличивает плотность серотониновых рецепторов в коре мозга и количество серотониновых стереотипий у интактных мышей CD1 через 8 суток после теста. Это подтверждает предположение о влиянии первого тестирования на результаты исследования работоспособности на 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента.

Установлено, что динамика длительности плавания животных в тесте «Вынужденное плавание с грузом» зависит от способа введения: так, при внутримышечном введении отличия длительности плавания на 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента от полученных на 1-е сутки были менее выражены, чем при внутрижелудочном введении. Возможно, это объясняется повреждением мышц при внутримышечном введении. Известно, что при введении физиологического раствора на гистологических срезах мышц обнаруживается некроз мышечных волокон вдоль следа иглы, составляющий примерно 0,7% от площади введения [13]. Визуально мы не наблюдали нарушения функции конечности у животных в эксперименте и видимых признаков воспалительных процессов в мышцах при вскрытии животных. У животных, на которых использовалось внутрижелудочное введение, большая длительность плавания на

15-е сутки тестирования по сравнению с 8-ми сутками, возможно, обусловлена раздражающим действием введения зонда [23] с нарушением перистальтики желудочно-кишечного тракта и изменением состояния кишечной микрофлоры, что могло быть причиной вздутия кишечника.

Средние значения показателя работоспособности животных в тесте «Вынужденное плавание с грузом» не коррелировали с уровнем атмосферного давления за день до тестирования, в день тестирования и с перепадом атмосферного давления за 24 ч до тестирования. Следовательно, атмосферное давление не оказывает существенного влияния на результат тестирования работоспособности животных.

В то же время, независимо от способа введения, у некоторых крыс длительность плавания коррелировала с уровнем атмосферного давления, таких животных считали «метеочувствительными». При внутрижелудочном введении процент «метеочувствительных» животных в выборке был меньше, чем при внутримышечном введении. Возможно, это связано с рефлекторной регуляцией сердечной деятельности посредством активации мышечных проприорецепторов при инъекции. Раздражение мышечных метабо- и проприорецепторов в результате сокращения мышц, также как болевых и проприорецепторов при введении гипертонического раствора хлорида натрия, увеличивает сердечный выброс за счет повышения ЧСС и уровня кровяного давления [12, 16]. При этом через 30 мин после введения ЧСС снижается до первоначального уровня, а давление остается повышенным на несколько часов. Хотя в доступной литературе мы не

обнаружили данных об изменении давления у грызунов при внутримышечной инъекции, отчасти сделанное предположение подтверждается результатами исследований Meijer M.K. и соавт. [17], которые зарегистрировали описанную динамику ЧСС у мышей при внутримышечной инъекции. При внутрижелудочном введении ЧСС и уровень кровяного давления у животных одинаково снижаются в течение примерно 30 мин после выполнения процедуры и, вероятно, являются следствием стрессовой реакции [19].

Выводы

Динамика длительности плавания крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» при многократном тестировании характеризовалась большими значениями показателя на 8-е, 15-е и 22-е сутки при внутрижелудочном и внутримышечном способах введения дистиллированной воды относительно первых суток эксперимента. Такая динамика показателя работоспособности была схожа с динамикой длительности активного плавания крыс в тесте «Принудительное плавание» при аналогичной схеме тестирования. При внутрижелудочном и внутримышечном способах введения частотное распределение показателей длительности плавания соответствовало закону нормального распределения на 1-е, 8-е и 22-е сутки эксперимента. На 15-е сутки в выборках обнаруживались животные с завышенными значениями длительности плавания, обусловленными вздутием кишечника или эмфиземой легких.

На вариабельность показателя работоспособности крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» оказывал

влияние использовавшийся способ введения. На 15-е сутки эксперимента при внутрижелудочном введении дистиллированной воды длительность плавания крыс была больше, чем при внутримышечном введении.

В течение эксперимента длительность плавания отдельных животных с внутрижелудочным введением имела обратную регрессионную зависимость от массы тела и относительной массы эпидидимального жира. Средние значения длительности плавания в разные дни не коррелировали со среднегрупповыми величинами массы тела животных. При внутримышечном способе введения регрессионная зависимость длительности плавания от массы тела проявлялась только на 1-е сутки тестирования.

Уровни атмосферного давления за день до тестирования, в день тестирования, а также разница этих показателей не влияли на результаты тестирования. В эксперименте имелись животные с индивидуальной чувствительностью к уровню атмосферного давления, количество которых было больше при внутримышечном введении.

Список литературы

1. *Беляева О.А., Толстых П.И.* Постинъекционные инфильтраты и флегмоны. - Киев: 1986.
2. *Жуков Д.А.* Биологические основы поведения. Гуморальные механизмы. - СПб.: Издательство Р. Асланова «Юридический центр Пресс», 2004. 457 с.
3. *Наследов А.Д.* Математические методы психологического исследования. - СПб.: Речь, 2004. 392 с.
4. *Слапачев А.Н.* Влияние метеорологических факторов на двигательную активность крыс в тесте открытого поля // Тез. XXX научной конференции студентов и молодых ученых Южного федерального округа. -

Краснодар: Изд-во КГУФКТ, 2003. С. 174-175.

5. *Abel E.L.* Behavioral and physiological effects of different water depths in the forced swim test // *Physiology & Behavior*, 1994. V. 56. N. 2. P. 411-414.
6. *Baar K., Wende A.R., Jones T.E., Marison M., Nolte L.A., Chen M., Kelly D.P., Holloszy J.O.* Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1 // *The FASEB J.* 2002. V. 16. P. 1879-1886.
7. *Baker M.A., Horvarth S.M.* Influence of water temperature on oxygen uptake by swimming rats // *J. of applied physiology.* 1964. V. 19. N. 6. P. 1215-1218.
8. *Beaton J.R., Feleki V.* Effect of diet and water temperature on exhaustion time of swimming rats // *Canadian J. of physiology and pharmacology.* 1967. V. 45. P. 360.
9. *Benjamini Y., Hochberg Y.* Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *J. R. Statist. Soc. B.* 1995. V. 57. N. 1. P. 289-300.
10. *Davis S., Heal D.J., Stanford S.C.* Long-lasting effects of an acute stress on the neurochemistry and function of 5-hydroxytryptaminergic neurons in the mouse brain // *Psychopharmacology*, 1995; 118: 267-272.
11. *Dawson C.A., Horvath S.M.* Swimming in small laboratory animals // *Medicine and Science in Sports.* 1970. V. 2. N. 2. P. 51-78.
12. *Fisher J.P., Seifert T., Hartwich D., Young C.N., Secher N.H., Fadel P.* Autonomic control of heart rate by metabolically sensitive skeletal muscle afferents in humans // *J. physiol.* 2010. V. 588. N. 7. P. 1117-1127.
13. *Grim M., Rerabkova L., Carlson B.M.* A test for muscle lesions and their regeneration following intramuscular drug application // *Toxicologic pathology.* 1988. V. 16. N. 4. P. 432-442.
14. *Guerreiro L.F., Pereira A.A., Martins C.N., Wally C., Goncalves C.A.N.* Swimming physical training in rats: cardiovascular adaptation to exercise training protocols at different intensities // *J. of exercise physiology.* 2015. V. 18. N. 1. P. 1-12.
15. *Hohl R., Buscariolli R.O., Ferraresso R.L.P., Brenzikofer R., Macedo D.V.* Effect of body weight variation on swimming exercise workload in rats with constant and size-adjusted loads // *Scand. J. lab. anim. sci.* 2011. V. 38. N.3.

16. *Macefield V.G., Henderson L.A.* Autonomic responses to exercise: cortical and subcortical responses during post-exercise ischaemia and muscle pain // *Autonomic neuroscience: basic and clinical*. 2014. V. 188. P. 10-18.
17. *Meijer M.K., Spruijt B.M., Zutphen L.F.M., Baumans V.* Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice // *Laboratory animals*. 2006. N. 40. P. 382-391.
18. *Metzger M.M., Riccio D.C.* Adaptation to exercise in the rat: lack of associative control // *Psychobiology*. 1996. V. 24. N. 1. P. 85-90.
19. *Okva K., Tamoseviciute E., Ciziute A., Pokk P., Ruksenas O., Nevalainen T.* Refinements for intragastric gavage in rats // *Scand. J. lab. anim. sci.* 2006. V. 33. N. 4. P. 243-252.
20. *Osorio R.A.L., Silveira V.L.F., Maldjian S., Morales A., Christofani J.S., Russo A.K., Silva A.C., Picarro I.C.* Swimming of pregnant rats at different water temperatures // *Comparative biochemistry and physiology*. 2003. N. 135. Part A. P. 605-611.
21. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments // *Eur. J. of pharmacology*. 1978. V. 47. P. 379-391.
22. *Rosa M.J.A., Pai V.D., Neto H.B., Nouailhetas R.A., Nouailhetas V.L.A.* Effect of swimming training on the rectus abdominis muscle of rats: morphological and histochemical aspects // *Int. J. Morphol.* 2007. V. 25. N. 3. P. 631-638.
23. *Turner P.V., Brabb T., Pekow C., Vasbinder M.A.* Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider // *J. of the Am. Assoc. for lab. animal sci.* 2011. V. 50. N. 5. P. 600-613.
24. *Voltarelli F.A., Gobatto C.A., de Mello M.A.R.* Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test // *Braz. J. med. biol. res.* 2002. V. 35. N. 11. P. 1389-1394.
25. *Voltarelli F.A., Gobatto C.A., de Mello M.A.R.* Minimum blood lactate and muscle protein of rats during swimming exercise // *Biol. sport*. 2008. V. 25. N. 1. P. 23-34.

The rat work capacity in forced swimming test with load and causes it variability

M.S. Zaytseva, D.G. Ivanov, N.V. Alexandrovskaya

The drug administration rout, body mass and atmospheric pressure effects on the rat work capacity in forced swimming test with 10% from body mass load were investigated. The rat work capacity was tested at the 1, 8, 15 and 22-nd days of intragastral or intramuscular distilled water administration. At the 8, 15 and 22-nd experimental days the rat swimming time was increased in comparison with 1-st day test results. At the 15-th day work capacity in rat group with intragastral rout was greater than in the group with intramuscular injection. The rat swimming time had inverted correlation with body mass and relative epididymidal fat mass. Atmospheric pressure had no effect on the mean swimming time in rats groups, but rats with individual sensibility to atmospheric pressure was detected. The individual sensibility of rat to atmospheric pressure was greater in rat group with intramuscular injection than in group with intragastral administration rout.

Key words: work capacity, forced swimming with load, rat.

Влияние трансплантации стволовых клеток мышей на регенерацию конечностей аксолотлей

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

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

² – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства, Москва

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

Для изучения регенерации была ампутирована часть передней конечности аксолотлей до локтевого сустава. Выявлено, что ксенотрансплантация экспериментальным аксолотлям стволовых клеток мышей-доноров ускоряет регенерацию удаленных конечностей.

Ключевые слова: регенерация тканей, стволовые клетки, аксолотли.

Введение

Клеточная терапия – один из эффективных методов современной медицины. Она основана на лечении различных заболеваний при помощи трансплантации стволовых клеток и тканей.

Стволовые клетки – это структуры, обладающие способностью трансформироваться во взрослые и функционально активные клетки различных органов. Основным свойством любой стволовой клетки является ее потентность, определяемая степенью дифференцировки и пролиферации, на чем основана их классификация [10, 11]:

1) тотипотентные клетки способны формировать все эмбриональные и экстра-эмбриональные типы клеток. К ним относятся только оплодотворенный ооцит и бластомеры 2-8 клеточной стадии.

2) плюрипотентные клетки способны формировать все типы клеток эмбриона. К ним относятся эмбриональные стволовые клетки, первичные половые

клетки и клетки эмбриональных карцином.

3) другие типы стволовых клеток локализуются в сформировавшихся тканях взрослого организма (adult stem cells) и называются взрослыми, регионарными, или тканевыми, стволовыми клетками. Они варьируют по способности к дифференцировке от мульти- до унипотентных.

Однако в последние годы чаще используется классификация стволовых клеток по источникам их выделения: эмбриональные, фетальные (выделенные из абортивного материала) и стволовые клетки взрослого организма.

Для лечения различных заболеваний чаще всего используют аутотрансплантацию или пересадку от особи того же вида стволовых клеток, полученных из костного мозга [9, 13, 15, 18, 21, 22].

Нами показана возможность отдаленной межвидовой трансплантации стволовых клеток мышей-доноров гидробионтам (рыбам и речным ракам) с

искусственно вызванной патологией паренхиматозных органов [3, 4, 5, 8]. Выявлено, что введение стволовых клеток мышцей стимулирует репродуктивную активность половозрелых речных раков, а именно оплодотворение и откладку икры [5].

Т.к. стволовые клетки – это недифференцированные клетки и обладающие способностью к пролиферации и дифференциации, то можно предположить, что в организме реципиента они будут стимулировать регенерацию и ускорять этот процесс.

Если у тритона или аксолотля удалить конечность на любом расстоянии от ее основания, то утраченная часть восстанавливается. На конце культи образуется бугорок из внешне недифференцированных клеток, покрытый эпидермисом, – т.н. «регенерационная бластема». В результате роста и дифференцировки бластемы из нее образуются именно те части конечности, которые должны быть расположены дистально от места ампутации.

На длительность процесса регенерации оказывают сильное влияние температура, кормление и возраст животных. У молодых животных при комнатной температуре и обильном кормлении восстановление утраченных конечностей обычно занимает 3-4 недели.

Процесс регенерации утраченных конечностей во многом сходен с процессом их формирования во время эмбрионального развития. Как выяснилось, это сходство не только внешнее. Оба процесса регулируются одними и теми же генно-регуляторными каскадами – Wnt/beta-catenin и BMP. «Включая» и «выключая» отдельные гены – участники этих каскадов, можно не только

«отключить» регенерацию у животных, способных к ней, но и «включить» ее у тех животных, которые эту способность потеряли. В частности, ученым удалось таким путем «включить» процесс регенерации утраченного крыла у цыпленка [16].

С помощью генно-инженерных экспериментов показано, что регенерация конечностей у позвоночных регулируется теми же ключевыми регуляторными белками, которые управляют развитием конечностей у эмбриона. Эти белки образуют два сигнально-регуляторных каскада, которые называются Wnt/beta-catenin. Был сконструирован вирус, в геном которого был встроены гены белка Axin1. Этот белок блокирует работу Wnt-каскада. Введение вируса аксолотлю снизило способность к регенерации [14, 17].

Обнаружено, что клетки бластоцели неидентичны, хотя ещё и не являются клетками тех или иных тканей. Поэтому, например, бывшие клетки мышечной ткани производят только мышцы, клетки нервных волокон – новые нервы, клетки кожи – кожу, и т.д. Кроме того, клетки некоторых тканей (например, хряща, мышц, паренхиматозных органов и др.) «помнят» не только свою идентичность, но и положение в организме. Однако имеются клетки (в частности, шванновские), которые перемещаются в любое место, где они нужны [20].

Цель настоящей работы – изучить влияние трансплантации стволовых клеток мышцей на регенерацию конечностей реципиентов.

Материалы и методы

В качестве реципиента-объекта исследования выбраны аксолотли (рис. 1),



Рис. 1. Аксолотли.

т.к. у них относительно быстро происходит регенерация утраченных конечностей. Аксолотли – это личинки амбистом, относятся к классу Амфибий, отряд Хвостатые земноводные. Аксолотли (масса – 15-16 г, длина – 12,0-12,5 см) содержались в 160-литровых аквариумах с водоочисткой и принудительной аэрацией. Кормление осуществлялось личинками хирономид по поедаемости.

У экспериментальных объектов (10 особей) была удалена передняя конечность до плечевого сустава (рис. 2).

Группе № 2 (опытной) – 6 особей – внутрибрюшинно ввели стволовые клетки в дозе 10 млн культивированных клеток костного мозга (ККМ); контрольным объектам (группа № 1) препараты не вводились.

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

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

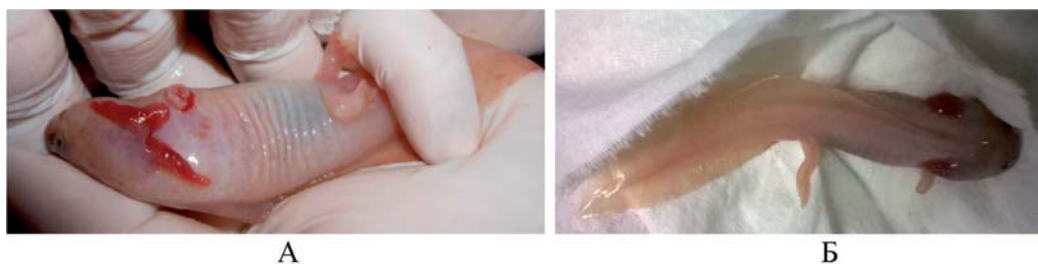


Рис. 2. Аксолотли с культей правой передней конечности: А – сразу; Б – на вторые сутки после ампутации.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали вместе с лизирующим раствором (114 mM NH₄Cl; 7,5 mM KHCO₃; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:4 в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре 22°C.

Затем надосадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую от эритроцитов и полученную смесь клеток ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25 mM NEPER, 0,58 г/л глутамина, 100 мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO₂-инкубаторе, атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности в течение 3-х суток. Через 3-е суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой округлых неприкрепившихся гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся к пластику распластанных фибробластоподобных клеток – мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Процесс регенерации оценивали по скорости роста культуры ампутированной конечности по стадиям.

Основные стадии регенерации на примере конечности личинки мексиканской амбистомы [1, 2]:

Первая стадия – заживление раны. Наружный слой лап составляют клетки эпидермиса – поверхностного слоя кожи. И определенная часть клеток начинает перемещаться с культуры на поверхность раны, постепенно закрывая ее. После нескольких делений на поверхности возникает образование, которое состоит из многих слоев и именуется апикальной шапочкой.

Вторая стадия – «демонтаж». Постепенно рассасываются ткани, непосредственно прилежащие к поверхности раны. Конец культуры становится отечным и выпячивается наружу.

Третья стадия – под апикальной шапочкой начинают накапливаться клетки, утратившие свою специализацию. На поверхности культуры образуется холмик.

Четвертая стадия – «рост». Лапа начинает интенсивно расти. Образуются пальцы. К концу стадии формируется уменьшенная копия нормальной лапы.

У экспериментальных гидробионтов делали мазки крови, по 2 шт. от каждого: один – для лейкограммы, второй – для цитохимической реакции определения катионного белка [19].

Показатели эритропоза и дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови осуществлялся микроскопически на цифровом микроскопе «Optika DM 15». Уровень гемопоэза оценивался по доле незрелых форм эритроцитов.

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась цитохимическим методом в реакции с бромфеноловым синим по М.Г. Шубичу [12], адаптированным для гидробионтов Г.И. Прониной [5, 6, 7]. Определялся средний цитохимический коэффициент (СЦК) содержания неферментного катионного белка в нейтрофилах крови.

При определении неферментного лизосомального катионного белка в нейтрофилах исследуемые клетки делили на четыре группы (0-3 балла) по степени их фагоцитарной активности: 0 – гранулы катионного белка отсутствуют, 1 – единичные гранулы, 2 – гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы, 3 – гранулы занимают 1/2 цитоплазмы и более.

СЦК по Каплоу рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \times H_0 + 1 \times H_1 + 2 \times H_2 + 3 \times H_3) / 100,$$

где H_0, H_1, H_2, H_3 – число нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с помощью программы Microsoft Office Excel, результаты оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \geq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При исследовании выявлено, что через 3 недели у аксолотлей контрольной

группы наблюдалась 2-я стадия регенерации: апикальная шапочка (рис. 3А) – около 2 мм (в опыте апикальная шапочка составляла около 3 мм), в ростовой части культи образовался бугорок размером с просыаное зерно (рис. 3Б) – 3-я стадия регенерации.

Через 6 недель наблюдается формирование пальцев у экспериментальных гидробионтов (4-я стадия регенерации); апикальная часть культи в контрольной группе составила $4,0 \pm 0,1$ мм (рис. 4А). В опытной группе размер апикальной части культи колебался в пределах $5,7 \pm 0,4$ мм (рис. 4Б). Таким образом, длина апикальной части культи аксолот-

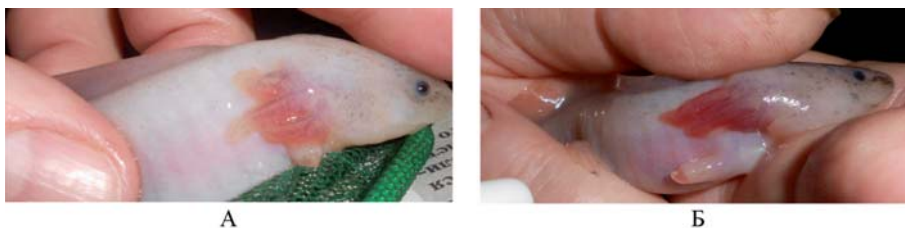


Рис. 3. Аксолотли через 3 недели после ампутации: А – контрольная группа, Б – опытная группа.

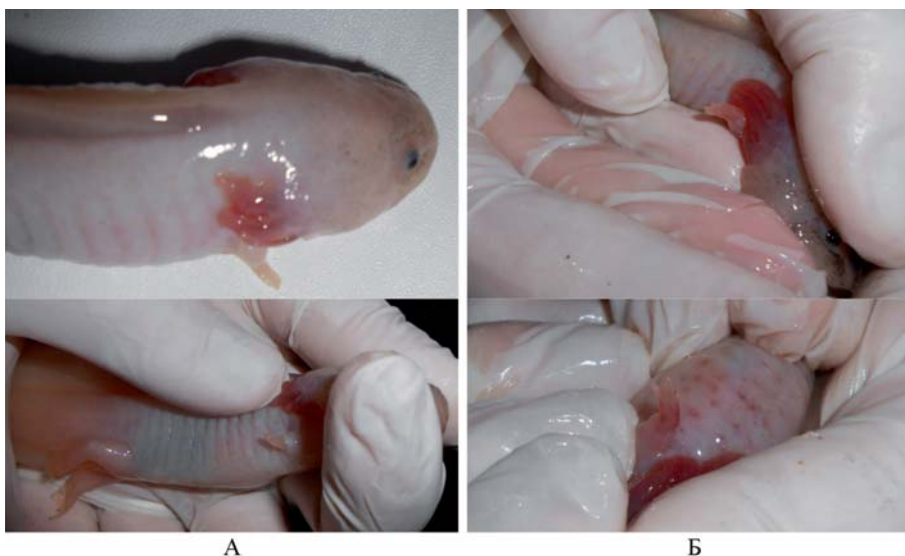


Рис. 4. Аксолотли через 6 недель после ампутации: А – контрольная группа, Б – опытная группа.

лей опытной группы превышает контроль, в среднем, на 50%, различия статистически достоверны.

Лейкограммы крови мазков-отпечатков иссеченной части культи экспериментальных аксолотлей представлены в табл. Для всех экспериментальных особей характерна большая доля бластных клеток в крови (сдвиг ядра влево). Вероятно, это связано с тем, что аксолотли являются личинками, и у них происходит интенсивное деление клеток крови.

В группе с введенными стволовыми клетками сначала (через 3 недели после ампутации) происходит усиление эритропоэза, затем (через 6 недель) – снижение, по доле незрелых клеток эритроидного ряда. Аналогичная тенденция прослеживается в отношении лейкопоза, по содержанию промиелоцитов.

Удаление конечностей и, следовательно, процесс регенерации аксо-

лотлей сопровождается уменьшением процента нейтрофилов в лейкоцитарной формуле, в основном за счет сегментоядерных форм. В нейтрофилах опытной группы (группа № 2) отмечено достоверное повышение потенциала кислороднезависимых факторов клеточного иммунитета (по СЦК лизосомального катионного белка по сравнению с контрольными группами). Повидимому, введение стволовых клеток вызвало активацию фагоцитарной активности – накопление неферментного катионного белка в лизосомах микрофагов.

Гистологические исследования иссеченных конечностей на разных стадиях регенерации показали отсутствие патологии у всех экспериментальных гидробионтов. Различий в гистологической картине между контрольными и опытными группами аксолотлей не обнаружено (рис. 5).

Таблица
Гематологические показатели экспериментальных аксолотлей

| Показатели | Интактный контроль | Через 3 недели | | Через 6 недель | |
|------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Группа № 1 | Группа № 2 | Группа № 1 | Группа № 2 |
| | а | б | в | г | д |
| Эритропоэз, % | | | | | |
| Гемоцитобласты, эритробласты | 3,8±0,4 | 4,5±0,5 | 7,3±0,8 ^{аб} | 4,5±0,5 ^б | 1,7±0,3 ^{абвг} |
| Лейкоцитарная формула, % | | | | | |
| Миелобласты | 2,5±0,9 | - | - | - | - |
| Промиелоциты | 0,8±0,5 | 2,5±0,5 | 3,7±0,7 ^а | 1,5±0,5 | - |
| Сегментоядерные | 3,8±0,6 | - | 1,3±0,7 | 0,5±0,5 ^а | - |
| Всего нейтрофилов | 4,3±0,3 | - | 1,3±0,7 ^а | 0,5±0,5 ^а | - |
| Базофилы | 0,8±0,5 | - | - | 0,5±0,5 | 2,0±0,1 |
| Моноциты | 2,5±0,3 | 2,0±0,1 | 4,1±0,5 ^б | 2,5±0,5 | 3,0±0,5 |
| Лимфоциты | 83,8±1,6 | 89,5±0,5 ^а | 82,9±1,8 ^б | 90,0±0,9 ^{аб} | 87,3±1,7 |
| Фагоцитарная активность | | | | | |
| СЦК, ед. | 2,12±0,04 | 2,08±0,06 | 2,22±0,05 | 2,32±0,04 ^{аб} | 2,31±0,03 ^{аб} |

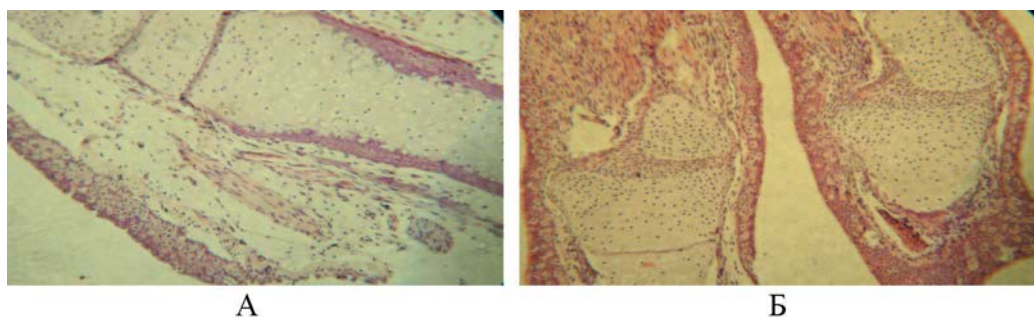


Рис. 5. Гистологическая картина тканей иссеченной конечности: А – контрольная группа, Б – опытная группа.

Во всех препаратах обнаруживается хрящевая ткань с отложением незначительного количества солей кальция, снаружи которой находится поперечнополосатая мышечная ткань и соединительно-тканые волокна. Между последними – концевые отделы простых альвеолярных желез. Разволокнение соединительно-тканной прослойки между эпителием и мышечной тканью различной степени выраженности. Вышеописанные ткани снаружи выстланы многослойным плоским эпителием с белковыми включениями в цитоплазме.

Заключение

Таким образом, введенные стволовые клетки мышей аксолотлям с ампутированными конечностями ускоряют процесс регенерации. При этом, по результатам клинического осмотра, физиологических и гистологических исследований, патологических изменений не отмечается.

Список литературы

1. Карлсон Б.М. Регенерация. - М.: Наука. 1986. 191 с.
2. Короткова Г.П. Регенерация животных. - СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета. 1997. 480 с.
3. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В. Гидробионты – альтернативные биомодели // Биомедицина. 2014. № 3. С. 102.
4. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В., Касинская Н.В. Трансплантация клеток костного мозга мышей рыбам и речным ракам // Research Journal of International Studies: сб. по результатам VII заочной науч. конф. - Екатеринбург: МНИЖ, 2014. № 1(20). Ч. 1. С. 17-18.
5. Пронина Г.И., Ревякин А.О., Корягина Н.Ю., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Курященко Ж.О. Регенерация патологически измененной печени карпа после межвидовой трансплантации стволовых клеток // Биомедицина. 2015. № 1. С. 85-89.
6. Пронина Г.И. О возможностях повышения иммунной устойчивости гидробионтов в аквакультуре // Известия ОГАУ. 2014. № 3. С. 180-183.
7. Пронина Г.И. Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья // Известия ОГАУ. № 4(20). - Оренбург. 2008. С. 160-163.
8. Ревякин А.О., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В., Касинская Н.В. Приживаемость клеток костного мозга у рыб и речных раков // Биомедицина. 2013. № 3. С. 63-66.
9. Трахтман П.Е. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток в лечении врожденных и приобретенных незло-

- качественных заболеваний у детей: Дис...
докт. мед. наук. - М., 2011. 281 с.
10. **Фриденштейн А.Я., Лолыкина К.С.** Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. - М.: Медицина. 1973. 224 с.
 11. **Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я.** Клеточные основы кроветворения (Кроветворные клетки-предшественники). - М.: Медицина. 1977. 272 с.
 12. **Шубич М.Г.** Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. 1974. № 10. С. 1321-22.
 13. **Bianco P., Cossu G.** Uno nesstmo e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors // Exp. cell res. 1999. № 251. P. 257-266.
 14. **Bischoff M., Schnabel R.** A Posterior centre establishes and maintains polarity of the caenorhabditis elegans embryo by a Wnt-dependent relay mechanism // PLoS Biology. 2006. No. 4(12): 396.
 15. **Friedrich W., Muller S.** Allogeneic stem cell transplantation for treatment of immunodeficiency // Springer semin. Immunol., 2004; No. 26: 109-9.
 16. **Hopfield J.J., Nank D.W.** «Neural» computation of decision in optimization problems // Biological cybernetics. 1985. Vol. 52. Pp. 141-152.
 17. **Kawakami Y., Esteban R., Raya M., Kawakami H., Martí M., Dubova I., Belmonte J.C.** Izpisúa Concepción Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration // Genes & Development, 2006; No. 20(23): 3232-37.
 18. **Malatack J., Consolini D., Bayever E.** The Status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease // Pediatr. neurol. 2003. No. 29. Pp. 391-412.
 19. **Pronina G.I., Revyakin A.O.** Changes of the morphophysiological parameters of carp *Cyprinus carpio* at food limitation in aquaculture conditions // J. of Ichthyology. 2015. Vol. 55. No. 2. Pp. 297-301.
 20. **Tanaka E.M.** Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration // Curr. opin. genet. dev., 2003; No. 13(5): 497-501.
 21. **Tolar J., Greval S., Bjoraker K., et al.** Combination of enzyme replacement and hematopoietic stem cell transplantation as therapy for Hurler syndrome // Bone marrow transpl., 2008; No. 41: 531-534.
 22. **Zeng W., Chen A., Kajigaya S., et al.** Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers // Blood, 2004; No. 103: 325-7.

Effect of transplantation of stem cells from mice to regenerate limbs axolotls

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

To study the regeneration of amputated limbs of the axolotl front limb was amputated to the elbow joint. It was revealed that xenotransplantation axolotls experimental stem cell donor mice accelerates the regeneration of the remote end.

Key words: tissue regeneration, stem cells, axolotls.

Способ оценки нарушений микроциркуляторного русла брыжейки крыс, вызываемых изониазидом

Е.Н. Музалевская¹, В.А. Николаевский¹, Ю.Н. Чернов²

¹ – ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

² – ГБОУ ВПО «Воронежский медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», Воронеж

Контактная информация: Музалевская Екатерина Николаевна, muzalevskaya@pharm.vsu.ru

При помощи биомикроскопии с использованием оригинального способа мониторинга микрососудов брыжейки тонкой кишки крыс в брюшной полости впервые выявлены особенности нарушений микроциркуляторных процессов, вызываемых высокими дозами изониазида, и доказана возможность коррекции выявленных нарушений липофильными соединениями растительного происхождения.

Ключевые слова: интоксикация, изониазид, микроциркуляторное русло, масло семян амаранта.

Введение

Нарушения процессов микроциркуляции являются одним из важных патогенетических факторов в развитии гемодинамических сдвигов при многих заболеваниях [5, 11]. Микроциркуляторное звено гемодинамики активно реагирует на воздействие нейромедиаторов, гормонов, кишечинальных пептидов, ксенобиотиков уже на ранних стадиях развития различных патологических состояний. В токсическом действии ксенобиотиков, в т.ч. лекарственных средств, ключевую роль в развитии и предотвращении патологических сдвигов гомеостаза играет печень. Повреждение печени сопровождается нарушениями биосинтетических процессов, активности свертывающей системы и реологических свойств крови, изменениями системной гемодинамики [2]. Немногочисленные экспериментальные исследования, посвященные изучению микроциркуляторных процессов в печени при интоксикации ксенобиотиками, основываются на

изучении изменений микроструктуры тканей и сосудов на гистологических срезах. Результаты данных работ свидетельствуют, что ишемия и гипоксия, развивающиеся вследствие микроциркуляторных расстройств, играют важную роль в генезе токсических повреждений печени и в значительной мере обуславливают степень тяжести патологического процесса и исход интоксикации [8].

Расширение знаний о влиянии ксенобиотиков на микроциркуляторные процессы при повреждении печени представляет особый интерес. Учитывая имеющиеся данные о высокой частоте развития лекарственно-индуцированных поражений печени при химиотерапии у больных туберкулезом, и, в первую очередь, изониазидом, актуальным является изучение влияния высоких доз изониазида на микроциркуляторные процессы, тем более что известная информация о таких изменениях крайне ограничена.

Следует подчеркнуть, что наиболее объективную оценку структурных пара-

метров сосудистого русла можно получить только при проведении прижизненных исследований процессов микроциркуляции в условиях естественного заполнения микрососудов кровью при сохранении сосудистого тонуса [11]. Однако прижизненное исследование микроциркуляторных процессов в сосудах самой печени является технически затруднительным. В связи с этим, целесообразным, более простым и технически удобным является использование в качестве объекта исследования брыжейки тонкой кишки крыс, сосуды которой могут отражать изменения процессов микроциркуляции в печени, т.к. верхняя и нижняя вены брыжейки являются притоками воротной вены, несущей венозную кровь к печени.

Таким образом, **целью** настоящего исследования являлось изучение особенностей нарушений микроциркуляторных процессов, вызываемых высокими дозами изониазида, при помощи метода биомикроскопии сосудов тонкой кишки крыс и оценка возможности применения липофильных соединений растительного происхождения для коррекции микроциркуляторных нарушений, индуцированных изониазидом.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 96 половозрелых конвенциональных нелинейных белых крысах-самцах в возрасте 3 мес. массой $210 \pm 8,1$ г, полученных из питомника Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко. Животные содержались в виварии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета в условиях, соответствующих действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экс-

периментально-биологических клиник (вивариев), в пластиковых клетках при естественном световом режиме. Питание животных осуществлялось стандартным сертифицированным комбикормом (АООТ «Воронежский экспериментальный комбикормовый завод») в соответствии с действующими нормами при свободном доступе к воде и пище. В качестве подстилочного материала использовали древесные опилки. В момент проведения исследований животные были клинически здоровы, без изменений в поведении, аппетита, режимов сна и бодрствования.

В исследуемых группах животные были подобраны по принципу парных аналогов по полу, возрасту и массе тела, расчет доз проводили индивидуально для каждого животного.

Оценку состояния микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки проводили методом биомикроскопии в проходящем свете на установке, смонтированной на основе микроскопа «БИОМЕД-1» (Россия) с использованием предложенного нами способа мониторинга микрососудов в брюшной полости (рис. 1) [7].

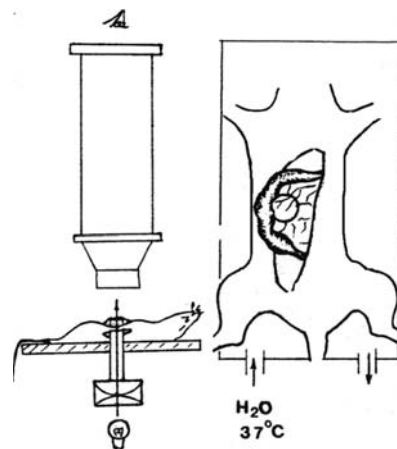


Рис. 1. Способ мониторинга микрососудов брыжейки лабораторных животных.

С помощью цифровой видеокамеры для микроскопа «Levenhuk», монтируемой на окуляр, производилась запись результатов исследований с последующей обработкой полученных данных с использованием компьютерной программы «TourView». Исследование выполнено в соответствии с принципами биоэтики, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), на наркотизированных животных. Анестезия осуществлялась внутривентральным введением свежеприготовленного раствора хлоролозы (40 мг/кг) и уретана (6 мг/кг) [11].

За 12 ч до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды.

Для создания модели острой интоксикации крысам внутривентрально с помощью металлического атравматичного зонда вводили изониазид (субстанция производства «Alfa Aesar», United Kingdom) в виде 1% крахмальной слизи в дозе 542 мг/кг массы тела (LD_{15}) один раз в сутки в течение 6-ти суток в утренние часы до основного кормления [4]. Данная схема ведения и дозы изониазида сопровождалась развитием токсического повреждения печени, верифицированного с помощью морфологических (дискомплекторные и дистрофические изменения паренхимы органа, центрлобулярные очаги некробиоза, лимфомакрофагальная инфильтрация) и биохимических (повышение активности ферментов АлАТ и АсАТ, общего билирубина) критериев.

С целью профилактики токсического повреждения печени использовали эталонный гепатопротектор, содержащий

эссенциальные фосфолипиды соевых бобов (ЭФЛ), – препарат «Эссенциале Н» (Санофи-Авентис С.А., Испания), и липофильные соединения растительного происхождения (фосфолипиды, токоферолы, сквален, каротиноиды), входящие в состав прессового масла семян амаранта (АМ), полученного по оригинальной технологии, разработанной сотрудниками Воронежского государственного университета, методом холодного проходного прессования [9].

Животные были разделены на 4 группы. Первая группа (6 особей) – интактные животные, которым внутривентрально вводили раствор натрия хлорида 0,9% из расчета 0,5 мл/кг один раз в сутки в течение 6 суток. У животных 2-й группы (30 особей) вызывали токсическое повреждение печени изониазидом. Крысам 3-й группы (30 особей) в течение 6-ти суток внутривентрально за 1 ч до введения изониазида вводили эссенциальные фосфолипиды соевых бобов («Эссенциале Н») в виде официального раствора в дозе 80 мг/кг [6]. Животным 4-й группы (30 особей) в течение 6-ти суток внутривентрально за 1 ч до введения изониазида вводили масло семян амаранта в дозе 50 мг/кг в пересчете на фосфолипиды.

Изменения микроциркуляторных процессов в брыжейке регистрировали в динамике развития интоксикации – через 1 и 24 ч после однократного введения изониазида и на 7-е, 10-е и 14-е сутки после предварительного шестикратного введения изониазида.

После проведения срединной лапаротомии [7] наркотизированных животных в интактной, контрольной и опытных группах визуально определяли наличие кровоизлияний в «кошках» брыжейки

(участок между двумя крупными кровеносными сосудами) [11] и проводили измерения их площади с использованием палеток с масштабной-координатной сеткой [3].

При биомикроскопии регистрировали нарушения в микрососудах [5, 11]:

1) внутрисосудистые – реологические расстройства;

2) сосудистые – изменения проницаемости стенок микрососудов, диapedез форменных элементов крови, микрокровоизлияния;

3) внесосудистые – изменения тока лимфы.

Для количественной характеристики состояния микроциркуляторного русла производили оценку кровотока по бальной шкале [10]: 1 балл – более чем 50% сосудов выключено из кровотока за счет стаза/тромбоза; 2 балла – более чем в 80% сосудов кровотоки замедлены вплоть до остановки, эритроциты располагаются в виде «монетного столбика»; 3 балла – более чем в 50% сосудов замедленный кровотоки, можно проследить движение отдельных форменных элементов крови; 4 балла – более чем в 80% микрососудов кровотоки нормальные, т.е. при движении эритроциты образуют однородную массу.

При помощи методов математической статистики с использованием пакета лицензионных прикладных программ «Statistica 5.0» определяли средние значения диаметра (мкм) всех сосудов исследуемого сегмента брыжейки по следующим функциональным группам: 1) артериолы; 2) метартериолы; 3) прекапилляры; 4) капилляры; 5) посткапиллярные венулы; 6) венулы. Среднее значение диаметра сосудов каждого функционального подразделения опре-

деляли при выборке, насчитывающей от 20 до 40 сосудов в каждой [5, 11].

Определяли среднее количество капилляров на площади исследуемого сегмента в 1 мм², средний диаметр и длину капилляров (мкм); рассчитывали площадь поверхности капилляров как поверхность цилиндра с заданным сечением по формуле (1) и занимаемую капиллярами площадь на исследуемом сегменте по формуле (2) [5]:

$$S_k = \pi \times D \times L \quad (1),$$

где S_k – площадь поверхности капилляров, мм²; D – средний диаметр капилляров, мкм; L – средняя длина капилляров, мкм;

$$S_c = S_k \times N_k \quad (2),$$

где S_c – площадь, занимаемая капиллярами на исследуемом сегменте, мм²; N_k – среднее количество капилляров на исследуемом сегменте, шт.

Достоверность различий между соответствующими показателями в интактной, контрольной и опытной группах оценивали с использованием t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что внутрижелудочное введение изониазида в дозе 542 мг/кг приводит к развитию внутрисосудистых нарушений и патологических реакций на уровне сосудистой стенки в брыжейке тонкой кишки крыс. Так, в контрольной группе животных через 1 ч после однократного введения изониазида при визуальном осмотре «окошек» брыжейки тонкой кишки в области собирающих вен и питающих артерий выявлено наличие кровоизлияний диаметром 4-5 мм. Среди комплекса изменений, выявленных биомикроскопически, было отмечено повышение по сравнению со здо-

ровыми животными извитости контуров резистивных сосудов, увеличение тока лимфы и скорости её движения, интенсивный диапедез форменных элементов крови вдоль венул и в непосредственной близости от них (рис. 2а). В метартериолах визуально определялось резкое снижение скорости движения крови, локальные зоны агрегации форменных элементов крови и признаки стаза; в прекапиллярах и капиллярах – сладж-синдром. При оценке по бальной шкале со-

стояние микроциркуляторных процессов составляло $18,2 \pm 0,5$ баллов (показатель в интактной группе – $20,0 \pm 0,0$). Морфометрия выявила увеличение диаметра посткапилляров и венул на 30,2% и 13,9% ($p < 0,05$) соответственно, относительно показателей животных интактной группы (см. табл. 1).

Через 24 ч при визуальном осмотре брыжейки кровоизлияний не обнаружено. При биомикроскопии в 40% наблюдений капилляры были выключены из

Таблица 1

Изменение диаметра сосудов микроциркуляторного русла брыжейки крыс на фоне интоксикации изониазидом и фармакологической коррекции

| Группа | Артериолы, мкм | Капилляры, мкм | Посткапиллярные венулы, мкм | Венулы, мкм |
|-------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| Интактная | $41,7 \pm 1,5$ | $7,1 \pm 1,0$ | $19,5 \pm 0,7$ | $44,0 \pm 1,8$ |
| через 1 ч после интоксикации | | | | |
| Контрольная | $40,1 \pm 1,2$ | $6,4 \pm 1,2$ | $25,4 \pm 1,9^*$ | $50,1 \pm 1,2^*$ |
| ЭФЛ | $41,4 \pm 1,4$ | $7,2 \pm 0,4$ | $20,6 \pm 1,5^{**}$ | $42,6 \pm 1,0^+$ |
| АМ | $41,6 \pm 2,0$ | $7,4 \pm 0,2$ | $19,7 \pm 1,1^{**}$ | $44,2 \pm 1,4^+$ |
| через 24 ч после интоксикации | | | | |
| Контрольная | $37,8 \pm 1,4$ | $8,2 \pm 0,3$ | $20,7 \pm 1,9$ | $46,5 \pm 2,4$ |
| ЭФЛ | $41,3 \pm 0,9^{**}$ | $6,25 \pm 1,1^{**}$ | $19,1 \pm 0,4$ | $49,5 \pm 0,9^*$ |
| АМ | $41,1 \pm 1,4^{**}$ | $8,2 \pm 1,0$ | $20,1 \pm 0,9$ | $52,4 \pm 0,1^{**}$ |
| 7-е сутки исследования | | | | |
| Контрольная | $59,2 \pm 1,5^*$ | $6,5 \pm 0,9$ | $27,5 \pm 1,4^*$ | $55,0 \pm 5,9^{**}$ |
| ЭФЛ | $46,8 \pm 1,9^{**}$ | $7,0 \pm 0,5$ | $20,2 \pm 1,0^+$ | $44,2 \pm 0,9^{**}$ |
| АМ | $42,1 \pm 1,8^+$ | $8,4 \pm 0,3^{**}$ | $19,4 \pm 0,8^+$ | $52,4 \pm 0,4^*$ |
| 10-е сутки исследования | | | | |
| Контрольная | $54,5 \pm 2,7^*$ | $6,8 \pm 0,6$ | $20,8 \pm 0,6$ | $45,2 \pm 1,4$ |
| ЭФЛ | $48,1 \pm 2,4^{***}$ | $6,5 \pm 0,6$ | $20,0 \pm 0,6$ | $46,4 \pm 1,8$ |
| АМ | $42,3 \pm 1,2^+$ | $9,2 \pm 0,4^{**}$ | $19,4 \pm 0,9$ | $51,2 \pm 0,8^{*+}$ |
| 14-е сутки исследования | | | | |
| Контрольная | $38,0 \pm 2,2$ | $6,2 \pm 1,25$ | $20,4 \pm 1,1$ | $45,0 \pm 1,1$ |
| ЭФЛ | $38,1 \pm 1,8$ | $7,1 \pm 0,6$ | $21,2 \pm 1,0$ | $47,8 \pm 2,6$ |
| АМ | $42,1 \pm 1,2^{**}$ | $8,3 \pm 0,8$ | $20,8 \pm 0,4$ | $46,2 \pm 1,4$ |

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (достоверность различий при сравнении с интактной группой);

+ – $p < 0,05$; ++ – $p < 0,01$ (достоверность различий при сравнении с контрольной группой).

кровотока за счет стаза, в перфузируемых капиллярах наблюдалось замедление тока крови, в связи с чем в поле зрения было отмечено увеличение количества артерио-венозных анастомозов, что свидетельствовало о функциональном перераспределении капиллярного кровотока. Среднее количество капилляров и занимаемая ими площадь на 1 мм² площади брыжейки были соответственно на 56,2% и 69,4% (p<0,01) выше показателя в группе интактных животных (см. табл. 2). Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло 18,5±0,5.

Шестикратное введение изониазида на 7-е сутки наблюдения сопровождалось наличием кровоизлияний в «окошках» брыжейки диаметром 4-5 мм и визуальным полнокровием магистральных сосудов. При биомикроскопии микроциркуляторное русло было развито преимущественно у стенок тон-

кой кишки, в прекапиллярах обнаружено снижение скорости движения крови, локальные зоны агрегации эритроцитов и стаза. В посткапиллярах и венах выявлены локальные зоны адгезии на стенках сосудов эритроцитов и замедление тока крови (рис. 2б), интенсивный диапедез форменных элементов крови, приводящий к обширным сливным геморрагиям. Среднее количество капилляров на 1 мм² площади брыжейки было меньше аналогичного показателя интактных животных в 1,8 раза (p<0,01), при этом более 50% капилляров были исключены из кровотока за счет стаза. Площадь, занимаемая капиллярами на 1 мм² площади брыжейки, была в 1,6 раза (p<0,01) меньше аналогичного показателя в группе интактных животных (табл. 2). Морфометрия выявила увеличение диаметра артериол на 42% (p<0,05) при неразвитости микроциркуляторного русла и увеличение диаметра

Таблица 2

Изменение количества и площади, занимаемой капиллярами в брыжейке крыс на фоне интоксикации изониазидом и фармакологической коррекции

| Группа | Период наблюдения | | | | |
|--|-------------------|--------------|-------------|--------------|---------------|
| | 1 ч | 24 ч | 7-е сутки | 10-е сутки | 14-е сутки |
| Количество капилляров на 1 мм ² , шт. | | | | | |
| Интактная | 80,0±11,2 | | | | |
| Контрольная | 62,5±14,4 | 125,0±20,1** | 43,7±23,9** | 35,0±13,69** | 62,5±13,6 |
| ЭФЛ | 75,0±17,7 | 72,5±15,0** | 50,0±17,7 | 60,0±13,7 | 65,0±13,7 |
| АМ | 85,0±22,4 | 74,0±13,4** | 80,0±12,5 | 83,3±12,9** | 106,2±12,5*** |
| Площадь (Sc), занимаемая капиллярами на исследуемом сегменте в 1 мм ² , мм ² | | | | | |
| Интактная | 0,36±0,08 | | | | |
| Контрольная | 0,28±0,07 | 0,61±0,12** | 0,23±0,01** | 0,21±0,04** | 0,26±0,08 |
| ЭФЛ | 0,37±0,14 | 0,30±0,09** | 0,26±0,12 | 0,27±0,10 | 0,30±0,11 |
| АМ | 0,36±0,03 | 0,37±0,08** | 0,41±0,15 | 0,53±0,16*** | 0,54±0,025*** |

Примечание: ** – p<0,01 – достоверность различий при сравнении с интактной группой; + – p<0,05; ** – p<0,01 (достоверность различий при сравнении с контрольной группой); *** – p<0,01 – достоверность различий при сравнении с препаратом ЭФЛ.

посткапилляров и венул соответственно на 41,0% ($p < 0,05$) и 25,0% ($p < 0,01$), относительно аналогичных показателей в интактной группе. Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло $17,0 \pm 1,25$. На 10-е сутки исследования общая картина нарушений носила сходный характер.

К 14-м суткам наблюдения при визуальном осмотре «окошек» брыжейки кровоизлияний не выявлено. При биомикроскопии микроциркуляторное русло развито хорошо, однако отмечалось увеличение тока лимфы и скорости её движения, периваскулярный отек. Вдоль артериол и венул и в непосредственной близости от них обнаружен интенсивный диапедез форменных элементов крови, у стенок прекапилляров и капилляров – кровоизлияния площадью $1,9-9,9 \times 10^{-3}$ мм² (рис. 2в). Контуры микрососудов всех звеньев микроциркуляторного русла характеризовались повышенной извитостью. В 20% наблюдений в метартериолах и венулах определялись адгезия и эритроцитарные агрегаты, отдельные зоны сосудов были

выключены из кровотока за счет стаза (рис. 2г). В капиллярах – признаки сладжа. Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло $19,0 \pm 0,4$.

Таким образом, введение изониазида в дозе 542 мг/кг в течение 6-ти суток сопровождалось внутрисосудистыми и сосудистыми нарушениями в брыжейке тонкой кишки, морфологическим проявлением которых являлись внутрисосудистая агрегация эритроцитов, стазирование и деструктивные изменения стенок магистральных и микрососудов, сопровождающиеся интенсивным диапедезом форменных элементов крови и кровоизлияниями. Следствием нарушения микроциркуляторных процессов является гипоксия, которая ведет к нарушению тканевого обмена и усугублению тяжести интоксикации.

Характер установленных нарушений согласуется с гемодинамическими нарушениям в печени на фоне острого токсического повреждения печени, индуцированного изониазидом [1], и свидетельствует, что в патогенезе интоксикации изониазидом важное значение

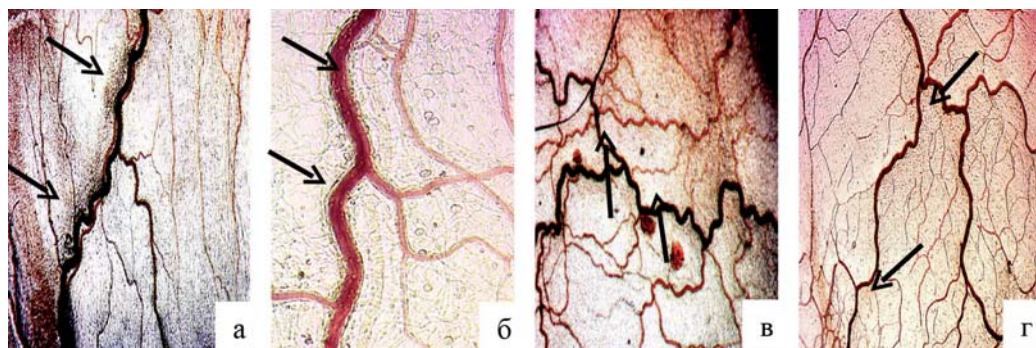


Рис. 2. Микроциркуляторное русло брыжейки тонкой кишки крыс на фоне острой интоксикации изониазидом. Биомикроскопия (а, в, г – ув. $\times 40$, б – ув. $\times 80$): а) диапедез форменных элементов крови; б) адгезия эритроцитов; в) кровоизлияния; г) локальные зоны стаза. Изменения показаны стрелками.

имеют возникающие изменения региональной микроциркуляции.

При биомикроскопии брыжейки животных опытной группы, получавших с профилактической целью эссенциальные фосфолипиды соевых бобов, через 1 ч после однократного введения изониазида отмечено повышение извитости контуров резистивных сосудов по сравнению со здоровыми животными, в 10% наблюдений в прекапиллярах и капиллярах наблюдались сладж и стазирование. Через 24 ч после воздействия изониазида в области метартериол было выявлено наличие кровоизлияний площадью $7,9-13,0 \times 10^{-3} \text{ мм}^2$, что не наблюдалось в контроле. 20% капилляров было выключено из кровотока, а в перфузируемых – отмечено замедление тока крови. Морфометрия выявила увеличение относительно показателей интакта и контроля диаметра прекапилляров на 23,4% и 32,8% соответственно ($p < 0,01$), увеличение диаметра венул относительно интакта на 12,5% ($p < 0,01$).

На 7-е сутки наблюдения картина микроциркуляторного русла не отличалась от таковой в контрольной группе животных. Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло $18,7 \pm 0,6$. Морфометрия выявила уменьшение относительно контроля диаметра артериол на 21,0% ($p < 0,05$), однако диаметр был выше показателя интакта на 12,2% ($p < 0,01$).

10-е сутки исследования сопровождались повышением извитости контуров сосудов микроциркуляторного русла, которое, так же как и в группе контроля, было развито преимущественно у стенки тонкой кишки в области магистральных сосудов. При этом диаметр артериол оставался достоверно

выше аналогичного показателя интакта (см. табл. 1). В 50% сетевых сосудов были выявлены локальные зоны сладжа, замедление тока крови. Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло $19,0 \pm 0,3$. На 14-е сутки наблюдалось сохранение тока крови во всех звеньях микроциркуляторного русла, однако, так же как и в группе контроля, отмечено наличие периваскулярного отека, увеличение тока лимфы и скорости её движения. В области метартериол и прекапилляров в 20% наблюдений было выявлено наличие кровоизлияний площадью $10,3 \times 10^{-3} \text{ мм}^2 - 21,8 \times 10^{-3} \text{ мм}^2$. Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло $19,3 \pm 0,2$.

Таким образом, применение эссенциальных фосфолипидов при интоксикации высокими дозами изониазида, по данным биомикроскопии, не сопровождалось значительным улучшением микроциркуляторных процессов. Однако следует отметить, что в отличие от контрольной группы, на протяжении всего периода исследования при наружном осмотре «окошек» брыжейки кровоизлияний выявлено не было, что свидетельствует о предотвращении деструкции стенок магистральных сосудов.

В опытной группе животных, получавших с целью профилактики токсического повреждения печени липофильные соединения, входящие в состав масла семян амаранта, в отличие от показателей контроля и животных опытной группы, получавшей эссенциальные фосфолипиды, через 1 ч после однократного введения изониазида при визуальном осмотре и биомикроскопии не было выявлено признаков наруше-

ний микроциркуляторного русла. Через 24 ч только в 10% наблюдений в капиллярах были выявлены признаки сладжа. Результаты морфометрии выявили увеличение диаметра венул на 19,0% ($p < 0,05$) и 12,7% ($p < 0,01$) относительно интактной и контрольной групп, соответственно. Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло 20, что соответствовало показателям нормы у здоровых животных интактной группы.

К 7-м суткам наблюдения микроциркуляторное русло брыжейки было хорошо выражено, контуры сосудов ровные, четкие. Капиллярное русло представлено мелкопетлистой равномерной сетью, в единичных капиллярах сохранялись локальные зоны сладжа. Количество баллов, характеризующих состояние микроциркуляторных процессов, составляло 20. Диаметр венул был выше такового в интактной группе на 19,0% ($p < 0,05$).

На 10-е сутки исследования среднее количество капилляров на 1 мм² площади брыжейки было в 2,4 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Площадь, занимаемая капиллярами, в 1,45 раза превышала показатель интактной группы (табл. 2). Морфометрия выявила увеличение диаметра капилляров относительно сходных показателей интактной и контрольной групп на 29,5% ($p < 0,01$) и 35,3% ($p < 0,05$) соответственно, венул – соответственно на 16,4% и 13,3% ($p < 0,05$), что свидетельствует об увеличении емкости кровеносного русла [5].

На 14-е сутки, на фоне введения масла семян амаранта, наблюдалось визуальное увеличение количества анастомозов и капилляров с ускоренным током

крови, при этом количество капилляров на 1 мм² было выше аналогичного показателя в интактной, контрольной и опытной группе, получавшей эссенциальные фосфолипиды, соответственно на 32,7%, 69,9% и 63,4% ($p < 0,01$), а площадь, занимаемая капиллярами, превышала показатель интактной группы в 1,5 раза ($p < 0,01$). Кроме того, на протяжении всего периода исследования, в отличие от контрольной группы, при наружном осмотре «окошек» брыжейки кровоизлияний выявлено не было.

Таким образом, введение с целью профилактики токсического повреждения печени липофильных соединений растительного происхождения, входящих в состав масла семян амаранта, предотвращало развитие внутрисосудистых и деструктивных нарушений и способствовало достоверному увеличению емкости кровеносного русла в 1,5 раза ($p < 0,01$). Выявленные особенности, наряду с доказанной гепатопротекторной и мембранопротекторной активностью, позволяют оптимизировать способ коррекции некоторых патогенетических звеньев нарушений, индуцированных изониазидом.

Выводы

1. Интоксикация изониазидом в дозе 542 мг/кг, наряду с нарушениями функции печени, вызывает выраженные расстройства микроциркуляторных процессов, такие как внутрисосудистая агрегация эритроцитов, стазирование, деструктивные изменения стенок магистральных и микрососудов, диapedез, кровоизлияния.

2. Применение эссенциальных фосфолипидов способствовало профилактике токсического повреждения пече-

ни, но не сопровождалось выраженным улучшением микроциркуляторных процессов, однако предотвращало развитие деструкции магистральных сосудов.

3. Введение липофильных соединений, входящих в состав масла семян амаранта, наряду с профилактикой токсического повреждения печени, предотвращало развитие деструкции стенок магистральных и микрососудов, способствовало нормализации реологических процессов и увеличению емкости кровеносного русла в 1,5 раза.

Список литературы

1. *Баласанияц Г.С., Суханов Д.С., Айзигов Д.Л.* Побочные действия противотуберкулезных препаратов и методы их устранения. - СПб: Тактик-Студио, 2011. 88 с.
2. *Борсуков А.В.* Эластография в клинической гепатологии. – Смоленск: Смоленская городская типография, 2011. 276 с.
3. *Бузлама А.В., Чернов Ю.Н., Сливкин А.И.* Патент РФ № 114147. Бюлл. № 7. 2012.
4. *Коришунов Д.А.* Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на метаболические процессы при экспериментальном повреждении печени потенциально гепатотоксическими лекарственными средствами: автореф. дис... канд. мед. наук. – Томск, 2010. 26 с.
5. *Куприянов В.В., Караганов Я.Л., Козлов В.И.* Микроциркуляторное русло. – М.: Медицина, 1975. 216 с.
6. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. - М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
7. *Музалевская Е.Н., Николаевский В.А., Бузлама А.В., Музалевская В.А.* Патент РФ № 2555136. Бюлл. № 19. 2015.
8. *Нигматуллина А.В., Бикмухаметова Х.С., Дашкина Э.И.* Микроциркуляторное русло соединительнотканых образований. – Уфа: Изд. Башкирского медицинского института, 1988. 92 с.
9. *Николаевский В.А., Золоедов В.И., Лобеева Н.В., Мирошниченко Л.А., Музалевская Е.Н.* Патент РФ № 2526172. Бюлл. № 23. 2014.
10. *Смирнова Е.А.* Протекторное действие глипролинов и семакса на стрессогенные нарушения микроциркуляции в брыжейке крыс: дис... канд. биол. наук. – М., 2004. 124 с.
11. *Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В.* Микроциркуляция. – М: Медицина, 1975, 456 с.

Method of the assessment of rats mesenterial microcirculatory bed disturbances caused by isoniazid

E.N. Muzalevskaya, V.A. Nikolaevsky, Yu.N. Chernov

By means of biomicroscopy, using the original method of rats small intestine mesentery microvascular monitoring in an abdominal cavity, the peculiarities of microcirculatory processes disturbances caused by high doses of isoniazid, are revealed for the first time and the possibility of it correction via administration of the phytoogenous lipophilic substances is proved.

Key words: intoxication, isoniazid, microcirculation, amaranth seed oil.

Электронно-микроскопическая характеристика клеток поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом и его коррекцией Эпадолом

О.В. Остапенко

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

Контактная информация: Остапенко Ольга Валериевна, stepashca@mail.ru

Проведено сравнительное исследование ультраструктуры клеток поджелудочной железы при экспериментальном гипотиреозе и после коррекции Эпадолом. Показано, что ультраструктурные изменения экзокринных клеток поджелудочной железы проявляются через 100 дней после тиреоидэктомии. Деструктивные изменения в клетках с гипотиреозом менее выражены при коррекции гормонозаместительными препаратами и Эпадолом.

Ключевые слова: ультраструктура, поджелудочная железа, гипотиреоз, Эпадол.

Введение

Значительный рост патологии щитовидной железы, в первую очередь – первичного гипотиреоза, обусловлен ухудшением экологического состояния окружающей среды, йододефицитом в ряде регионов, последствиями аварии на Чернобыльской атомной электростанции и др.

Тиреоидные гормоны принимают участие в процессах адаптации организма, влияя на соотношение анаболических и катаболических процессов в органах и тканях. В отличие от многих гормонов, которые имеют локальное действие на органы или ткани, тиреоидные гормоны характеризуются достаточно широким спектром действия. Под их контролем находятся почти все органы и ткани, все реакции метаболизма, общие энергозатраты и потребление кислорода. Эти гормоны влияют на рост, развитие организма и дифференцировку тканей до и после рождения [2].

Дисбаланс секреторных и инкреторных веществ поджелудочной железы может быть одним из вероятных патогенетических компонентов формирования и прогрессирования метаболического синдрома. Именно это требует дальнейшего изучения патогенетических механизмов формирования осложнений со стороны различных органов пищеварительной системы, а именно поджелудочной железы.

В настоящее время внимание многих ученых привлекают препараты омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), которые являются незаменимыми для человека. Во всем мире интенсивно проводятся фармакологические исследования ПНЖК, однако молекулярные механизмы их терапевтического эффекта окончательно не установлены, а при эндокринных заболеваниях, при гипотиреозе разного генеза, исследования практически отсутствуют. Современным аналогом ПНЖК является оте-

чественный препарат Эпадол, который имеет широкий диапазон действия [7].

Цель работы – изучить гистоструктуру поджелудочной железы при коррекции экспериментального послеоперационного гипотиреоза гормонозаместительными препаратами (L-тироксином и кальцитонином) и Эпадолом.

Материалы и методы

Материалом для исследования были фрагменты поджелудочной железы 36-ти белых крыс-самцов массой 160-220 г. Животные содержались в условиях вивария Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца (Киев, Украина) при постоянной температуре, естественном достаточном освещении, свободном доступе к пище и воде. Животные были разделены на две группы: первая – 100 суток после тиреоидэктомии (послеоперационный гипотиреоз) [6], вторая группа – животные, которые одновременно с гормонозаместительной терапией получали препарат Эпадол (произв. Киевского витаминного завода, Украина) в дозе 0,04 мг/кг в течение всего эксперимента (100 суток). Гормонозаместительная терапия: L-тироксин (произв. «Фармак», Украина) в дозе 10 мг/кг *per os*, Миакальцик (произв. «Noventus», Швейцария) в дозе 1,0 МЕ/кг.

Все эксперименты на животных были проведены с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Для контроля наличия гипотиреоза у экспериментальных животных определяли содержание свободного тироксина в плазме крови с помощью иммуноферментного анализа (прибор «Sunrise RC» фирмы «ТЕКАН»).

Одним из информативных методов оценки морфофункционального состояния поджелудочной железы является метод гистологического анализа, который обеспечивает объективную оценку микроморфологического статуса любого органа или ткани. Материал для общегистологических методик обрабатывали в парафиновой заливке, срезы окрашивали гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Для электронно-микроскопического исследования участок поджелудочной железы фиксировали раствором глутаральдегида на фосфатном буфере с дофиксацией в 1% растворе OsO₄ и обрабатывали согласно общепринятой для электронно-микроскопических исследований методике. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и фотографировали на электронном микроскопе ПЭМ-125К.

Результаты и их обсуждение

Результаты иммуноферментного анализа показывают достоверное снижение уровня свободного тироксина, что свидетельствуют о гипофункциональном состоянии тиреоидной системы крыс (табл.).

Таблица
Содержание свободного тироксина в плазме крови (пмоль/л)

| Контроль | Послеоперационный гипотиреоз |
|-----------|------------------------------|
| 8,58±0,72 | 2,24±0,14* |

Примечание: * – статистически достоверная разница по сравнению с контролем (p≤0,05).

Морфофункциональное состояние экзокринной части поджелудочной железы свидетельствует о негативном влиянии недостатка гормонов щитовидной железы. Структурные изменения клеток на ультраструктурном уровне приводят к функциональным изменениям органа в целом.

Паренхима экзокринной части поджелудочной железы представлена ацинусами, которые разобщены. Прослойки рыхлой соединительной ткани утолщены и формируют широкие, но не плотные прослойки между ацинусами. Ацинусы состоят из 3-4 клеток, плотно прилегающих друг к другу. Следует отметить, что 91% паренхимы представлено одноядерными клетками и лишь 9% – двоядерными. Цитоплазма большинства клеток характеризуется схожими чертами. В

базальной части клетки расположено 1 или 2 ядра, цистерны гранулярной эндоплазматической сети (ЭПС) укорочены и имеют расширения. В результате изменений ЭПС формирует небольшие цистерны и везикулы с электронно-светлым матриксом. Из-за хаотичного расположения мешочков, везикул и цистерн ЭПС комплекс Гольджи слабо визуализируется. Митохондрии крупные, матрикс умеренной электронной плотности (рис. 1).

В результате расслоения соединительнотканной прослойки капилляры оказываются на значительном расстоянии от ацинусов. Базальная мембрана утолщена. Ядра эндотелиоцитов образуют глубокие инвагинации, цитоплазма светлая и бедна органеллами. Однако микроиноцитозные пузырьки сохраняются (рис. 2).

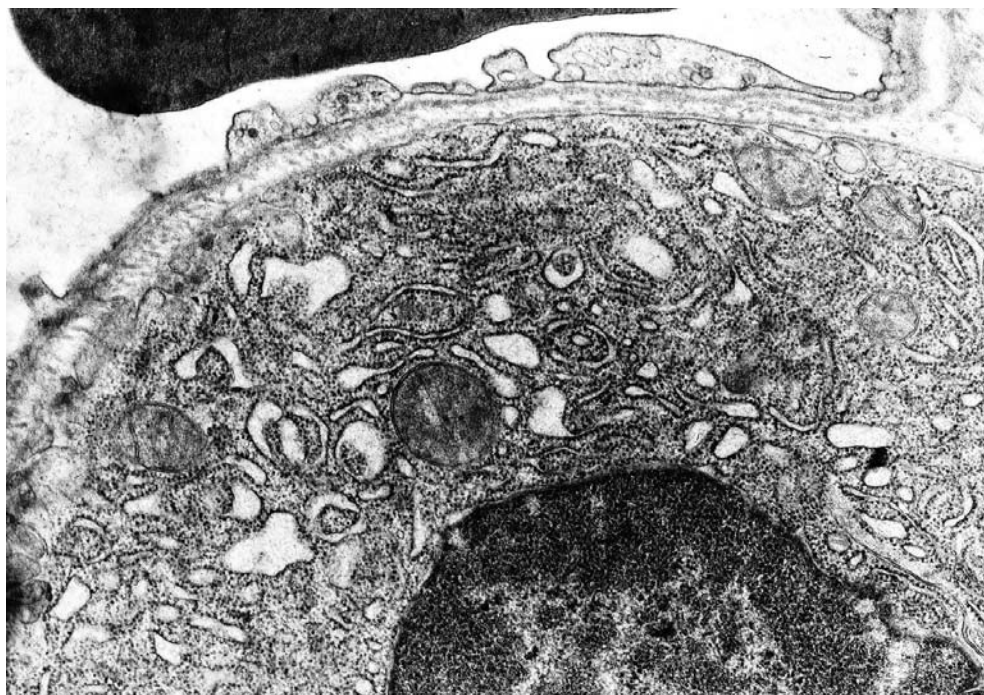


Рис. 1. Фрагмент экзокринной части поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом. Цитоплазма заполнена укороченными и расширенными цистернами грЭПС. Электронно-микроскопическая микрофотография. Ув. x1200.

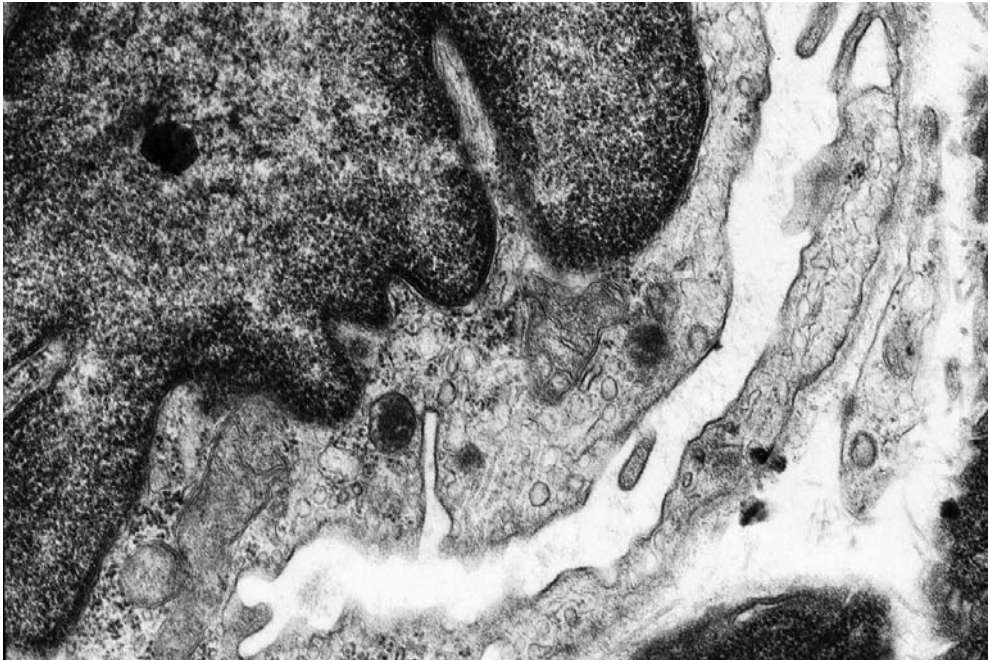


Рис. 2. Фрагмент капилляра в экзокринной части поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом. Утолщение базальной мембраны. Незначительное количество микропиноцитозных везикул в эндотелии капилляра. Электронно-микроскопическая микрофотография. Ув. x16000.

Поджелудочная железа животных, которые вместе с L-тироксинам и кальцитонином получали Эпадол, характеризуется улучшением структурно-функционального состояния.

Экзокринный аппарат составляет основную массу железы. Ацинусы имеют округлую или овальную форму и состоят из 5-10 ациноцитов. Каждый ацинус покрыт тонким слоем соединительной ткани, в котором содержатся клетки фибробластического ряда, сосуды, нервные волокна и окончания.

Паренхима поджелудочной железы характеризуется разнообразием клеточного состава. Она представлена одноядерными (93%) и двуядерными ациноцитами (7%). Соотношение одно-

ядерных клеток к двуядерным составляет 13:1, в то время как при гипотиреозе данное соотношение составляет лишь 10:1.

В связи с тем, что клетки поджелудочной железы находятся на разных фазах секреторного цикла, четко визуализируются темные и светлые ациноциты. Любая функционально активная железа характеризуется наличием клеток, цитоплазма которых имеет разную электронную плотность. Особенностью паренхимы животных, дополнительно получающих Эпадол, является наличие, наряду с одно- и двуядерными клетками, многоядерных ациноцитов. Количество ядер в таких структурах может быть 3-4 (рис. 3).

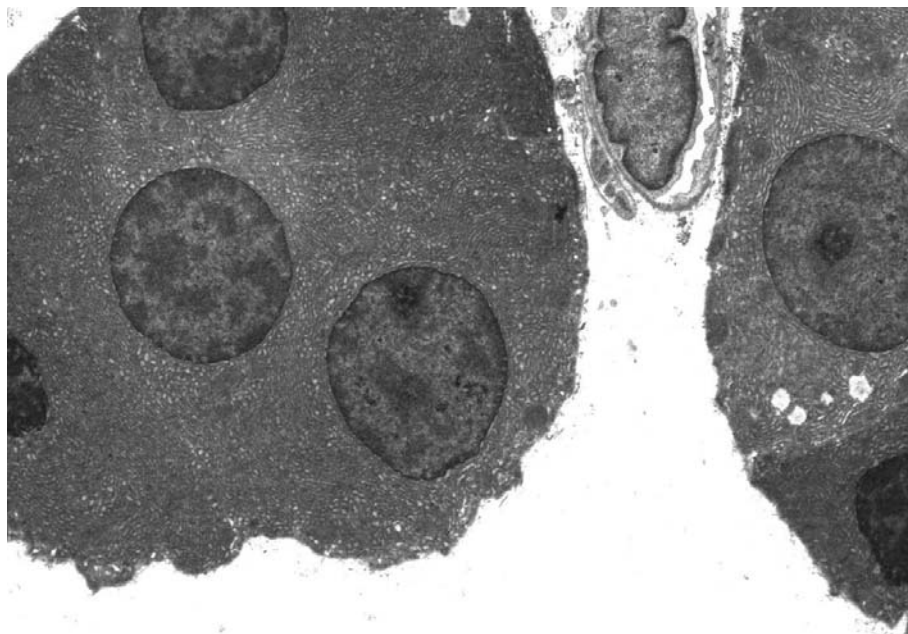


Рис. 3. Фрагмент экзокринной части поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом и гормонозаместительной терапией Эпадоллом. Ациноциты умеренной электронной плотности, содержащие 3 ядра. Электронно-микроскопическая микрофотография. Ув. x2400.

Большая часть цитоплазмы занята гранулярной ЭПС, цистерны которой формируют вокруг ядра системы канальцев, пузырьков и мешочков. Цистерны ЭПС несколько укорочены, однако значительных расширений, мешочков и везикул не образуют.

Диктиосомы комплекса Гольджи не расширены, имеют строение, характерное обычным, патологически не измененным, органеллам. Митохондрии средних размеров, умеренной электронной плотности. Кристы митохондрий хорошо сформированы, с параллельным расположением, и хорошо визуализируются на электронно-микроскопических микрофотографиях.

В апикальной части сконцентрированы зимогенные гранулы, размеры которых сильно варьируют. Следует

отметить, что электронная плотность большинства гранул одинаковая. Секреторные гранулы характеризуются умеренной электронной плотностью, что свидетельствует о завершении процесса синтеза и формирования содержимого гранул (рис. 4).

Эпадол способен оказывать влияние на патологические пути (циклооксигеназный, липооксигеназный), противовоспалительные медиаторы, а также подавлять выделение металлопротеиназ. Омега-3 ПНЖК, как субстрат для окисления в циклооксигеназном и липооксигеназном путях, способствует продукции простагландинов и лейкотриенов, которые имеют противовоспалительные свойства. Увеличение содержания омега-3 ПНЖК в фосфолипидах клеточных мембран сопровождается угнетением

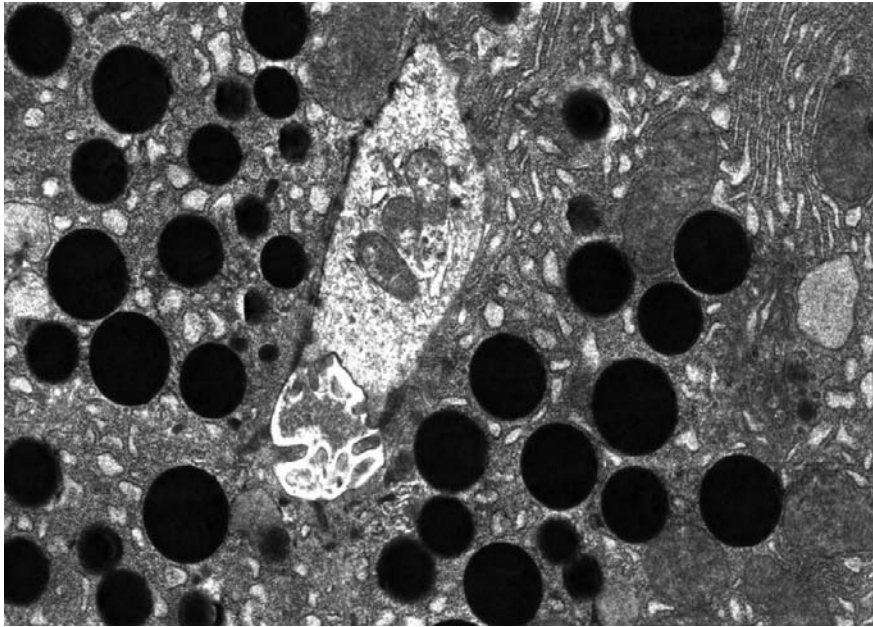


Рис. 4. Фрагмент апикальной части ациноцитов экзокринной части поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом и гормонозаместительной терапией Эпадоллом. Просвет ацинуса, заполненный содержимым. Скопление зрелых зимогенных гранул в апикальной части ациноцитов. Электронно-микроскопическая микрофотография. Ув. x8000.

продукции цитокинов, играющих ключевую роль в возникновении хронического воспаления [4].

Результаты исследований свидетельствуют о том, что омега-3 ПНЖК оказывают специфическое влияние на регуляторные механизмы, а также на коррекцию нарушенных процессов обмена веществ. Известно, что в условиях гипотиреоза даже на субклинической стадии возникает гиперлипидемия, вследствие замедления скорости распада липидов в результате снижения активности липопротеидлипаз, ухудшения транспорта и выведения липидов [3, 8].

Эндотелий капилляров остается утолщенным, но значительное количество микропиноцитозных пузырьков свидетельствует об активных обмен-

ных процессах, которые происходят между капилляром и экзокриноцитами (рис. 5).

Окислительный стресс, вследствие усиления процессов перекисного окисления липидов, приводит к снижению кислоторезистентности эритроцитов, в результате развивается нарушение микроциркуляции. За функциональными нарушениями микроциркуляции идут органические, которые характеризуются значительной распространенностью и охватывают периферическое и висцеральное сосудистое русло [1].

Морфологическая картина свидетельствует о наличии восстановительных процессов в поджелудочной железе экспериментальных животных при получении комплекса гормоно-

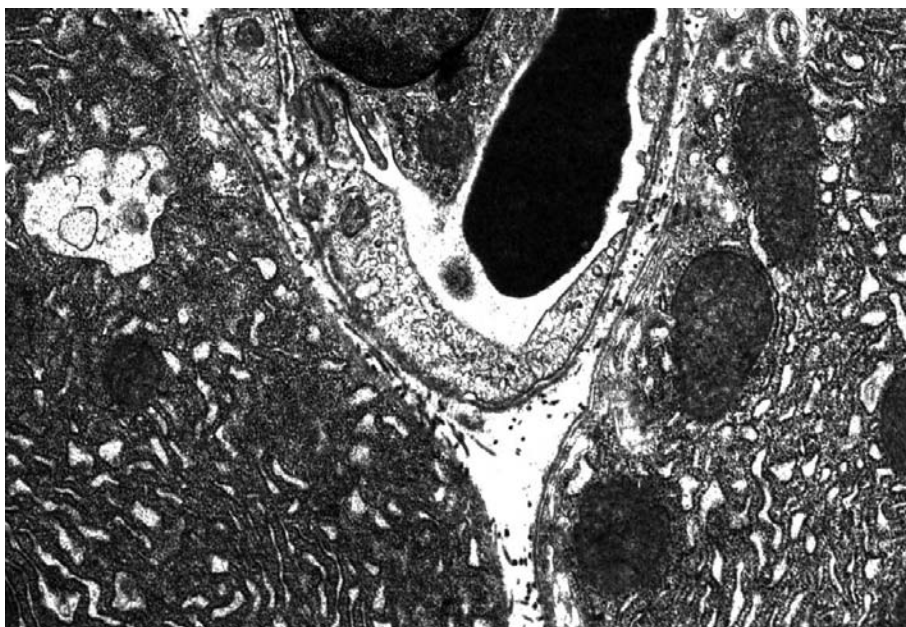


Рис. 5. Фрагмент ациноцитов и капилляра экзокринной части поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом и гормонозаместительной терапией Эпадоллом. Скопление большого количества микропиноцитозных везикул в эндотелии капилляра, прилегающего к базальной части ациноцитов. Электронно-микроскопическая микрофотография. Ув. x9600.

заместительной терапии и Эпадола. Однако не приводит к полному восстановлению морфофункционального состояния органа.

Выводы

Анализ полученного материала позволил заключить, что в результате недостатка гормонов щитовидной железы, вызванного её удалением, на сотые сутки эксперимента выявляются морфологические изменения паренхимы и стромы, экзокринной части поджелудочной железы, что, возможно, приводит к нарушению функционального состояния органа в целом.

Применение Эпадола в комплексе с гормонозаместительной терапией после тиреоидэктомии улучшает морфофунк-

циональное состояние клеток поджелудочной железы.

Эпадол способствует улучшению структуры кровеносных капилляров и активации в них процессов трансэндотелиального переноса веществ.

Список литературы

1. *Гогин Е.Е.* Микроциркуляция при ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии // *Терапевт. архив.* 2007. Т. 78. № 4. С. 5-9.
2. *Кандрор В.И.* Гормоны щитовидной железы: биосинтез и механизмы действия // *Рос. хим. журнал.* 2005. Т. XLIX. № 1. С. 75-83.
3. *Сыч Ю.П., Фадеев В.В., Мельниченко Г.А. и др.* Нарушение липидного обмена при субклиническом гипотиреозе // *Проблемы эндокринологии.* 2004. № 3. С. 48-52.
4. *Гринюк С.М.* Деякі особливості лікування псоріазу на сучасному етапі // *Ліки України.* 2008. № 5 (121). С. 69-70.

5. *Кириленко О.Є., Кукоба Т.В., Никула Т.Д.* Зміни перекісного окислення ліпідів у пацієнтів з ішемічною хворобою серця під впливом омега-3 поліненасичених жирних кислот // Атеросклероз і ішемічна хвороба серця: сучасний стан проблеми. Артеріальна гіпотензія як фактор ризику ІХС; профілактика ускладнень (мат. Пленуму правління українського наукового товариства кардіологів): Тез. науков. доповідей. - Київ. 2003. С. 81-82.
6. *Стеченко Л.О., Петренко В.А., Бик П.Л., Кузян В.Р., Куфтирева Т.П.* Спосіб моделювання гіпотиреозу у щурів // Патент № 27821, МПК G09B23/28 (2006.01). Офіційний бюлетень. 2007 р.
7. *Breslow J.L.* N-3 Fatty acids and cardiovascular disease // A. J. of Clinical Nutritio. 2006. Vol. 83. № 6. P. 1477-1482.
8. *Duntas L.H.* Thyroid disease and lipids // Thyroid. 2002. Vol. 12. P. 287-293.

The electron microscopic characteristics of cells in the pancreas of rats with postoperative hypothyroidism and its correction by Epadol

O.V. Ostapenko

A comparative study of the ultrastructure of cells of the pancreas under experimental hypothyroidism and after correction epadol. It was shown that ultrastructural changes of the exocrine pancreatic cells occur within 100 days after thyroidectomy. Destructive changes in cells with hypothyroidism are less pronounced in the correction of HRT and Epadol.

Key words: ultrastructure, pancreas, hypothyroidism, Epadol.



ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние трегалозы на сохранность мембран, подвижность и фрагментацию хроматина эпидидимальных сперматозоидов мышей при гипотермическом хранении в безэлектролитных средахД.А. Исаев¹, М.Ю. Мартынова¹, И.В. Володяев², А.О. Ревякин³

¹ – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства», Московская область

² – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

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

Контактная информация: к.б.н. Исаев Дмитрий Александрович, isaev@hotmail.ru

В работе представлены данные о гипотермическом хранении без замораживания эпидидимальных сперматозоидов мышей линии C57BL/6 в двух безэлектролитных консервантах на основе глюкозы и альбумина, один из которых содержал 50 мМ трегалозы. Трегалоза в составе консерванта значительно снижала относительное количество сперматозоидов с поврежденными мембранами после 14-ти суток хранения по сравнению с консервантом без трегалозы ($1,4 \pm 0,4\%$ и $8,2 \pm 1,2\%$ соответственно; $p=0,00$; $N=16$). В то же время, для обоих консервантов не установлены различия по способности сперматозоидов восстанавливать подвижность после хранения ($p=0,57$; $N=16$), а также по фрагментации хроматина ($p=0,69$; $N=12$). Эти наблюдения могут быть полезными при оптимизации методики гипотермического хранения спермы человека в репродуктивной медицине.

Ключевые слова: гипотермическое хранение спермы, безэлектролитная среда, трегалоза.

Введение

Гипотермическое хранение спермы без замораживания является альтернативой криоконсервации в случаях, когда длительное хранение не требуется, либо при отсутствии возможности глубокой заморозки. Независимость от криогенного оборудования и источника жидкого азота делает безопасной и удобной тран-

спортировку спермы. В репродуктивной медицине гипотермическое хранение спермы дает возможность пациенту-мужчине не присутствовать в день проведения процедуры экстракорпорального оплодотворения или внутриматочной инсеминации [1, 4].

В настоящее время технологии гипотермического хранения позволяют

поддерживать фертильность спермы в течение нескольких дней. Наиболее эффективным, очевидно, является предложенный группой исследователей Университета Йогогамы в конце 90-х гг. XX века способ хранения спермы при +4°C в т.н. безэлектролитной среде EFM, представляющей собой 0,32 М водный раствор глюкозы и 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) [16]. Этот подход позволяет сохранять фертильность спермы человека и мыши в течение, как минимум, двух недель [1, 8, 12-14]. Более высокая безопасность по сравнению с криоконсервацией и возможность применения этого метода в репродуктивной медицине убедительно продемонстрированы в работах [4, 15].

Существенным недостатком использования среды EFM является осмотический стресс, который клетки переживают в процессе консервации и ревитализации, и который приводит к поражению мембран сперматозоидов. Это усложняет методику, требуя постепенной медленной замены сред [1, 4] или применения для обработки спермы специального градиента на основе EFM [14, 17].

Известно, что невосстанавливающий дисахарид трегалоза, используемый в качестве криопротектора, способствует поддержанию целостности мембран сперматозоидов при осмотических перепадах [5]. Проведенные нами эксперименты показали, что трегалоза способствует лучшей сохранности мембран при гипотермическом хранении спермы осетровых рыб [3, 4]. Кроме того, трегалоза в качестве «осмотического буфера» позволяет добавлять консервант к суспензии клеток быстро и так же быстро заменять консервант на среду при ревитализации.

Целью нашей работы являлась оптимизация метода гипотермического хранения спермы путем введения трегалозы в состав безэлектролитной среды.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами и рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, ETS №123, Strasbourg, 1986). Протокол эксперимента одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

В исследовании использовано 16 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 6-8 недель массой 18-22 г. Эвтаназию мышей осуществляли путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Сперматозоиды выделяли из *cauda epididymidis* и прилежащего фрагмента *vas deferens* в каплях DPBS без Ca^{2+}/Mg^{2+} .

Каждый из 16-ти образцов спермы был разделен на 2 пробы по 25 мкл для гипотермического хранения в двух консервантах – безэлектролитной среде EFM [16] и консерванте ISGT, состоящем из 0,270 М глюкозы, 0,05 М трегалозы, 3% БСА и деионизованной воды. Пробы были помещены в пробирки типа Эппендорф в 500 мкл соответствующего консерванта и хранились в течение 14-ти суток при +4°C.

Для ревитализации спермы после гипотермического хранения отделяли консервант центрифугированием, ресуспендировали осадок в среде Menezo B2 и инкубировали в течение 30 мин при +37°C.

Подвижность спермы оценивали непосредственно после получения и после 14-ти суток гипотермического хранения путем подсчета сперматозоидов с поступательным движением. Для оценки повреждений мембран выполняли суправитальный тест с эозином. Анализ фрагментации хроматина до и после гипотермического хранения выполняли методом SCD-test [7], сперматозоиды с фрагментированной ДНК определяли по отсутствию окрашенного гало. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартная ошибка среднего.

Оценку различий в подвижности, фрагментации хроматина и повреждении мембран после хранения в двух консервантах проводили по парному Т-критерию Вилкоксона. Для выявления связи между показателями применяли непараметрический корреляционный

анализ Спирмена. Расчеты и подготовку иллюстративного материала выполняли с использованием пакета программ Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты и их обсуждение

Подвижность сперматозоидов

Исходная подвижность эпидидимальных сперматозоидов после выделения и инкубирования в течение 30 мин составила $43,6 \pm 2,9\%$ ($N=12$). Для 4-х образцов исходная оценка подвижности не проводилась. После 14-ти суток гипотермического хранения в средах EFM и ISGT и последующей ревитализации подвижность составила $31,1 \pm 2,5\%$ и $30,6 \pm 2,6\%$ ($N=16$) соответственно (рис. 1). Достоверных различий по восстановлению подвижности после гипотермического хранения в двух консервантах не выявлено ($T=50$, $N=16$, $p=0,57$).

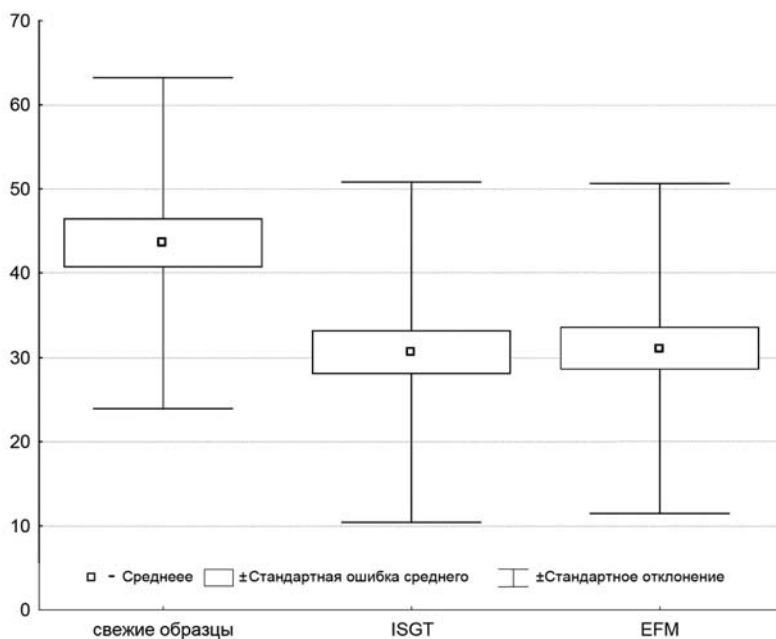


Рис. 1. Подвижность сперматозоидов мышей в свежих образцах и спустя 14 суток гипотермического хранения в консервантах ISGT и EFM.

Выявлена сильная положительная корреляция между исходной подвижностью спермы и подвижностью после хранения – как в EFM, так и в ISGT (для обоих консервантов $R=0,94$; $N=12$; $p=0,00$). Эти данные показывают, что способность к восстановлению подвижности, которая прогрессивно снижается в процессе хранения, зависит от исходного качества спермы.

S. Quan и соавт. [12] хранили эпидидимальную сперму гибридных мышей B6C3F1 в EFM в течение 14-ти суток. Предварительную обработку спермы проводили путем центрифугирования в градиенте Percoll, который удаляет большую часть неподвижных сперматозоидов, поэтому начальная подвижность спермы составляла около 70%. Спустя 14 суток гипотермического хранения в EFM до 15% сперматозоидов восстанавливали подвижность, но прогрессивно-подвижных сперматозоидов

при этом авторы не наблюдали. Способность спермы к оплодотворению снижалась в процессе хранения, и через 7 суток частота оплодотворения составила немногим более 50%, при этом лишь единичные эмбрионы (0,3%) развились до стадии бластоцисты [12].

В нашем исследовании подвижность восстанавливали около 30% сперматозоидов, при этом, в отличие от данных [12], подавляющее большинство подвижных сперматозоидов были определены нами как прогрессивно-подвижные (сперматозоиды с редкими колебательными движениями на месте при подсчете не учитывались). Возможно, использованный нами протокол консервации, который не исключает полностью присутствия ионов электролитов (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , бикарбонат), а лишь снижает их концентрацию в 40-50 раз, способствует лучшей сохранности подвижности.

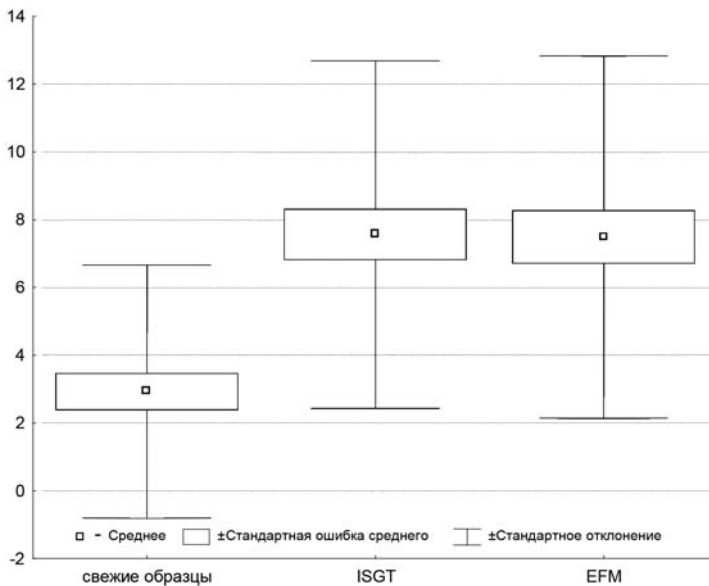


Рис. 2. Фрагментация хроматина в сперматозоидах мышей – индекс SDF (%) в свежих образцах и спустя 14 суток гипотермического хранения в консервантах ISGT и EFM.

Фрагментация хроматина

Индекс SDF, определенный в свежих образцах, составил $2,9 \pm 0,6\%$ ($N=12$). Спустя 14 суток хранения в EFM и ISGT индекс SDF составил соответственно $7,5 \pm 0,8\%$ и $7,6 \pm 0,8\%$ ($N=12$) (рис. 2). Достоверных различий по восстановлению подвижности после гипотермического хранения в двух консервантах не выявлено ($T=34$; $N=12$; $p=0,69$). Установлена корреляция между исходным индексом SDF и фрагментацией хроматина после хранения в EFM и ISGT ($R=0,76$, $N=12$, $p=0,04$ для EFM; $R=0,78$, $N=12$, $p=0,03$ – для ISGT).

Pérez-Cerezales и соавт. изучали фрагментацию ДНК в сперматозоидах мыши из *caput epididymidis* и *cauda epididymidis* методами TUNEL, comet assay, SCSA и SCD-test [11]. SCD-test был выполнен с использованием коммерческих наборов SPERM-HALOMAX-Mus-FF kit. Отличием этого протокола от примененного нами протокола [7] является отсутствие стадии денатурирующей обработки: таким образом, сперматозоиды с гало считаются носителями фрагментированной ДНК. TUNEL и SCD-test не выявили различий между фрагментацией ДНК в головке и хвосте эпидидимиса (не более 4%). По данным comet assay, в головке эпидидимиса $8,1 \pm 0,7\%$ и в хвосте эпидидимиса $5,5 \pm 0,3\%$ сперматозоидов с фрагментированной ДНК, различия достоверны. По данным SCSA, в головке $16,2 \pm 4,6\%$ и в хвосте $5,8 \pm 1,0\%$ сперматозоидов с фрагментированной ДНК, различия также достоверны. Методы comet assay и SCSA, по заключению авторов, более чувствительны по сравнению с TUNEL и SCD-test [11].

По данным С. Yildiz и соавт. [20], фрагментация ДНК эпидидимальной

спермы мышей линии C57BL/6, определенная методом SCSA, составляла $3,2 \pm 0,7\%$ ($N=8$). Частота фертилизации *in vitro* такой спермой была 68,3%, а до стадии бластоцисты развилось 78,3% эмбрионов. После криоконсервации в оптимально подобранном консерванте фрагментация ДНК для сперматозоидов мышей линии C57BL/6 составила $17,4 \pm 2,8\%$, при этом частота фертилизации была 38,7%, а до бластоцисты развились 40,2% эмбрионов [20]. Очевидно, что фрагментация ДНК, наряду с прочими факторами, является причиной снижения фертильности спермы и способности к нормальному доимплантационному развитию в условиях эксперимента *in vitro*. Тем не менее, такая сперма может считаться фертильной, а более высокая частота фертилизации может быть достигнута путем дополнительной обработки (сепарации) спермы.

Таким образом, полученные нами данные, с учетом чувствительности метода SCD-test и различия в протоколах, соответствуют аналогичным данным работы [11], а полученные значения SDF после двух недель гипотермического хранения соответствуют потенциально фертильной сперме [20].

Повреждения мембран

Относительное количество клеток с поврежденными мембранами после 14-ти суток хранения в EFM составило $8,2 \pm 1,2\%$, в ISGT – $1,4 \pm 0,4\%$ ($N=16$) (рис. 3). Эти различия достоверны ($T=0$; $N=16$; $p=0,00$) и явно указывают на лучшую сохранность мембран в консерванте с трегалозой. Примечательно, что не установлена корреляция между исходной подвижностью и повреждением мембран в процессе хранения как в среде EFM ($p=0,05$), так и в среде ISGT

($p=0,11$). В то же время, повреждения мембран в обоих консервантах коррелируют с SDF как свежих образцов ($R=0,85$ для EFM и $R=0,79$ для ISGT; $N=12$; $p=0,00$), так и с SDF после 14-ти суток хранения ($R=0,69$ для EFM, $p=0,01$; $R=0,59$ для ISGT, $p=0,04$; $N=12$). Повреждения мембран, как и фрагментированная ДНК, очевидно, являются атрибутами погибших клеток, присутствие которых значительно влияет на результаты, однако необходимо отметить, что для среды ISGT эта корреляция ниже, чем для EFM.

В упомянутой выше работе [20] после размораживания спермы мышей линии C57BL/6 лишь $28,6 \pm 2,1\%$ ($N=15$) сперматозоидов сохранили интактные мембраны. Авторы определяли повреждения мембран путем двойного флуоресцентного окрашивания йодистым пропидием (PI) и красителем SYBR-14

[18]. Мы применяли суправитальное окрашивание эозином, которое, по заключению L.F. Brito и соавт. [6], дает завышенную оценку числа сперматозоидов с интактными мембранами по сравнению с флуоресцентной окраской SYBR-14/PI. A. Wysokińska и S. Kondracki [19] применяли оба этих метода в исследовании со спермой хряков. Принимая во внимание сходные результаты других исследователей, авторы делают вывод о достаточной эффективности «классического» метода окраски эозином/нигрозином на основании высокой положительной корреляции между результатами двух методов [19].

Свойство трегалозы поддерживать сохранность клеточных мембран при осмотических перепадах успешно используется при криоконсервации спермы позвоночных [5], а также при хранении спермы в обезвоженном состоянии

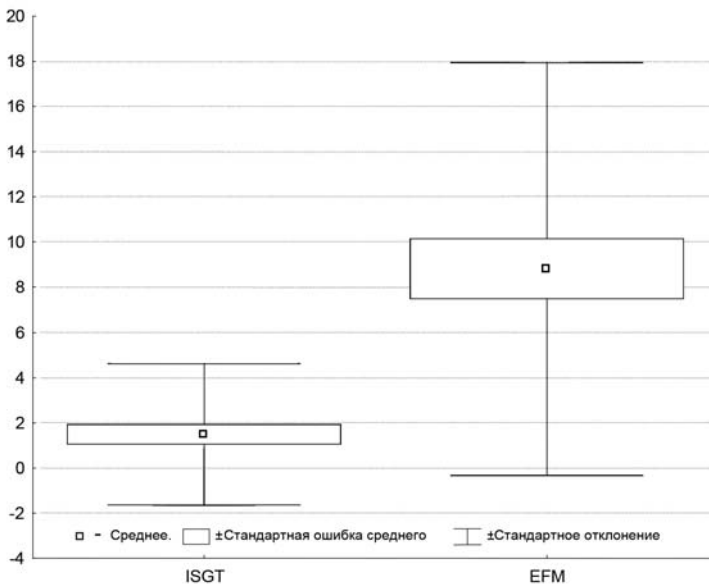


Рис. 3. Относительное количество (%) сперматозоидов с поврежденными мембранами спустя 14 суток гипотермического хранения в консервантах ISGT и EFM.

без замораживания [9, 10]. Полагая, что снижение жизнеспособности спермы при гипотермическом хранении в значительной мере связано с повреждениями мембран, как в процессе хранения, так и в ходе осмотических перепадов при манипуляциях [1], мы ввели в состав безэлектролитного консерванта трегалозу путем частичной замены глюкозы. Снижение концентрации глюкозы до 270 мМ, а также добавление «осмотического буфера» – трегалозы – позволило быстро разбавлять сперму консервантом и так же быстро заменять консервант на культуральную среду при ревитализации. Не исключено, что такое упрощение методики и сокращение времени манипуляций дополнительно способствуют лучшей сохранности спермы.

Заключение

Настоящее исследование с использованием эпидидимальных сперматозоидов мыши показало, что введение трегалозы в состав безэлектролитного раствора для гипотермического хранения значительно улучшает сохранность клеточных мембран, не оказывая видимого влияния на способность к восстановлению подвижности и фрагментацию хроматина. Мы не проводили исследования фертильности сперматозоидов, а также теста на связывания с гиалуронатом или способности дезагрегировать кумулюс, тем не менее, низкий уровень фрагментации ДНК и относительно высокая способность к восстановлению подвижности (с учетом исходной подвижности) соответствуют фертильной сперме и свидетельствуют о репродуктивной безопасности метода. Таким образом, результаты данного исследования могут быть использова-

ны при разработке и/или оптимизации технологий гипотермического хранения спермы человека в репродуктивной медицине.

Список литературы

1. *Исаев Д.А., Заева В.В., Бакурадзе Р.В. и др.* Хранение спермы человека в течение 2 недель без замораживания // Проблемы репродукции. 2009. V. 5. P. 33-35.
2. *Исаев Д.А., Мартынова М.Ю., Шишанова Е.И. и др.* Гипотермическое хранение спермы осетровых рыб в изотонических растворах // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2013. № 10. С. 41-49.
3. *Исаев Д.А.* Гипотермическое хранение спермы стерляди в консервантах на основе трегалозы: предварительное исследование // В сб.: «Перспективы и проблемы развития аквакультуры в составе АПК»: Материалы Всероссийской научно-практической конференции (Москва, ВВЦ, 4-6 февраля 2014 г.) / ГНУ ВНИИР. - М.: Перо, 2014. С. 131-137.
4. *Исаев Д.А., Захарова Е.Е., Капралова И.В. и др.* Краткосрочное хранение спермы без замораживания в программах ЭКО/ИКСИ // Проблемы репродукции. 2015. № 4. С.65-70.
5. *Ahmad E., Aksoy M.* Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: a mini review // Animal health, prod. and hyg. 2012. V. 1. P. 123-129.
6. *Brito L.F., Barth A.D., Bilodeau-Goeseels S., et al.* Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate // Theriogenology. 2003. V. 60. P. 1539-1551.
7. *Fernández J.L., Muriel L., Rivero M.T., et al.* The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation // J. Androl. 2003. V. 24. P. 59-66.
8. *Kanno H., Saito K., Ogawa T., et al.* Viability and function of human sperm in electrolyte-free cold preservation // Fertil. steril. 1998. V. 69. P. 127-131.
9. *Keskintepe L., Eroglu A.* Freeze-drying of mammalian sperm // Methods mol. biol. 2015. V. 1257. P. 489-497.
10. *McGinnis L.K., Zhu L., Lawitts J.A., et al.* Mouse sperm desiccated and stored in trehalose

- medium without freezing // Biol. reprod. 2005. V. 73. P. 627-633.
11. *Pérez-Cereales S., Miranda A., Gutiérrez-Adán A.* Comparison of four methods to evaluate sperm DNA integrity between mouse caput and cauda epididymidis // Asian J. Androl. 2012. V. 14. P. 335-337.
 12. *Quan S., Yamano S., Nakasaka H., et al.* Effects of preservation of mouse spermatozoa in electrolyte-free solution at 4 degrees C on the outcome of mouse in vitro fertilization // J. Assist. reprod. genet. 2000. V. 17. P. 388-392.
 13. *Quan S., Zhou H.K., Shuji Y., et al.* Fertilizing capacity of human sperm preserved in cold electrolyte-free solution // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2002. V. 22. P. 928-930.
 14. *Riel J.M., Huang T.T., Ward M.A.* Freezing-free preservation of human spermatozoa – a pilot study // Arch. Androl. 2007. V. 53. P. 275-284.
 15. *Riel J.M., Yamauchi Y., Huang T.T., et al.* Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation // Biol. reprod. 2011. V. 85. P. 536-547.
 16. *Saito K., Kinoshita Y., Kanno H., et al.* A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 °C // Fertil. steril. 1996. V. 65. P. 1210-1213.
 17. *Saito K., Kinoshita Y., Yumura Y., et al.* Effects of extracellular ions on the reactivation of human spermatozoa preserved in electrolyte-free solution // Andrologia. 1999. V. 31. P. 211-215.
 18. *Songsasen N., Leibo S.P.* Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa // Cryobiology. 1997. V. 35. P. 240-254.
 19. *Wysokińska A., Kondracki S.* Assessment of changes in sperm cell membrane integrity occurring during the storage of semen from genetically different males using two diagnostic methods // Canadian J. of animal science. 2014. V. 94. P. 601-606.
 20. *Yildiz C., Ottaviani P., Law N., et al.* Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse // Reproduction. 2007. V. 133. P. 585-595.

Effect of trehalose on the safety membrane, motility and epididymal sperm chromatin fragmentation mice during hypothermic storage in electrolyte-free buffer

D.A. Isaev, M.Yu. Martynova, I.V. Volodyaev, A.O. Revyakin

This work presents data on hypothermic storage without freezing of epididymal sperm of C57BL/6 mice in two electrolyte-free preservative buffers based on glucose and albumin, one of them supplied with 50 mM trehalose. The adding of trehalose in preservative buffer brought down significantly percentage of spermatozoa with damaged membrane after 14 days of storage as compared to solution without trehalose ($1.4 \pm 0.4\%$ vs $8.2 \pm 1.2\%$; $p=0.00$; $N=16$). At the same time, there were no differences between two buffers in the ability of sperm to regain motility after storage ($p=0.57$; $N=16$) as well in the chromatin fragmentation ($p=0.69$; $N=12$). Our findings might be useful for optimization of hypothermic storage protocol for human sperm in reproductive medicine.

Key words: hypothermic sperm storage, electrolyte-free buffer, trehalose.

Энтеральное введение трибутирина как компонента нутритивной поддержки в коррекции нарушений электрической активности тонкой кишки при экспериментальной эндотоксемии

Е.А. Кислякова, Н.С. Тропская, Т.С. Попова

ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Контактная информация: Кислякова Екатерина Александровна, kisliakovakatia@mail.ru

Исследована электрическая активность тонкой кишки крыс, которым внутривенно вводили 200 мг/кг липополисахарида *E. coli*. Показано, что нарушения в генерации мигрирующего миоэлектрического комплекса наблюдаются на протяжении 96-ти ч после введения липополисахарида. Применение энтерального введения трибутирина укорачивало общие сроки восстановления мигрирующего миоэлектрического комплекса до 48-ми ч.

Ключевые слова: трибутирин, мигрирующий миоэлектрический комплекс, тонкая кишка, эндотоксемия.

Введение

Известно, что мигрирующий миоэлектрический комплекс (ММК) является основным маркером электрической активности тонкой кишки у здоровых животных. Период цикла ММК составляет 90-120 мин у человека и собак и 10-20 мин – у крыс [10]. Цикл ММК имеет три фазы. Фаза I (покоя) характеризуется относительным отсутствием спайковых потенциалов по сравнению с другими фазами, что соответствует отсутствию сократительной активности. В фазу II (нерегулярной активности) происходит увеличение интенсивности спайковых потенциалов, но они регистрируются не на каждой медленной волне. В эту фазу наблюдаются сегментирующие и маятникообразные сокращения. Фаза III (регулярной, ритмической активности)

характеризуется внезапным и стабильным появлением пачек высокоамплитудных спайковых потенциалов на каждой медленной волне. Фаза III соответствует пропульсивной перистальтике. Окончание фазы III характеризуется внезапным исчезновением пачек спайковых потенциалов [10]. Соотношение фаз ММК при различных патофизиологических ситуациях претерпевает множественные изменения, вплоть до исчезновения фаз.

При экспериментальной эндотоксемии, вызванной внутривенным введением липополисахарида (ЛПС) *E. coli*, наблюдаются существенные нарушения электрической активности тонкой кишки. Так, в работе J. Cullen и соавт. [1] показано, что введение ЛПС *E. coli* (0,2 мг/кг, в/в) собакам приводило к исчезновению ММК в течение двух суток.

В настоящее время накоплено достаточное количество фактов, свидетельствующих о том, что в механизмах нарушений моторики тонкой кишки при эндотоксемии принимают участие NO-зависимые процессы: NO – как ключевой фактор в генерации воспалительного ответа и NO – как основной тормозный нейротрансмиттер в кишечнике. Как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях показано, что уровень NO повышен при сепсисе и системной воспалительной реакции [7]. Внутривенное введение ЛПС вызывает усиление генерации NO активированными макрофагами в мышечной оболочке кишечника, что приводит к подавлению сократительной активности гладких мышц [2, 3]. В экспериментах на крысах показано, что при эндотоксемии макрофагальная iNOS играет важную роль в подавлении сокращений циркулярных гладких мышц кишечника. Уже через 3 ч после введения ЛПС происходило увеличение экспрессии мРНК iNOS в 20 раз [3]. Кроме того, высвобождение NO из нейрональной NOS – как в энтеральной нервной системе, так и в ЦНС – оказывает влияние на ЛПС-индуцированное нарушение моторики. Так, E. Quintana и соавт. [8, 9] показали увеличение синтеза NO не только в постганглионарных нейронах миэнтерального сплетения на ранней стадии эндотоксемии у крыс (30 мин после инъекции ЛПС), но и увеличение мРНК в n-NOS в дорсальном моторном ядре блуждающего нерва через 2 ч после введения ЛПС.

Таким образом, NO, являясь ключевым фактором в генерации воспалительного ответа и основным ингибиторным нейротрансмиттером, оказывает существенное тормозное влияние на моторику кишечника при эндотоксемии.

Физиологичным способом активации противовоспалительного пути, реализуемого при участии вегетативной нервной системы, являются энтеральные инфузии [6]. Входящие в их состав специальные жировые компоненты активируют вегетативную нервную систему через афферентные волокна блуждающего нерва посредством высвобождения нейроэндокринных гормонов [4, 11]. В экспериментах на крысах при моделировании послеоперационных нарушений моторики кишечника была показана эффективность энтерального введения раствора, обогащенного липидами, что объяснялось активацией афферентных волокон блуждающего нерва через холецистокининовые X₁С-рецепторы [5].

Введенный в современные фармаконутриентные смеси трибутирин является структурированным липидом, состоящим из трех молекул бутирата, эстерифицированных глицеролом. В желудке и тонком кишечнике трибутирин гидролизует липазой до бутирата (короткоцепочечной жирной кислоты) и глицерола. Экспериментальных исследований, посвященных трибутирину, немного. Однако немногочисленные публикации убедительно свидетельствуют о том, что энтеральное введение трибутирина приводит к уменьшению продукции провоспалительных цитокинов и NO [12]. В связи с этим, мы предположили, что энтеральное введение трибутирина может способствовать восстановлению моторики тонкой кишки.

Целью настоящего исследования явилась оценка роли трибутирина в коррекции моторных нарушений тонкой кишки при экспериментальной эндотоксемии, вызванной внутривенным введением ЛПС *E. coli*.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 10-ти крысах-самцах популяции линий Wistar средней массой 400 г. Протокол исследований был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Для предварительной оперативной подготовки крыс в качестве наркоза использовали 5% раствор кетамина, который вводили внутривенно из расчета 0,3 мл на 100 г массы тела. Во время операции проводили срединную лапаротомию, вживляли зонд в начальную часть тощей кишки (10 см дистальнее связки Трейтца) и два игольчатых электрода: один в стенку средней части двенадцатиперстной кишки (ДПК), другой – в стенку тощей кишки (15 см дистальнее связки Трейтца). После фиксации зонд и электроды проводили через мягкие ткани брюшной стенки и тазовой области и затем с помощью специального инструмента протаскивали под кожей хвоста и выводили наружу.

Эксперименты выполняли через 7-10 дней после операции. Основанием для начала экспериментов являлось появление ММК, распространяющегося из ДПК в тощую кишку при регистрации электромиограмм (ЭМГ). После 18-часовой пищевой депривации регистрировали фоновую электрическую активность тонкой кишки. Затем крысам внутривенно вводили 200 мкг/кг липополисахарида *E. coli* serotype 055:B5. Опыты проводили в первые четверо суток после введения ЛПС.

Животные были распределены на две группы: первая – контрольная, n=5; вторая – с введением трибутирина, n=5. Животным контрольной группы через 1, 6 и 12 ч после инъекции ЛПС *E. coli* вводили внутрикишечно однократно физиологический раствор в объеме 0,2

мл. Животным опытной группы в эти же сроки было выполнено внутрикишечное введение 0,2 мл раствора трибутирина в дозе 10 мг/кг (Acros Organics, Бельгия).

Каждому животному обеих групп сначала натошак выполнялась фоновая запись электрической активности тонкой кишки в течение 1 ч. Затем внутрикишечно через зонд вводился тестируемый раствор, и электрическая активность регистрировалась еще 2 ч.

Записи электрической активности тонкой кишки проводились с использованием электронного энцефалографа NVX-52 в полосе от 0,1 до 30 Гц. Проводилась компьютерная обработка выходного сигнала. При обработке данных производили фильтрацию сигналов в полосе 5-30 Гц для выявления спайковой активности. Оценивали процент длительности каждой из фаз ММК. Все данные представляли как медиану и перцентили – Me (25; 75)%. Для статистического анализа использовали непараметрический критерий – ранговый дисперсионный анализ по Фридману (Friedman-ANOVA).

Результаты и их обсуждение

В контрольной группе животных в фоновых записях регистрировался ММК, распространяющийся из ДПК в тощую кишку (рис. 1). Процент длительности каждой из фаз ММК составлял для ДПК: фаза I – 28,1 (26,5; 28,3), фаза II – 56,6 (56,4; 57,3), фаза III – 15,3 (15,2; 16,9), для тощей кишки: фаза I – 33,4 (32,5; 39,6), фаза II – 47,9 (39,1; 49,0), фаза III – 16,2 (13,4; 17,6).

В 1-й ч после введения ЛПС наблюдалось исчезновение фазы III ММК (как в ДПК, так и в тощей кишке), что свидетельствовало об исчезновении нормальной пропульсивной перистальтики. При

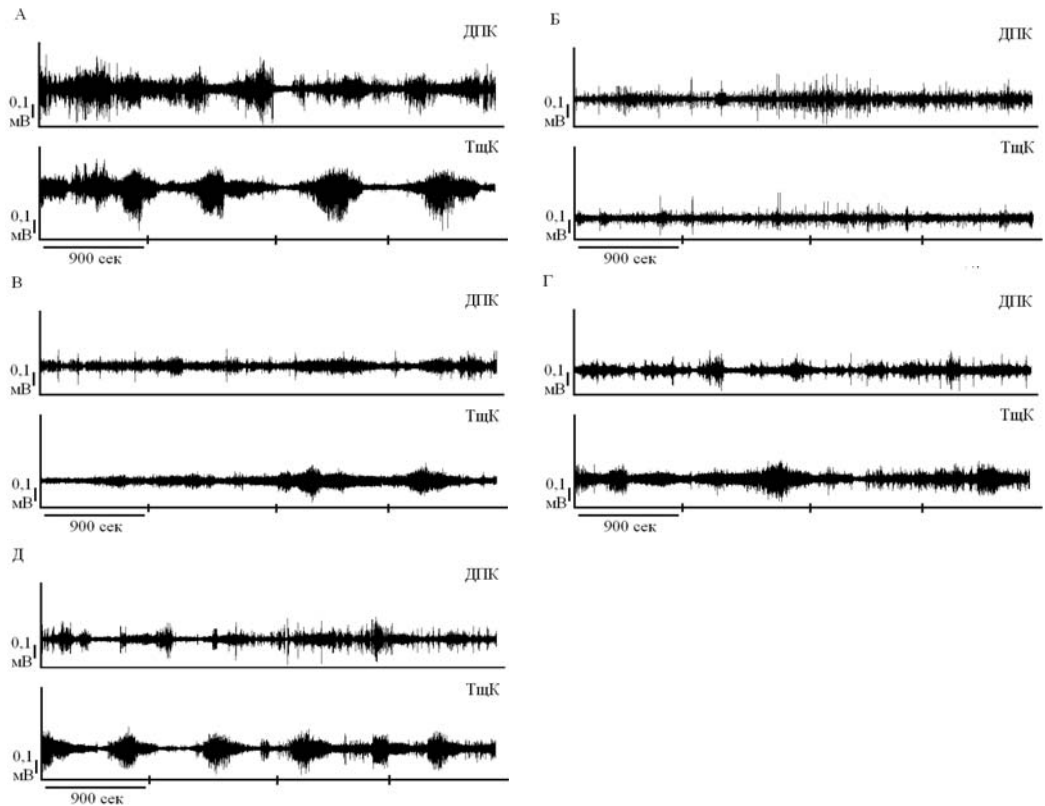


Рис. 1. Динамика изменений электрической активности двенадцатиперстной (ДПК) и тощей (ТюК) кишок при эндотоксемии (контрольная группа). А – фоновая запись; Б – 1-й ч после введения ЛПС *E. coli*; В – 12-й ч после введения ЛПС *E. coli*; Г – 48-й ч после введения ЛПС *E. coli*; Д – 96-й ч после введения ЛПС *E. coli*.

этом в ДПК длительность нерегулярной активности повышалась, а в тощей кишке увеличивалась продолжительность периодов покоя. Однако эти изменения не были статистически значимыми ($p > 0,05$). Кроме того, наблюдалось появление патологических паттернов моторики – гигантских мигрирующих сокращений (ГМС) и эпизодов спастической активности в обоих участках тонкой кишки. При введении физиологического раствора в тощую кишку на электромиограммах ДПК и тощей кишки не наблюдалось какой-либо выраженной реакции.

На 6-й ч после введения ЛПС в обоих

участках тонкой кишки выявлялись ГМС и спастическая активность; у трех из пяти животных наблюдалось появление единичных фаз III ММК различной длительности. В ДПК длительность нерегулярной активности снижалась до фонового уровня и составляла 53,2 (46,8; 67,6)% ($p > 0,05$), а в тощей кишке была статистически значимо ниже нормы – 25,3 (13,3; 27,4)% ($p < 0,05$). Кроме того, в тощей кишке продолжительность покоя увеличивалась по сравнению с фоном – 69,3 (67,6; 80,9)% ($p < 0,05$). На 12-й ч после введения ЛПС динамика электрической активности в ДПК не претерпевала существенных

изменений, в то время как в тощей кишке параметры ММК изменялись разнонаправленно. Через 24 ч после введения ЛПС в ДПК преобладала нерегулярная активность, в тощей кишке регистрировались все фазы комплекса. При этом у двух из пяти животных наблюдались редкие эпизоды спастической активности. Через 48 ч в ДПК динамика параметров ММК не изменилась, а в тощей кишке регистрировались все фазы ММК нормальной продолжительности. Через 96 ч в ДПК и в тощей кишке длительность покоя составляла 22,1 (21,4; 38,6)% и 36,9 (36,7; 37,5)%, нерегулярной активности – 54,7 (50,6; 68,3)% и 46,6 (42,0; 47,8)%,

регулярной активности – 10,3 (9,1; 14,2)% и 16,1 (15,3; 16,6)% соответственно, что статистически значимо не отличалось от нормы ($p>0,05$). Таким образом, восстановление распространяющегося ММК из ДПК в тощую кишку наблюдалось через 96 ч после введения ЛПС.

В опытной группе в фоновых записях регистрировался ММК, распространяющийся из ДПК в тощую кишку (рис. 2, 3). Процент длительности каждой из фаз ММК составлял для ДПК: фаза I – 29,0 (17,5; 37,0), фаза II – 53,3 (49,3; 60,7), фаза III – 21,8 (15,2; 21,8), для тощей кишки: фаза I – 38,8 (33,2; 49,3), фаза II – 47,3 (38,6; 52,4), фаза III – 13,9 (13,5; 14,4).

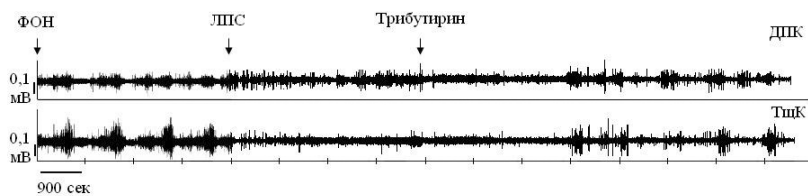


Рис. 2. Влияние энтерального введения трибутирина на электрическую активность двенадцатиперстной (ДПК) и тощей (ТщК) кишок через 1 ч после введения ЛПС *E. coli*.

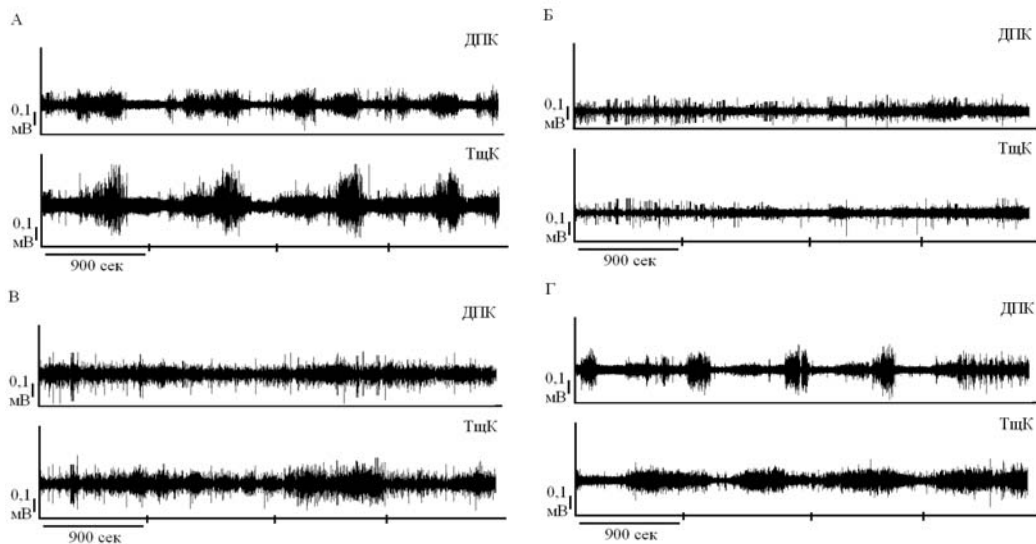


Рис. 3. Влияние энтерального введения трибутирина на динамику изменений электрической активности двенадцатиперстной (ДПК) и тощей (ТщК) кишок при эндотоксемии (опытная группа). А – фоновая запись; Б – 1-й ч после введения ЛПС *E. coli*; В – 12-й ч после введения ЛПС *E. coli*; Г – 48-й ч после введения ЛПС *E. coli*.

В 1-й ч после введения ЛПС наблюдалось исчезновение фазы III ММК – как в ДПК, так и в тощей кишке. При этом в ДПК длительность нерегулярной активности повышалась, а в тощей кишке увеличивалась продолжительность периодов покоя. Однако эти изменения, как и в контрольной группе, не были статистически значимыми ($p > 0,05$). Кроме того, наблюдалось появление патологических паттернов моторики – ГМС и эпизодов спастической активности в обоих участках тонкой кишки. При введении трибутирина в тощую кишку на ЭМГ ДПК и тощей кишки значимые изменения появились к концу 1-го часа. Так, на ЭМГ ДПК и тощей кишки появилась фаза III нормальной длительности, которая возникала в ДПК и через 60 с распространялась в тощую кишку. На 2-й ч после введения трибутирина регистрировались 2-4 ММК, распространяющихся из ДПК в тощую кишку, при этом общая продолжительность всех фаз в обоих отделах не отличалась от нормы, однако количество фаз III было ниже нормы. Особо следует отметить, что после введения трибутирина исчезали патологические паттерны – ГМС и спастическая активность.

Через 6 и 12 ч после введения ЛПС до введения трибутирина наблюдались все фазы ММК в обоих отделах тонкой кишки, однако их продолжительность отличалась от нормы. После введения трибутирина в эти сроки на ЭМГ ДПК и тощей кишки выявлялось увеличение длительности фазы II и уменьшение длительности фазы I. При этом длительность фаз III практически не изменялась. Через 48 ч в ДПК и тощей кишке длительность покоя составляла

22,7 (21,8; 28,5)% и 48,1 (24,9; 53,8)%, нерегулярной активности – 66,3 (58,5; 74,2)% и 32,2 (32,0; 46,0)%, регулярной активности – 13,0 (12,0; 14,9)% и 19,7 (14,2; 21,6)% соответственно, что статистически значимо не отличалось от нормы ($p > 0,05$). Таким образом, через 48 ч после введения ЛПС наблюдалось восстановление распространяющегося ММК из ДПК в тощую кишку с нормальной продолжительностью фаз.

Заключение

Результаты наших исследований показали, что при эндотоксемии имеют место выраженные длительные (вплоть до 96-ти ч) нарушения генерации ММК. Применение трибутирина укорачивало общие сроки восстановления моторики до 48-ми ч.

В связи с тем, что, по данным современной литературы, энтеральное введение трибутирина приводит к уменьшению продукции NO [12], можно полагать, что стимулирующее влияние трибутирина на моторику кишечника определяется, в основном, снятием тормозных влияний, реализуемых через неадренергические нехолинергические пути. Кроме того, прокинетические эффекты трибутирина могут быть так же связаны со стимуляцией противовоспалительных холинергических путей (через ХЦК-рецепторы первого типа и рецепторы GLP-1R, родственные к бутирату, расположенные на афферентных волокнах блуждающего нерва).

Таким образом, использование трибутирина как компонента нутритивной поддержки при эндотоксемии может являться физиологичным способом стимуляции перистальтики, приводящим к восстановлению моторики кишечника.

Список литературы

1. *Cullen J.J., Caropreso D.K., Hemann L.L., et al.* Pathophysiology of adinamic ileus // *Dig. dis. sci.* 1997. Vol. 42. No. 4. Pp. 731-737.
2. *De Winter B.Y.* Study of the pathogenesis of paralytic ileus in animal models of experimentally induced postoperative and septic ileus // *Verh K. Acad. Geneesk. Belg.* 2003. Vol. 65. No. 5. Pp. 293-324.
3. *Eskandari M.K., Kalff J.C., Billiar T.R., et al.* LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity // *Am. J. Physiol. gastrointest. liver physiol.* 1999. Vol. 277. No. 2. Pt. 1. Pp. 478-486.
4. *Genton L., Kudsk K.A.* Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition // *Am. J. Surg.* 2003. Vol. 186. No. 3. Pp. 253-258.
5. *Lubbers T., Luyer M.D., de Haan J.J., et al.* Lipid-rich enteral nutrition reduces postoperative ileus in rats via activation of cholecystokinin-receptors // *Ann. Surg.* 2009. Vol. 249. No. 3. Pp. 481-487.
6. *Luyer M.D., Habes Q., van Hak R., Buurman W.* Nutritional stimulation of the autonomic nervous system // *World J. Gastroenterol.* 2011. Vol. 17. No. 34. Pp. 3859-3863.
7. *Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology // *Pharmacol. rev.* 1991. Vol. 43. No. 2. Pp. 109-142.
8. *Quintana E., Hernández C., Alvarez-Barrientos A., et al.* Synthesis of nitric oxide in postganglionic myenteric neurons during endotoxemia: implications for gastric motor function in rats // *FASEB J.* 2004. Vol. 18. No. 3. Pp. 531-533.
9. *Quintana E., Hernández C., Moran A.P., et al.* Transcriptional up-regulation of nNOS in the dorsal vagal complex during low endotoxemia // *Life sci.* 2005. Vol. 77. No. 9. Pp. 1044-1054.
10. *Sarna S.* Myoelectrical and contractile activities of the gastrointestinal tract // Schuster M.M., Crowell M.D., Kenneth L.K. *Schuster Atlas of gastrointestinal motility in health and disease.* - London: BC Decker Inc., Hamilton, 2002. P. 1-18.
11. *Schwartz G.J.* The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects // *Nutrition.* 2000. Vol. 16. No. 10. Pp. 866-873.
12. *Vinolo M.A., Rodrigues H.G., Hatanaka E., et al.* Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils // *J. Nutr. biochem.* 2011. Vol. 22. No. 9. Pp. 849-855.

Enteral administration of tributyrin as an element of nutritional support in the treatment of disruption of the intestinal electrical activity during experimental endotoxemia

E.A. Kislyakova, N.S. Tropkaya, T.S. Popova

We investigated the electrical activity of the small intestine in rats intravenously administered 200 µg/kg of lipopolysaccharide *E. coli*. It has been shown that disturbances in the generation of migrating myoelectric complex were observed during the 96-hours after lipopolysaccharide administration. Enteral administration of tributyrin shortened overall recovery times migrating myoelectric complex to 48 hours.

Key words: tributyrin, migrating myoelectric complex, small intestine, endotoxemia.

Влияние кремний-, титан- и цинксодержащих глицерогидрогелей на процессы репарации в коже экспериментальных животных при местном курсовом лечении термических ожогов

Р.Р. Сахаутдинова, Л.П. Ларионов, И.Е. Валамина, Т.М. Мельникова, Е.Ю. Мещерякова

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург

Контактная информация: Сахаутдинова Рената Рашидовна, renata.tais@mail.ru

В данной работе представлены некоторые аспекты действия кремний-, титан-, цинксодержащих глицерогидрогелей на процессы репарации в коже белых крыс популяции линий Wistar при местном лечении ожоговой раны глицерогидрогелевыми основами для мягких лекарственных форм.

Ключевые слова: кремний, глицерогидрогель, ожог, репарация кожи.

Введение

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН были синтезированы и запатентованы кремнийсодержащий глицерогидрогель (КГГ), кремний-титансодержащий глицерогидрогель (КТГГ), кремнийцинксодержащий глицерогидрогель (КЦГГ), обладающие транскутанной проводимостью лекарственных средств, ранозаживляющим и регенерирующим действием. Глицерогидрогели могут быть применены как самостоятельно, так и в качестве основ для мягких лекарственных форм. Эссенциальный микроэлемент кремний обладает способностью стимулировать пролиферацию соединительной и эпителиальной тканей. Кроме того, глицераты кремния и глицерогидрогели на их основе проявляют местную антибактериальную активность, что обуславливает возможность их применения при лечении ожоговых ран [2-4].

Оптимальное заживление кожных ран наблюдается при сбалансированном соотношении процессов регенерации и воспаления, регуляция которых происходит с помощью сложного комплекса нейроэндокринных, метаболических и других факторов. Поиск новых методов лечения термических ожогов, способных влиять на скорость и «качество» заживления, является важной задачей экспериментальной медицины.

Цель работы – изучить в сравнительном аспекте и выявить возможные закономерности и особенности действия кремний-, титан- и цинксодержащих глицерогидрогелей на процессы репарации кожи лабораторных животных при местном наружном лечении термических ожогов.

Материалы и методы

Для исследования выбраны КГГ, КТГГ и КЦГГ. Эксперимент проводи-

ли на белых крысах-самцах популяции линий Wistar массой 220-320 г, распределённых на 4 группы (три опытных и одна контрольная) по 10 животных в каждой. Животные содержались в соответствии с ГОСТ Р 53434.2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» при стандартном комбикормовом питании и свободном доступе к воде. Животные находились в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях естественно-искусственное.

Крысам опытных и контрольной групп под эфирным рауш-наркозом на предварительно обработанной от шерсти коже поверхности бедра создавали термический ожог II–III степени с помощью нагретой до 100-98°C металлической пластины площадью 20×60 мм. Исследуемые глицерогидрогели в дозе 2000 мг/кг наносили один раз в сутки в одно и то же время, равномерно распределяя по всей ожоговой поверхности. Крысам 1-ой группы наносили КГГ, 2-ой – КТГГ, 3-ей – КЦГГ, 4-ая группа, контрольная, имела термический ожог без лечения.

После завершения курса лечения (19 суток) для оценки процессов репарации в зоне термического ожога проводили гистологическое исследование. Кожные лоскуты размером 2×2 см с ожоговой поверхности фиксировали в 10% растворе формалина, проводили по спиртам возрастающей концентрации и заливали в парафин. Для приготовления гистологических срезов использовали микротом НМ-450 MICROM. Гистологические срезы

окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону и по Вейгерту [5]. Микропрепараты исследовали на микроскопе «Olympus CX41» с применением стандартных объективов при увеличении 50, 100, 200, 400. Микрофотографии выполняли с применением системы визуализации «CellSensOlympus».

Для объективизации гистологического исследования проводили морфометрическое исследование: полуколичественная оценка васкуляризации дермы и воспалительной инфильтрации нейтрофильными лейкоцитами (+ слабо, ++ умеренно, +++ выраженно) в зоне аппликации с применением сетки Автандилова.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (США).

Результаты и их обсуждение

Основными этапами заживления кожной раны являются отложение соединительнотканного матрикса, особенно коллагена (фиброплазия), его перестройка в рубец, возникновение феномена натяжения раны. В процессе заживления ран выделяют 4 основных компонента: ангиогенез, миграцию и пролиферацию фибробластов, продукцию внеклеточного матрикса, созревание и организацию соединительной ткани.

При гистологическом исследовании в образцах всех групп представлены кожа (эпидермис и дерма), в т.ч. зона предсуществовавшего термического ожога глубиной преимущественно до сосочкового слоя дермы, подкожно-жировая клетчатка (гиподерма) и фрагменты мышц.

В группе с аппликацией КГГ (1-ая группа) в зоне ожога частично сохранялся струп, морфологически под струпом в 50% случаев имела полная эпителизация, в 50% – краевая эпителизация. При полной эпителизации раны грануляционная ткань прорастала тонкими коллагеновыми волокнами с новообразованными капиллярами, в сетчатом слое дермы формировался соединительнотканый рубец (рис. 1). При краевой эпителизации под струпом определялась очаговая лейкоцитарная воспалительная инфильтрация, зона термического ожога выполнена созревающей грануляционной тканью, в которой преобладали фибробласты и гистиоциты, встречались единичные нейтрофильные лейкоциты, лимфоциты.

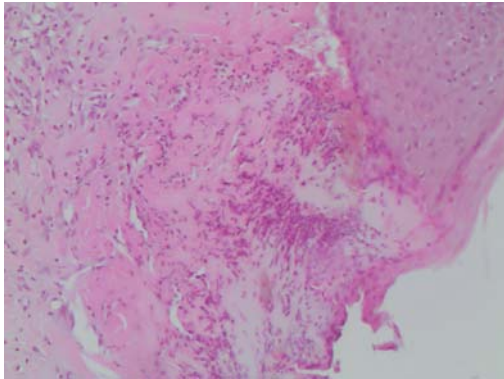


Рис. 1. КГГ. Краевая эпителизация раны, в дерме – тонкий слой грануляционной ткани, коллагеновые волокна формируют дно эпидермального дефекта. Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 100$.

В группе с аппликацией КТГГ (2-ая группа) в 60% случаев выявлено заживление ожоговой раны под струпом с полной эпителизацией. В 40% случаев определялась краевая эпителизация раны, центральные отделы раны прикрыты струпом

и грануляционной тканью с выраженной воспалительной инфильтрацией и формированием соединительнотканного рубца в дерме, с признаками гиалиноза. При полной эпителизации определялся пролиферативный акантоз, субэпидермально – слой образованной грануляционной ткани с неравномерным кровенаполнением в капиллярах и единичными нейтрофилами в их просвете (рис. 2).

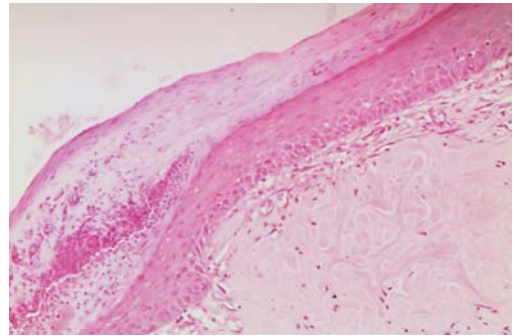


Рис. 2. КТГГ. Заживление раны под струпом, субэпидермально определяется тонкий слой грануляционной ткани, в дерме формируется соединительнотканый рубец. Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 100$.

В группе с аппликацией КЦГГ (3-ая группа) определялась полная эпителизация раны в 75% случаев с признаками отека эпидермиса, полнокровия субэпителиально расположенных сосудов, пролиферацией эпителия с признаками созревания в зоне ожоговой раны. В ряде случаев (25%) на большем протяжении грануляционная ткань покрыта эпителием, «наползающим» на зону ожога с краев раны. При краевой эпителизации раны сохранялась лейкоцитарная межэпителиальная инфильтрация и лейкостаз в тонкостенных сосудах капиллярного типа. При окраске пикрофуксином по Ван Гизону выявлены пучки грубых коллагеновых волокон в сетчатом слое дермы (рис. 3).

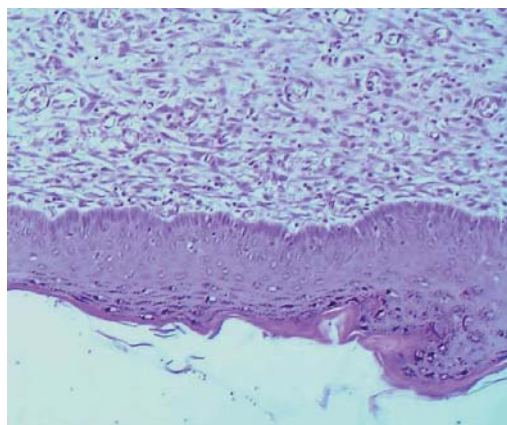


Рис. 3. КЦГГ. Эпителий утолщен, в основном за счет отека, клеточность не повышена, эпителий – с признаками созревания, межэпителиально определяется нейтрофильная инфильтрация. В сосудах – лейкостаз. Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 100$.

В контрольной группе определялась полная эпителизация раны с выраженным пролиферативным акантозом эпителия, формированием соединительнотканного рубца в дерме, с признаками гиалиноза. В ряде случаев выявлен одиночный дефект эпидермиса с лейкоцитарной инфильтрацией дермы и единичными нейтрофилами в просвете тонкостенных сосудов (рис. 4).

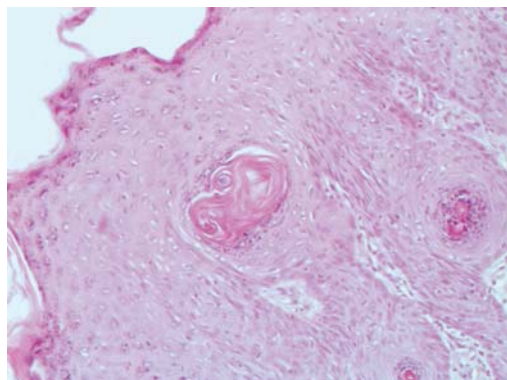


Рис. 4. Контрольная группа. Выраженный акантоз эпителия, межклеточный отек, тонкий слой грануляционной ткани. Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 100$.

При применении КЦГГ на 19-й день зона ожога ещё выполнена созревающей, хорошо васкуляризированной грануляционной тканью с многочисленными коллагеновыми фибриллами. Клеточный компонент грануляционной ткани представлен фибробластами и гистиоцитами с единичными нейтрофилами.

При полуколичественной оценке воспалительной реакции в группе аппликации КТГГ выраженность воспалительной реакции соответствовала данному показателю в группе контроля. Менее выраженная воспалительная реакция отмечена в группе воздействия на ожоговую поверхность КГГ и КЦГГ.

При сравнительном морфометрическом исследовании васкуляризации в зоне аппликации полуколичественным методом с помощью сетки Автандилова было установлено, что при аппликации КЦГГ количество обнаруживаемых сосудов в дерме выше ($45 \pm 3,00\%$) по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ($42,4 \pm 3,20\%$). При использовании КГГ полуколичественная оценка васкуляризации ($42,5 \pm 4,50\%$) не отличалась от таковой в контрольной группе. В группе с КТГГ показатель васкуляризации снижен ($32,2 \pm 2,30\%$) по сравнению с контрольной группой.

Выводы

1. Полученные результаты свидетельствуют о преимущественном заживляющем эффекте КЦГГ, при воздействии которого на область термического ожога отмечены более полноценная репарация поврежденных структур кожи, лучшая васкуляризация при полуколичественной оценке в зоне аппликации и

наименее выраженная воспалительная реакция по сравнению с другими группами.

2. В группе с аппликацией КТГГ процессы репарации имели тенденцию к замедлению по сравнению с группой, где использовался КЦГГ, однако дифференцировка поверхностных клеток приближалась к архитектонике зрелого эпидермиса, т.к. имелись явления поверхностной кератинизации. Васкуляризация и воспалительная реакция соответствовали таковым, наблюдаемым в контрольной группе.

3. В группе с аппликацией КГГ процессы репарации кожи были ниже наблюдаемых в группах, где применялось лечение КЦГГ и КТГГ, при этом воспалительная реакция была выражена более слабо. Рубец в большинстве случаев был представлен зрелыми коллагеновыми волокнами, дериваты кожи в зоне рубца отсутствовали. При использовании КГГ проявления фиброплазии задерживались, зона термического ожога была менее зрелой, чем в группе с аппликацией КТГГ и КЦГГ, и

представлена грануляционной тканью с сохраняющейся воспалительной клеточной инфильтрацией, содержащей большое количество нейтрофильных лейкоцитов.

Список литературы

1. Багирова В.Л., Демина Н.Б., Куличенко Н.А. Мази. Современный взгляд на лекарственную форму // Фармация. 2002. № 2. С. 24-26.
2. Патент РФ № 2255939, 2005. Глицераты кремния, обладающие транскутанной проводимостью медикаментозных средств, и глицерогидрогели на их основе // Хонина Т.Г., Ларионов Л.П., Русинов Г.Л., Суворов А.Л., Чупахин О.Н.; опубл.10.07.2005, бюл. № 19.
3. Патент РФ № 2322448, 2008. Сольватокм-плексы глицератов кремния и титана, обладающие транскутанной активностью, и гидрогели на их основе // Хонина Т.Г., Чупахин О.Н., Ларионов Л.П., Бояковская Т. Г., Суворов А.Л.; опубл. 20.04.2008, бюл. № 11.
4. Патент РФ № 2458929, 2012. Кремнийтитан-содержащие производные полиолов и гидрогели на их основе // Чупахин О.Н., Иваненко М.В., Хонина Т.Г., Ларионов Л.П., Светозеров А.В.; опубл. 20.08.2012. бюл. № 23.
5. Цветкова Г.М., Мордовцев В.Н. Патоморфологическая диагностика заболеваний кожи. - М.: Медицина. 1986. С. 5-11.

The influence of silicon, titanium and zinc-containing glycerohydrogels on repair skin of experimental animals in the local exchange treatment of thermal burns

R.R. Sakhautdinova, L.P. Larionov, I.E. Valamina, T.M. Mel'nikova,
E.U. Mescheryakova

Work is devoted to studying investigation of some aspects of pharmacological effects of silicon-, titanium-, zinc-containing glycerohydrogels of Wistar population on white rats. It was shown, that the gels increase adaptation of testing animals at treatment of thermal burn.

Key words: silicon, glycerohydrogels, burn, repair skin.

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным **комбикормом для лабораторных животных** научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень;
- ✓ Премиксы.



НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам

Доставка в любой регион России

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

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 648-42-39;

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

www.laboratorkorm.ru, e-mail: info@laboratorkorm.ru

на правах рекламы



БИОМЕДИЦИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»
Филиал «Андреевка»

Филиал «Андреевка» образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году.

Постановлением Совета Министров СССР основной задачей Филиала является получение и выращивание лабораторных животных. Популяции животных для разведения в Филиале постоянно обновляются за счет племенных ядер, передаваемых из лаборатории генетики Центра. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируемыми

по генетическим, физиологическим, морфологическим показателям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С Филиалом сотрудничает более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАМН, РАН, Минздравсоцразвития, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

Филиал «Андреевка» предлагает следующих животных:

I. Морские свинки: альбиносы и пестрые.

II. Генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крыс; мыши SHK-самки подвержены раку молочных желез (частота заболевания выше 50%).

III. Линейные мыши и крысы:

– мыши линии **DBA** – имеют светло-коричневую окраску шерсти, используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях, для изучения нарушений вестибулярного и слухового аппаратов;

– мыши линии **BALB/C** – белой окраски, альбиносы, используются во всех медико-биологических исследованиях. Высокая частота опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком;

– мыши линии **C57BL/6** – черной окраски. Используются в изучении скелетных аномалий, дефектов развития головы и

глаз. Стандартная линия для поддержания мутаций. Чувствительны к действию канцерогенов, стафилококков, сальмонелл;

– мыши линии **CBA** – серой окраски, используются в радиологии, медико-биологических геронтологических исследованиях, для изучения спонтанных опухолей печени;

– крысы **W1STAR** – белой окраски, альбиносы. Используются для онкологических исследований, для изучения поведенческих реакций.

IV. Межлинейные гибриды мышей:

– **F1 CBA x C57BL/6** – шерсть серого окраса;

– **F1 C57BL/6 x DBA** – шерсть черного окраса. Гибриды F1 используются для онкологических и радиационных исследований.



141551. М.О., Солнечногорский район, п/о Андреевка, д. 49
Тел. 8(495)536-09-18; 8(495)536-37-58 Факс: 8(495)536-28-33

E-mail: andreevka-kv@rambler.ru

