

Научный журнал.

Основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН

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

Подписной индекс 57995 в Каталоге «Издание органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (редакция — март 2010 года)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Н. Н. Каркищенко,
академик РАН, член-корреспондент РАМН

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

Редакционный совет:

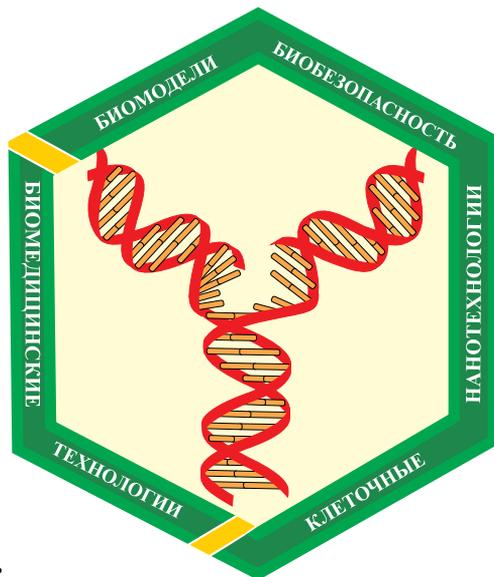
член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, prof. Iorgen Backmen (Германия),
акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А. М. Дыгай,
prof. Moineao S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С. И. Колесников, акад. РАМН А. А. Кубатиев,
акад. РАМН В. Г. Кукес, акад. РАН А. И. Мирошников, проф. С. П. Нечипоренко,
акад. РАН и РАМН М. А. Пальцев, акад. РАМН В. И. Петров, акад. РАМН К. В. Судаков,
акад. РАМН В. П. Фисенко, член-корр. РАМН Д. Ф. Хритинин, проф. Б. Д. Цыганков,
акад. РАМН В. Н. Ярыгин

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

Адрес редакции:

105064, Москва
Малый Казенный пер. 5, стр. 1
scbmt@mail.ru www.scbmt.ru
Тел.: 8 (495) 561-52-64

Отпечатано в типографии «Лин-Интер»
127591, Москва, ул. Дубнинская, д. 83а
Подписано в печать
Тираж 3 000 экз.



Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, Д.С. Сахаров, В.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, Д.Б. Чайванов Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека	4
---	---

ОБЗОРЫ

В.М. Женило, О.Ю. Соколов, В.В. Хоронько, М.В. Женило, О.М. Куделина, О.А.Махарин, Н.В. Карнушина, И.М. Зооль Ахмед Современные методы фармакоэлектроэнцефалографии в оценке фармакодинамики средств для тотальной внутривенной анестезии.....	24
--	----

БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

К.А. Аксёнов, М.В. Ломакин, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Смешко Экспериментальное моделирование заживления хирургических ран в полости рта	34
В.М. Брюханов, И.В. Смирнов, А.А. Бондарев, О.С. Талалаева, В.М. Шабанова, Я.Ф.Зверев, В.В. Удут Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс.....	41

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

А.А. Бондарев, И.В. Смирнов, П.С. Постников, В.Д. Филимонов, В.В. Удут, В.Н. Каркищенко Термодинамический спектр взаимодействия фуросемида с белковыми молекулами в водной среде ..	50
И.В.Смирнов, А.А.Бондарев, В.В.Удут, Н.Н. Каркищенко Фармакодинамические эффекты взаимного влияния веществ	59
С.А.Швецов, Н.А.Черкасов, А.В.Ежов, С.В.Багин, В.В.Тетерин, Д.А.Мохов Математическое моделирование процесса приготвления таблетированной формы чумной живой вакцины.	64

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РАБОТА

В.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, С.Е. Деньгина, Н.В. Станкова Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов	72
Ю.А. Степанов, Н.Н. Каркищенко, М.Ф. Черкасов, В.Н. Каркищенко, Г.Д.Капанадзе Морфологические изменения в области ложа желчного пузыря после воздействия препарата «Гемостоп» в эксперименте	75
Ю.В.Фокин, Д.С.Сахаров Сравнительная характеристика и возможность использования наркотизирующих препаратов Золетил 100 и диэтиловый эфир при проведении операций по вживлению ЭЭГ-электродов на крысах.....	84

ПРАКТИКУМ

Л.А. Болотских, Х.Х. Семенов, И.Ю. Егорова, Т.В. Галахова, Т.Б. Бескова, Н.В. Касинская Изоляторные системы — новый методический подход в медико-биологических исследованиях.....	90
---	----

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, D.S. Sakharov, V.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze, D.B. Chayvanov Ultrasonic vocalization and its informative operation factors in animals and man	4
---	---

REVIEWS

V.M. Genilo, O.U. Sokolov, V.V. Horonko, M.V. Genilo, O.M. Kudelina, O.A. Maharin, N.V. Karnushina, I.M. Zool Ahmed Modern methods pharamelectroencephalography in farmdynamics estimation for total intravenous anesthesia.....	24
--	----

BIOMODELLING

K.A. Aksenov, M.B. Lomakin, G.D. Kapanadze, N.V. Smeshko Experimental modeling of surgical wound healing in oral cavity	34
---	----

V.M. Brukhanov, I.V. Smirnov, A.A. Bondarev, O.S. Talalaeva, V.M. Shabanova, Y.F. Zverev, V.V. Udut Arbutin's and hydroquinone's influence on free radical oxidation in rats blood	41
--	----

MATHEMATICAL MODELLING

A.A. Bondarev, Smirnov I.V. , P.S. Postnikov, V.D. Filimonov, V.V. Udut , V.N. Karkischenko Thermodynamic spectrum the interaction of furosemide with protein molecule in water surroundings	50
--	----

I.V. Smirnov, A.A. Bondarev, V.V. Udut, N.N. Karkischenko Matuematical modeling of interactions of substances	59
---	----

S.A. Shvetsov, N.A. Cherkasov, A.V. Ezhov, S.V. Bagin, V.V. Teterin, D.A. Mokhov Mathematical modeling of preparation of lozenge-formed live plague vaccine.....	64
--	----

EXPERIMENTAL WORK

V.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze, S.E. Dengina, N.V. Stankova Working out of a technique for physical endurance of small laboratory animals for studying of different medicine	72
---	----

Y.A. Stepanov, N.N. Karkischenko, M.F. Cherkasov, V.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze Morphological changes in the gallbladder bed after exposure to the drug «Gemostop» in experiment.....	75
---	----

Yu.V. Fokin, D.S. Sakharov The comparative characteristic and use possibility of anesthetizing preparations of zoletil 100 and a diethyl ether at carrying out of operations on implantation of eeg-electrodes for rats.....	84
--	----

PRACTICE

L.A. Bolotskykh, H.H. Semenov, I.Uj. Egorova, T.V. Galakhova, T.B. Beskhova, N.V. Kasinskaya The isolator systems as a new methodical approach in medical and biological researches	90
---	----



Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека

Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, Д.С. Сахаров, В.Н. Каркищенко,
Г.Д. Капанадзе, Д.Б. Чайванов¹

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

¹ – *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

*Контактная информация: Каркищенко Николай Николаевич – академик РАН,
член-корреспондент РАМН, e-mail: niknik2808@yandex.ru.*

Впервые обнаружено, что ультразвуковая вокализация в состоянии покоя характерна всем исследованным нами лабораторным животным (мышь, крысы, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи, обезьяны), а также человеку. У людей эти феномены УЗВ ярче проявляются при физической и психоэмоциональной нагрузке. Наиболее адекватными животными, используемыми в качестве биомоделей в экспериментах по оценке функционального состояния методом анализа УЗВ, вероятно, являются хомяки и крысы. Ультразвук мышей характеризуется преобладанием частот в диапазонах 20-30 кГц и 45-60 кГц. Для кроликов, мини-свиней и хомяков характерна ультразвуковая вокализация частотой 20-25 кГц, в меньшей степени – 35 кГц; также хомяки способны излучать ультразвук частотой приблизительно 55 кГц. Основная частотная составляющая ультразвука макак резусов, крыс и морских свинок лежит в диапазоне 30-50 кГц с пиком в области 37-42 кГц. Спектральная плотность мощности ультразвука человека при физической нагрузке содержит пики небольшой амплитуды на частотах, приблизительно равных 20 кГц, 45, 55 кГц; также отмечается плато в диапазоне 60-80 кГц. Доминирование УЗВ в диапазоне 20-30 кГц отображает дистрессорное состояние, тогда как 50-55 кГц характеризуют, в зависимости от перераспределения характеристик спектральной плотности мощности, комфортное или дискомфортное состояние. Эти проявления характерны для всех исследованных нами животных и человека. Общая тенденция спектрограммы УЗВ человека характеризуется плавным гиперболическим снижением мощности сигнала по мере возрастания частоты. Способность человека и животных генерировать ультразвуковые колебания в сопоставимых диапазонах частот позволяет использовать информативные параметры УЗВ для экстраполяции результатов исследований на лабораторных животных в отношении человека.

Ключевые слова: ультразвуковая вокализация (УЗВ) у мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кроликов, мини-свиней, обезьян и человека, УЗВ-коммуникации, спектральная плотность мощности УЗВ, вероятность встречаемости УЗ-сигналов, информативные параметры для экстраполяции на человека.

Ультразвук по своим физическим свойствам не отличается от воспринимаемого человеческим ухом слышимого звука. Однако ультразвук является высокоэффективным методом исследования различных веществ и явлений во многих областях физики, химии, биологии и медицины. Квантовая акустика изучает взаимодействие упругих волн и их квантов (фононы) с электронами, маг-

нонами и различными квазичастицами в твердых телах и жидкостях. Как и звук слышимого для человека диапазона, ультразвук являет собой упругие волны с частотами от 15-20 кГц ($1,5-2,0 \times 10^4$ Гц) до 1 ГГц (10^9 Гц). Ультразвуковые частоты подразделяются на три поддиапозона: ультразвук низких частот ($1,5 \times 10^4-10^5$ Гц) – УНЧ, ультразвук средних частот (10^5-10^7 Гц) – УСЧ и область высоких частот ультразвука (10^7-10^9 Гц) – УВЧ.

Отражение ультразвуковых сигналов от препятствий используется в эхолотах, гидролокаторах и других устройствах, построенных на основе эффекта Доплера. Наряду с применением в технике, методы ультразвуковых исследований широко используются в биологии и медицине. Физическая природа ультразвука включает в себя механические, тепловые и физико-химические явления, которые, в свою очередь, вызывают разнообразные и мощные биологические эффекты. При интенсивностях до 1-2 Вт/см² ультразвук способен активизировать обменные процессы в органах и тканях, улучшать кровоснабжение. Более высокие интенсивности могут приводить к разрушению белков, гликолипопротеидов, что используется в хирургической практике и локальных воздействиях на ткани организма.

Диагностическое значение ультразвуковых методов широко известно. Оно позволяет более тонко и с меньшим повреждением тканей, в сравнении, например, с рентгеновским облучением, обеспечивать диагностические процедуры с высокой разрешающей способностью. Наряду с этим, в последние годы начали изучать феномены ультразвуковой вокализации (УЗВ, УЗ-сигналы) лаборатор-

ных животных, но почти исключительно у мышей и крыс.

Биология ультразвука

Натуралисты прежних столетий описывали свойства эхолокации летучих мышей, не имея реальных данных о природе этого явления. Ладзаро Спалланцани и Шарль Жюрин еще в XVIII веке, на основании своих опытов, сделали вывод, что летучие мыши ориентируются по слуху. Хайрем Максим в 1912 г. высказал идею об активной звуковой локации летучих мышей. В 1938 г. Г.Пирс, Д.Гриффин и Р. Галамбос расшифровали природу этого явления и зарегистрировали залпы ультразвуковых импульсов, позволяющие этим животным определять расстояние до различных предметов и скорости передвигающихся в воздухе насекомых. В дальнейшем было показано, что ультразвук распространяется направленным пучком, и летучая мышь сканирует ультразвуковым сонаром окружающие ее предметы.

Было установлено, что отражение ультразвуковых волн мало искажается, а шумы ветра, голоса других животных, техногенные ультразвуковые сигналы не влияют на эхолокацию летучих мышей. Характерно, что посылаемые летучими мышами ультразвуковые импульсы, укорачиваются при приближении к объекту, что исключает перекрывание конца импульса с началом его эха. Весьма важным является тот факт, что летучие мыши чаще всего реагируют на звуки, издаваемые особями того же вида, а меньше всего – на звуки, издаваемые особями другого вида. Это позволяет говорить о том, что эхолокация у летучих

мышей служит не только для ориентации в пространстве, но и в качестве передачи зоосоциальной информации.

Совершенно уникальным является аппарат эхолокации у дельфинов, которые издают звуки в крайне широком диапазоне – от инфранизких частот до более чем 200 кГц, охватывая 12 октав. Ни одно из живых существ на нашей планете не имеет такого диапазона. Как в дальнейшем выяснилось, ультразвуковые сигналы используются дельфинами не только для эхолокации, но и для коммуникации в виде УЗВ. Важным параметром УЗВ является интенсивность или громкость звука, которая служит мерой энергии звука. Акустическая коммуникация по своим возможностям занимает промежуточное место между оптической и химической, но, в отличие от них, она может действовать на большом расстоянии или в полной темноте, когда отсутствуют зрительные, тактильные и обонятельные контакты. Дальность передачи УЗВ определяется следующими факторами: интенсивностью и частотой сигнала, акустическими свойствами среды и порогами слуха животного или человека, принимающего этот сигнал.

Волны с частотой до 20 Гц ощущаются человеком как вибрации, но не воспринимаются как звуки. УЗВ с частотой выше 20 кГц недоступна уху человека, но воспринимается разными животными. Имеются данные, что человек все же способен воспринимать звуки и более 20 кГц, а, например, собаки прекрасно различают звук до 90 кГц. Другие авторы указывают, что собаки улавливают звуковые колебания лишь до 44 кГц, крысы – до 72 кГц, летучие мыши – до 115 кГц, слоны – до 12 кГц [1]. Акустиче-

ская коммуникация широко используется самыми разными животными, включая субприматов и приматов. Часто они используют характерный шумовой ритуал: барабнят руками по сухим веткам, торчащим корням деревьев, сопровождая эти действия криками, визгом и воем. Известно, что у дельфинов аппарат УЗВ имеет специальные воздушные мешки, которые используются ими для осуществления ультразвуковой коммуникации, поскольку у них отсутствуют голосовые связки. Другой механизм, но в своей основе имеющий ту же природу, используется гориллами. Шлепки полусогнутыми ладонями по предварительно наполненной воздухом груди являются возможным механизмом генерации УЗВ.

УЗВ как инструмент исследования лабораторных животных

Первое свидетельство о наличии УЗВ у лабораторных крыс и зоосоциально изолированных новорожденных мышат были описаны в 1954-1956 гг. [23], когда впервые были зарегистрированы звуковые сигналы на частотах 23-28 кГц. Частота и продолжительность УЗВ взрослых крыс имеют три различных вида, которые определяются возрастом животного, условиями окружающей среды и эмоциональным состоянием [13]. Взрослые крысы и подростки издают два основных вида ультразвуков, различающихся частотой пиковой энергии. Типичная или низкочастотная вокализация (22 кГц) имеет интервал частоты 18-32 кГц и изменяется по частоте только в пределах 1-6 кГц у этих животных [18, 19]. Звуки издаются в пределах 300-4000

мсек и дают шумовое давление 65-85 дБ [17, 19].

В отличие от взрослых крыс, новорожденные крысята издают ультразвуки при отъеме у матери в диапазоне 30-65 кГц [9, 12]. При этом график записи вокализации имеет U-форму или изгиб [9, 10, 12]. Крысята имеют 4 различных типа УЗВ, 3 из которых содержат 2 или 3 компоненты, которые делают их более сложными, чем простой свист [10]. Считается, что УЗВ крысят является призывом матери к проявлению заботы о потомстве. При этом установлено, что крысята, которых матери в младенчестве чаще вылизывали, проявляют меньше беспокойства при раздражении. Те же крысята, которых матери не вылизывали совсем, чаще всего не выжили. Таким образом, УЗВ крысят может быть использована для измерения эмоционального состояния животного, в том числе дистресса или страха. Измерение числа пиков в течение короткого периода времени (5 мин.) также может служить мерой дистресса (страха). УЗВ животных чувствительна к лекарствам с анксиолитическими свойствами. Возможно, они также различаются по другим классам лекарств [4, 7].

В отличие от крыс мыши редко издают звуки в неблагоприятных условиях, даже тогда, когда их берут в руки, удерживают, тянут за хвост, подвергают воздействию электрического тока. У мышей УЗВ проявляется в неагрессивных ситуациях или при спаривании [8, 13]. В отличие от крыс, УЗВ мышей не может быть использована для выявления положительного или отрицательного воздействия на животное. Функция УЗВ взрослых мышей обеспечивает способство-

вание или сдерживание зоосоциального взаимодействия [13].

Новорожденные мышата издают УЗВ при изоляции от матери или гнезда. УЗВ мышат до конца еще не изучена и имеет несколько интерпретаций. Традиционно считается, что УЗВ мышат вызвана дистрессом при отъеме у матери. В настоящее время выдвинута теория [6], что УЗВ мышат – это акустический побочный продукт ларингеального разлома, который является причиной абдоминальной компрессионной реакции, что повышает поток крови, возвращаемой в сердце. Абдоминальная компрессионная реакция появляется в ответ на холод, или если мышенок выпал из гнезда или рук человека во время эксперимента. Таким образом, УЗВ является последовательностью движений, связанных с внешним воздействием, и не связана со звуковой коммуникацией с матерью [6]. Однако, независимо от этого, мать слышит детеныша, и УЗВ мышонка выполняет коммуникационные функции [13, 19]. Было найдено, что УЗВ мышонка обеспечивает стимул для матери проверить его. При этом отклик матери на УЗВ мышонка более быстрый, чем на другие звуки, издаваемые другими мышами, а отклик кормящей матери на УЗВ мышонка более быстрый, чем просто самки мышей, имеющей детенышей [6, 13].

Цели, материалы и методы исследований

Мелкие грызуны являются наиболее распространёнными лабораторными животными, используемыми в биомедицинских исследованиях, неврологии и экспериментальной психологии для изучения

основных механизмов, определяющих эмоциональные и мотивационные функции. Их исследование обычно опирается на изученные поведенческие особенности. Кроме того, предполагающиеся мотивационные и эмоциональные состояния, как правило, основываются на физиологических величинах – таких как частота сердечных сокращений, выделение кортикостерона или активность мозга.

Помимо этих величин, информативные данные о животных могут быть получены путём измерения их вокализации, существенная часть которой представлена в ультразвуковом диапазоне. Эта ультразвуковая вокализация является поведенчески важной, по крайней мере, по двум причинам: во-первых, она может служить мерой оценки текущего состояния животных, а во-вторых, вероятно, является важной коммуникативной особенностью, которая должна приниматься во внимание при анализе различных зоосоциальных аспектов (спаривание, кормление, агрессия, защита и т.д.) [2, 17].

Цель исследования. Поскольку в доступной нам литературе отсутствуют сообщения об установлении ультразвуковой вокализации у крупных лабораторных животных и человека, то целью настоящего исследования явилось изучение возможности регистрации УЗВ у различных видов животных (мышь, крысы, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи, обезьяны) и человека, а также анализ этих колебаний для выделения информативных и экстраполяционных параметров.

Регулирующие стандарты. Исследования выполняются согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Национальный стан-

дарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»). Эксперименты на животных проводились 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). Исследования выполнялись согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследования (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 [3]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ РАМН.

Дизайн и организация исследования направлены на определение индивидуальных УЗВ-параметров у животных и человека и выявление взаимосвязи с их видом, физиологическим и клиническим состоянием. Количество объектов, принимающих участие в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемого эффекта.

Мышей, крыс и хомяков содержали в микроизоляторной системе Raiг IsoSystem по 10 голов, морских свинок – индивидуально. Животные соответствовали категории SPF. Кролики содер-

жались в индивидуальных клетках батарейного типа на решетчатых полах. Мини-свиньи содержались в индивидуальных станках. В качестве подстила для всех видов животных использовали стерильные древесные опилки. Обезьяны содержались в индивидуальных клетках-вольерах из нержавеющей стали.

Для мелких лабораторных животных использовали стандартный комбикорм гранулированный полнораціонный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Для мини-свиней использовали комбикорм ПК-58, обезьян кормили по рациону, принятому в НЦБМТ РАМН. 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.

В настоящем эксперименте, который проводился на базе НЦБМТ РАМН, были использованы самцы и самки: крысы линии WAG/GY трёхмесячного возраста; хомяков линии BSto шестимесячного возраста; генномодифицированных мышей линии B10.GFP в возрасте 4-6 месяцев; морских свинок в возрасте 4-6 месяцев; кроликов породы Советская шиншилла в возрасте 6 месяцев; а также мини-свиньи светлогорской популяции трёхмесячного возраста (самцы); макаки резусы в возрасте 8-10 лет (самцы). Наряду с этим, исследованию подверглись клинически здоровые волонтеры в возрасте 20-25 лет.

Регистрация УЗВ. Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Mertis B.V., Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных или человека. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрацию ультразвуковых колебаний у каждого животного в состоянии покоя осуществляли в течение 30 минут. Регистрация ультразвука у человека была наиболее оптимальной при физической нагрузке (серия приседаний или отжиманий от пола, циклическое поднятие и опускание гантелей на вытянутых руках).

Обработка материалов. После удаления физических артефактов (монотонных шумов), осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 20 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB-5.5 методом Уэлча (функция *rwelch*). Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье (*Nfft*) – 2000 интервалов. После вычислений *спектральной плотности мощности* (СПМ) находились медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и человека. Кроме того, отдельно вычислялись медианы значений спектра по всей частотной полосе (20-100 кГц), и для каждой частоты осуществлялось суммирование числа случаев, когда СПМ была выше этой «общей» медианы. При анализе СПМ УЗВ по группе животных одного вида, определялись медианы каждой частоты по всем записям у этих животных. Оце-

нивалось число случаев (в процентах), когда каждая из анализируемых частот присутствовала в записи в течение эксперимента. В отдельных исследованиях измерялась мощность интервалов УЗВ в логарифмической шкале в дБ/Гц. В остальных случаях нам представилось более наглядным выразить значения спектральной плотности мощности (СПМ) в виде безразмерных коэффициентов ($K_{\text{СПМ}}$), рассчитанных как отношение СПМ к фону окружающей среды.

Информативные параметры УЗВ лабораторных животных

Оценивая количество эпизодов от общего времени каждого эксперимента, в которых регистрировался ультразвук, можно построить ряд, состоящий из животных и человека. Поставив в данном ряду на первое место животных, у которых ультразвуковая вокализация обнаруживалась наиболее часто, а остальных – расположив по убыванию вероятности регистрации ультразвука, получим следующую цепочку: хомяки → крысы → мыши → морские свинки → мини-свиньи → кролики → обезьяны → человек.

Анализ СПМ УЗВ мышей показал, что максимум значений СПМ ($K_{\text{СПМ}} = 3,5$) отмечался на частоте около 20 кГц (рис. 1А). Кроме того, имелись дополнительные пики СПМ в области 31-32 кГц ($K_{\text{СПМ}} \approx 2,6$) и в полосе 50-58 кГц ($K_{\text{СПМ}} \approx 2,3-2,6$). Минимум значений СПМ приходился на частоту около 41 кГц ($K_{\text{СПМ}} \approx 1,8$). По характеру распределения числа случаев обнаружения ультразвука видно, что чаще всего ре-

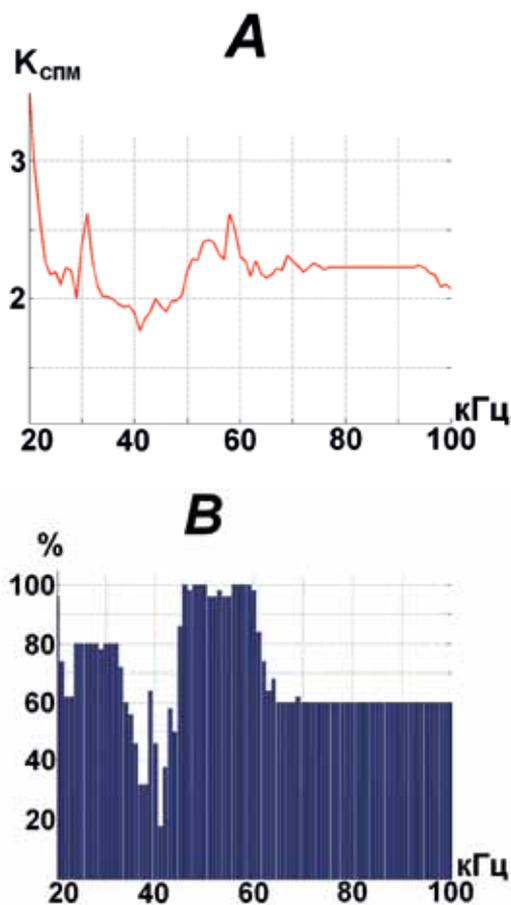


Рис 1. Ультразвуковая вокализация мышей. А – график спектральной плотности мощности (СПМ) УЗВ. По оси абсцисс – частота (кГц), по оси ординат $K_{\text{СПМ}}$. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. По оси абсцисс – частота, кГц; по оси ординат – число случаев, %.

гистрировались колебания 45-60 кГц, реже всего (18-19% случаев) – колебания около 42 кГц (рис. 1В). Мощность УЗ-сигнала прямо пропорциональна частоте его встречаемости.

У хомяков мощность основного пика СПМ ($K_{\text{СПМ}} \approx 9$) приходится на частоту около 22 кГц, также пики мощности зафиксированы в диапазоне 40-60 кГц (рис. 2А) с максимумом мощности в области 55 кГц ($K_{\text{СПМ}} \approx 5,3-5,4$). Далее

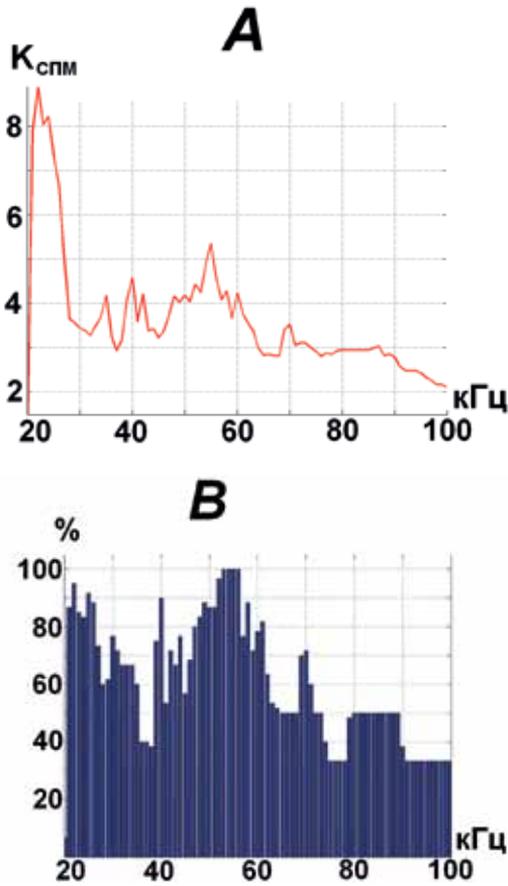


Рис 2. Ультразвуковая вокализация хомяков. А – график спектральной мощности. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. Остальные обозначения см. рис.1.

СПМ ультразвука снижалась с нарастанием частоты. Минимум значений СПМ приходится на 20 кГц ($K_{СПМ} < 2$). Согласно анализу числа случаев обнаружения ультразвука (рис. 2В), частотный диапазон 53-57 кГц встречается с наибольшей вероятностью (100% случаев), а области 74-78 и 91-100 кГц – с наименьшей ($\approx 32-33\%$ случаев), т.е. данные показатели также согласованы.

Анализ СПМ УЗВ крыс (рис. 3А) показал, что основные пики мощности приходятся на частотный диапазон 23-39 кГц,

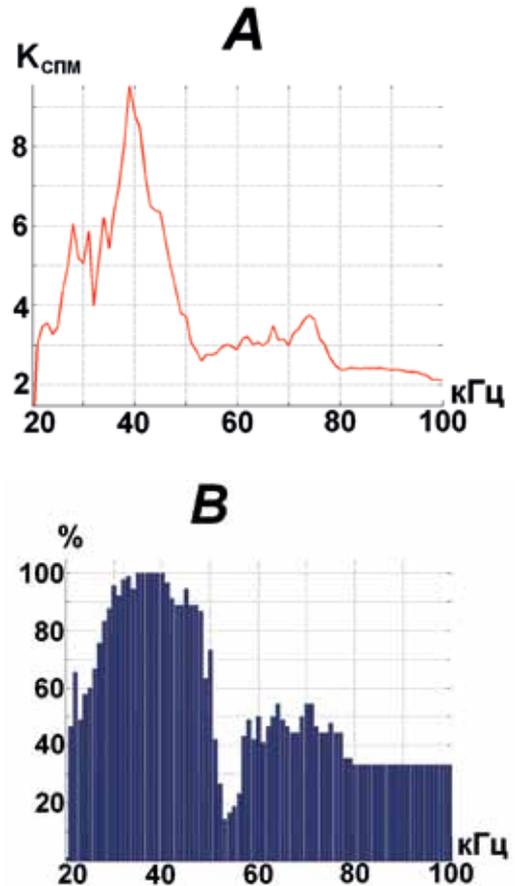


Рис 3. Ультразвуковая вокализация крыс. А – график спектральной мощности. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. Остальные обозначения см. рис.1.

с максимумом значений в его конечной точке ($K_{СПМ} > 9$). Дополнительные низкоамплитудные пики встречаются в диапазоне 53-75 кГц, после чего мощность сигнала падает с нарастанием частоты. Минимальное значение мощности ($K_{СПМ} < 2$) зафиксировано в районе 20 кГц. Согласно картине распределения числа случаев обнаружения УЗВ, диапазон 35-41 кГц является наиболее встречаемым (100% случаев), в области 21 кГц ультразвук фиксируется примерно лишь с одним процентом вероятности (рис. 3В). Мощность

УЗ-сигнала прямо пропорциональна частоте его встречаемости.

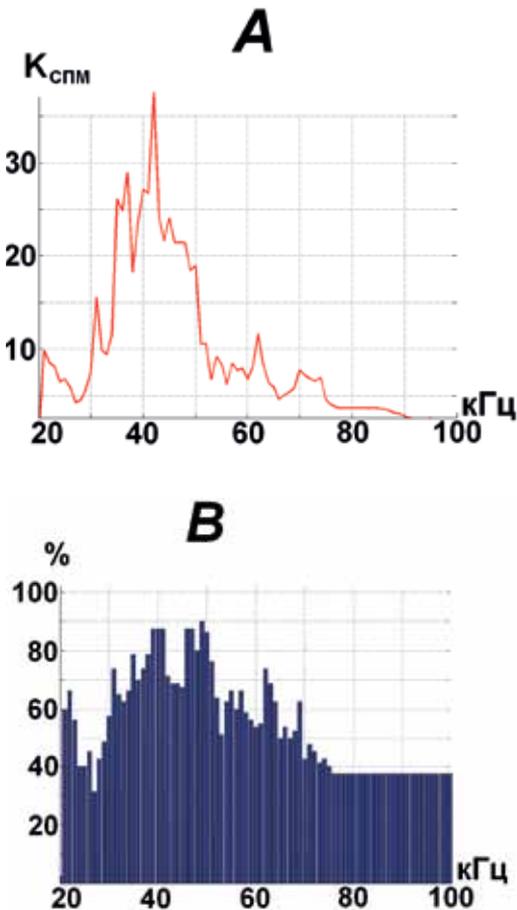


Рис 4. Ультразвуковая вокализация морских свинок. А – график спектральной мощности. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. Остальные обозначения см. рис.1.

Ширина пика СПМ морских свинок приходится на диапазон 21-42 кГц, т.е. также составляет около 20 кГц. Пик СПМ – в конце диапазона ($K_{СПМ} > 35$). Низкоамплитудные пики СПМ встречаются в области 62, 70-75 кГц, после чего мощность так же падает, как и в вышеописанном случае (рис. 4А). Минимум значений СПМ ($K_{СПМ} < 2$) приходится на частоту 20 и диапазон частот 92-100 кГц. В 90% случаев в вокализации мор-

ских свинок встречается частота 48-49 кГц (максимум), а 21 кГц – аналогично предыдущему описанию, лишь в 1-2% случаев (минимум). Данные показатели согласованы (рис. 4В).

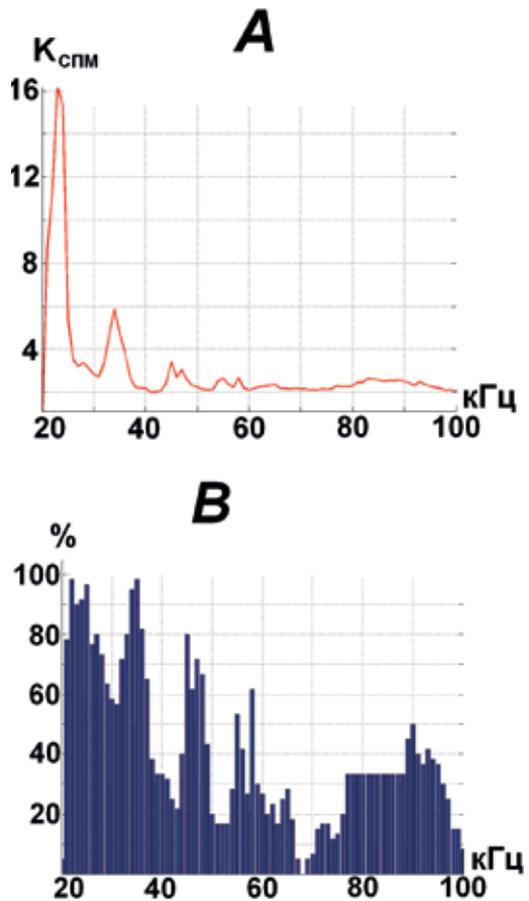


Рис 5. Ультразвуковая вокализация кроликов. А – график спектральной мощности. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. Остальные обозначения см. рис.1.

Характерной особенностью ультразвука кроликов было наличие в нем большой СПМ ($K_{СПМ} = 16$) в области 23-24 кГц (рис. 5А). Также отмечался пик в области 35 кГц, а далее СПМ ультразвука снижалась с нарастанием частоты. Минимум значений СПМ отмечался около 20 кГц ($K_{СПМ} < 2$), а также 42, 60,

73 и 100 кГц ($K_{СПМ} \approx 2$). Наиболее часто встречались колебания в районе 22-23 кГц (примерно 98% случаев), не удавалось зарегистрироваться частоты около 67-68 кГц (рис. 5В). Соответствие мощности УЗ-сигнала частоте его встречаемости – частичное.

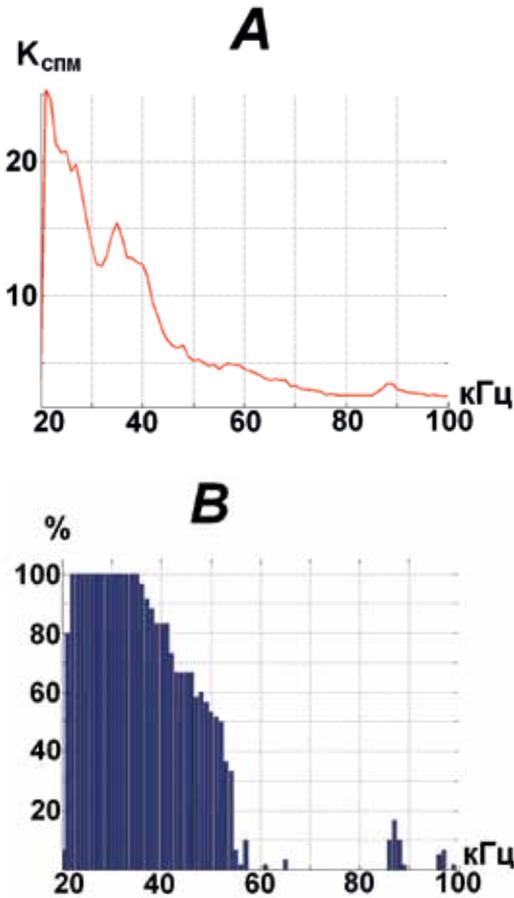


Рис 6. Ультразвуковая вокализация мини-свиней. А – график спектральной мощности. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. Остальные обозначения см. рис.1.

Анализ СПМ ультразвука мини-свиней показал, что максимальные значения СПМ ($K_{СПМ} = 25-26$) приходились на частоту около 21-22 кГц (рис. 6А), также имелись дополнительные пики в области 27-28 кГц ($K_{СПМ} = 20$) и

35 кГц ($K_{СПМ} \approx 16$). Далее, как и у кроликов, СПМ ультразвука снижалась с нарастанием частоты. Наиболее часто регистрируемый частотный диапазон – 21-37 кГц (100% случаев), а в областях 58-61, 62-65, 66-87, 89-96, 97-98 и 99-100 кГц ультразвук вообще не встречался (рис. 6В). Частота встречаемости УЗ-сигнала в данном случае напрямую связана с его мощностью.

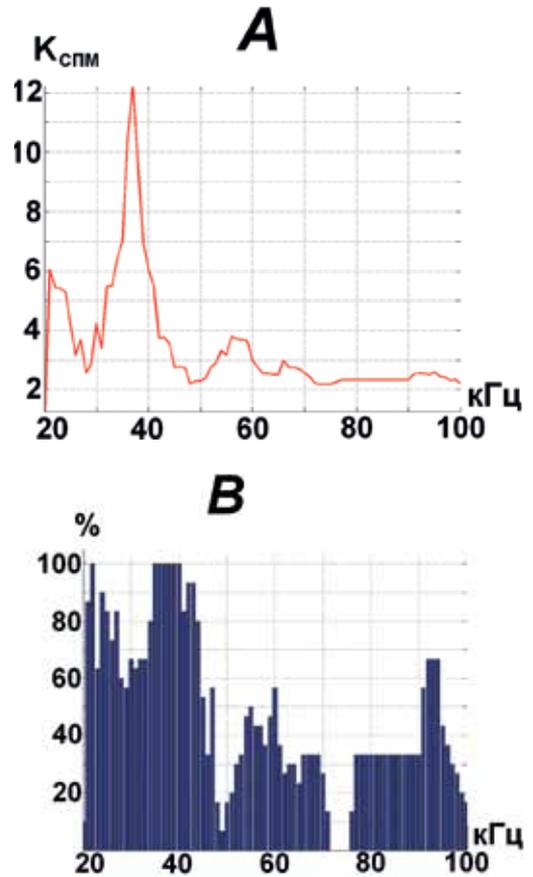


Рис 7. Ультразвуковая вокализация обезьян. А – график спектральной мощности. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. Остальные обозначения см. рис.1.

Для ультразвука, излучаемого макаками резусами, характерно наличие основных пиков СПМ в диапазоне ~ 20-

40 кГц, с максимумом ($K_{\text{СПМ}} > 12$) в области 37-38 кГц (рис. 7А). Имеются низкоамплитудные пики СПМ ультразвука в диапазоне ~ 48-67 кГц, после чего мощность сигнала падает с возрастанием частоты. Минимум значений СПМ зафиксирован в районе 20 кГц ($K_{\text{СПМ}} < 2$). Распределение числа случаев обнаружения ультразвука (рис. 7В) показало, что чаще всего в вокализации данных животных встречаются частоты 22 и 35-41 кГц (100% случаев), реже всего – в области 72-76 кГц (0%). Таким образом, прослеживается частичная зависимость двух вышеописанных показателей.

Информативные параметры УЗВ человека

СПМ УЗВ человека при физической нагрузке характеризуется постепенным снижением этого показателя с нарастанием частоты (рис. 8А), однако отмечаются пики небольшой амплитуды на частотах в области 22 (максимальный $K_{\text{СПМ}} > 6$), 45, 57 кГц, а также повышение мощности и возникновение плато в диапазоне 60-80 кГц. Минимум значений СПМ зафиксирован на частоте 20 кГц ($K_{\text{СПМ}} \approx 2$). Пики на спектрограмме также соответствуют вероятности обнаружения ультразвука сопоставимых частот (рис. 8В), где области 46-48 кГц и 56-58 кГц встречаются в 100% случаев, а 21 кГц – примерно в 8%.

При анализе графика СПМ УЗВ человека можно заметить определенное сходство с аналогичными картинками УЗВ у разных животных. В значительной степени профиль СПМ УЗВ человека совпадает в диапазоне 20-30 кГц с таковыми изменениями у мышей, хомяков,

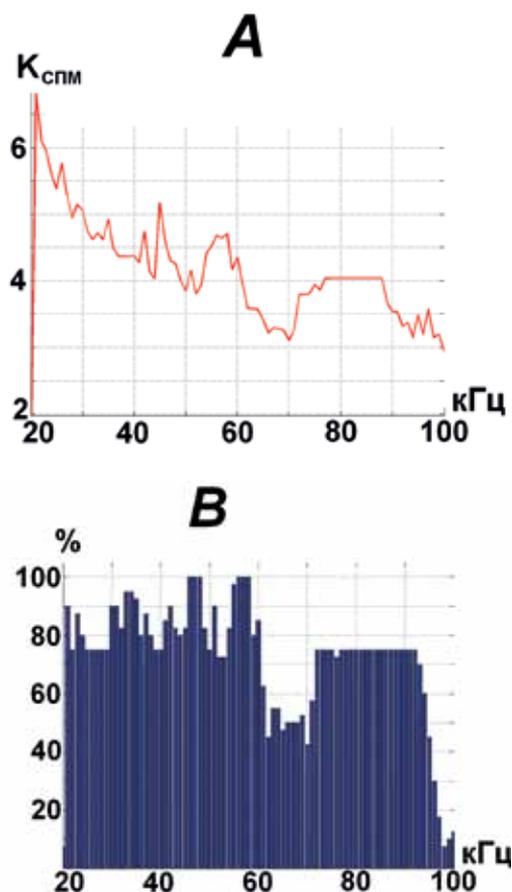


Рис 8. Ультразвуковая вокализация человека. А – график спектральной мощности. В – распределение числа случаев обнаружения ультразвука. Остальные обозначения см. рис.1.

кроликов и мини-свиней. В то же время отдельные элементы графиков СПМ УЗВ крыс, морских свинок, обезьян совпадают с СПМ УЗВ человека в диапазоне около 40 кГц. У человека и всех исследованных животных имеются совпадения в диапазоне около 60 кГц. Подобные совпадения УЗВ человека и животных создают экстраполяционную привлекательность, но требуют серьезного анализа физических процессов, лежащих в основе УЗВ, и их дальнейшей физиологической и психоэмоциональной интерпретации.

Изменение параметров УЗВ при стрессе

Нами были проведены исследования, целью которых являлось изучение влияния иммобилизации, электрокожного раздражения и физической нагрузки как факторов стресса для лабораторных крыс на ультразвуковую вокализацию животных и оценка длительности стресс-периода [5]. Были получены следующие результаты: при иммобилизации (создавалась путем помещения крысы на 2 часа в узкий пластиковый пенал с отверстием для дыхания, исключающий возможность каких-либо движений туловища в нем) животным было характерно преимущественное отсутствие вокализации (табл. 1). Данный эффект,

апазоне 30-60 кГц по сравнению с фоновыми значениями, видимо, является следствием дискомфортного состояния, приближающегося к болевому порогу. По истечении полутора часов, для крыс были характерны отсутствие вокализации в диапазонах 20-30 и 30-60 кГц, а также (в половине случаев) ультразвуковые колебания в последнем диапазоне, значения которых приблизительно соответствуют состоянию комфорта. На основании данного факта, можно сделать вывод о том, что в этот период времени у животных наблюдается ослабление дистресса, они постепенно приходят в норму, но у них все еще отмечаются остаточные эффекты психоэмоционального шока.

Таблица 1

Иммобилизация крыс (в течение 2 часов)

Группа животных	Функциональное состояние	Интервал нахождения медиан ультразвуковых частот, кГц		
		20-30	30-60	60-80
Самцы	Комфорт	–	37,18	–
	Иммобилизация	25,38	–	–
	Последствие через 1,5 часа	–	36,99	–
Самки	Комфорт	–	39,85	–
	Иммобилизация	–	–	–
	Последствие через 1,5 часа	–	–	–

связанный с замиранием животных, а также появление ультразвуковых частот в диапазоне 20-30 кГц свидетельствуют о том, что они испытывают чувства волнения и тревоги.

Превышение в единичном случае уровня ультразвуковых колебаний в ди-

Результаты, отражающие влияние физической нагрузки (передвижение животного на вращающемся вале со скоростью 9-12 об/мин, поднятом на высоту 15 см от пола, состоящего из стальных стержней, на которые подавалось постоянное напряжение 25-35 В; длитель-

ность эксперимента составляла 40-50 минут с момента научения животного, т.е. прекращения падений с вала, окончание его определялось визуально, по снижению выносливости и физической усталости крысы, расслабляющей мышцы и падающей на электрический пол камеры), показали, что в данном функциональном состоянии у животных отмечается отсутствие ультразвука во всех диапазонах, кроме 30-60 кГц (табл. 2).

Наиболее информативными, на наш взгляд, в данном эксперименте явились результаты изучения стрессового влияния электрокожного раздражения, которое создавалось пульсирующим током такой величины, чтобы крыса не издавала звука в слышимом диапазоне (до 15 кГц). Стимуляцию осуществляли 10 минут, в течение которых крыса находилась под постоянным наблюдением. Они показали появление у обеих групп жи-

Таблица 2

Физическая нагрузка (в среднем, 45 минут)

Группа животных	Функциональное состояние	Интервал нахождения медиан ультразвуковых частот, кГц		
		20-30	30-60	60-80
Самцы	Комфорт	–	37,18	–
	Физ. нагрузка	–	52,08	–
	Последствие через 1,5 часа	–	36,98	–
Самки	Комфорт	–	39,85	–
	Физ. нагрузка	–	55,07	–
	Последствие через 1,5 часа	–	38,17	–

Усиление вокализации в данном интервале по сравнению с фоновыми значениями свидетельствовало о том, что интенсивная физическая нагрузка (не характерная для обычной жизни исследуемых животных) является для них стресс-фактором и вызывает дискомфорт. Через 1,5 часа после окончания эксперимента отмечалось уменьшение медиан частот в диапазоне 30-60 кГц и возвращение их к значением, характерным для состояния спокойного бодрствования, что позволило судить о том, что влияние данного стресса в это время, видимо, практически прекращается.

вокализации в диапазонах 20-30 и 60-80 кГц (табл. 3). Значения медиан частот в диапазоне 30-60 кГц превысили таковые в состоянии спокойного бодрствования, что, видимо, свидетельствовало о дискомфорте у животных, а наличие данных в диапазоне от 60 кГц – о превышении болевого порога. Преимущественное отсутствие вокализации в послестрессовый период и некоторое превышение значений медиан частот (в двух случаях) по сравнению с фоновыми числовыми значениями говорит, вероятно, о том, что животные, уже не испытывающие ударов током, продолжали находиться в тревожном и стрессовом состоянии.

Электрокожное раздражение (до вокализации в слышимом диапазоне)

Группа животных	Функциональное состояние	Интервал нахождения медиан ультразвуковых частот, кГц		
		20-30	30-60	60-80
Самцы	Комфорт	–	37,18	–
	Эл. раздражение	25,68	43,33	63,30
	Последействие через 1,5 часа	–	40,28	–
Самки	Комфорт	–	39,85	–
	Эл. раздражение	27,71	46,40	65,09
	Последействие через 1,5 часа	–	–	–

Согласно результатам спектрального анализа (рис. 9) эксперимента по электрокожному раздражению, основные изменения в ультразвуке, излучаемом крысами в состоянии комфорта, непосредственно при раздражении и через 1,5 ч после возвращения подопытных к обычным условиям, наблюдались в полосе 20-80 кГц. В состоянии спокойного бодрствования (комфорта) для крыс наиболее распространены были колебания 25-45 кГц, с пиком СПМ в области 38-39 кГц (-30 дБ/Гц), минимальные значения СПМ отмечались в диапазоне 80-100 кГц (> -36 дБ/Гц). При действии электрического тока СПМ в диапазоне 25-42 кГц снижалась, однако отмечалось повышение этого показателя в областях 25, 28 и 45-53 кГц, с пиком около 25 кГц (< -26 дБ/Гц). Анализ СПМ спустя 1,5 часа после выключения тока показал отсутствие преобла-

дающих частот в спектрограмме ультразвука, кроме того, мощность сигнала в последствии тока характеризовалась низкими значениями (примерно -36 дБ/Гц и более).

Статистически достоверных различий медиан и СПМ УЗВ у крыс при моделировании и иммобилизации физической нагрузки, электрокожного раздра-

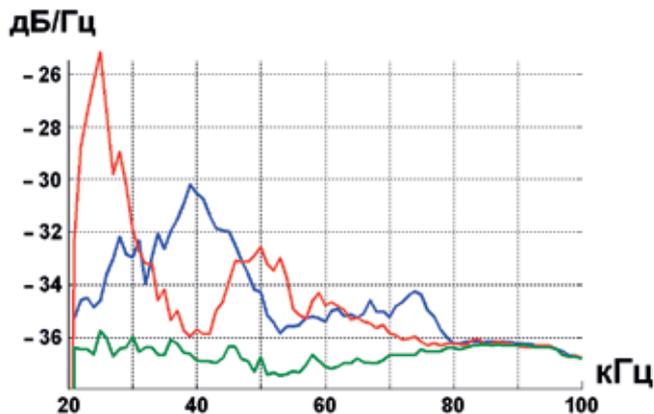


Рис 9. График спектральной мощности ультразвука у крыс в различных условиях. По оси абсцисс – частота, кГц; по оси ординат – спектральная плотность мощности в логарифмической шкале, дБ/Гц. Синяя линия – исходное состояние спокойного бодрствования, красная – СПМ УЗВ при электрокожном раздражении, зеленая линия – изменение СПМ УЗВ спустя 1,5 часа после электрокожного раздражения.

жения и иных видов стрессорного воздействия в диапазоне 80-100 кГц в сравнении со спокойным бодрствованием обнаружено не было. Поэтому в табл. 1-3 эти данные не приводятся. Для сравнения см. график на рис. 9, с реальными значениями в дБ/Гц.

Изменение параметров УЗВ при агрессии и тревоге

Установив, что различные функциональные, стрессовые и др. состояния оказывают влияние на вокализацию животных в ультразвуковом диапазоне, нами был также проведен опыт по изучению вокализации крыс в состоянии агрессии и тревоги (т.н. «бой самцов»). Эксперимент проводился на 2 пятимесячных самцах крыс линии WAG/GY. Животные помещались в клетку с электризованным полом, и в течение 5 минут записывалась их вокализация в обычном

(комфортном) состоянии. Затем, в этой же клетке, с помощью подачи тока (25-35 В) добившись агрессивного поведения самцов по отношению друг к другу, записывали ультразвук (одним микрофоном у двух самцов одновременно).

СПМ ультразвука в состоянии «боя самцов» по сравнению с состоянием комфорта (рис. 6А) характеризовалась ростом этого показателя на несколько порядков в диапазонах 20-30 и 45-70 кГц (рис. 10), с пиком в области 22-23 кГц (СПМ = -10 дБ/Гц). Наименьшие значения СПМ в данном состоянии зафиксированы около 97-100 кГц (> -35 дБ/Гц).

Интерпретация результатов и возможные механизмы УЗВ

Охарактеризовав исследованные объекты (животных и человека) по количеству эпизодов, в которых регистрировался ультразвук в эксперименте, и, выстроив убывающий ряд, где на первом месте находятся хомяки, а на последнем – человек, можно сделать заключение о том, что для подобных исследований, опирающихся на анализ ультразвуковой вокализации, наиболее адекватными и информативными объектами изучения являются хомяки и крысы, т.к. эти животные издают УЗВ чаще других.

Анализ СПМ ультразвука показал, что данные эксперимента можно условно разделить на 4 группы по графическому сходству из-

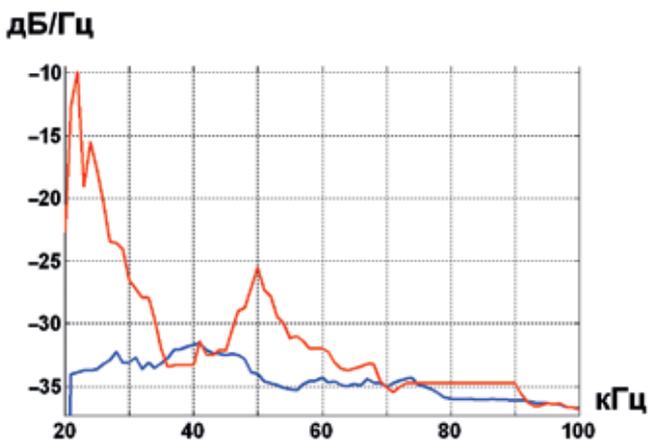


Рис 10. График изменения спектральной мощности ультразвука у крыс в состоянии «боя самцов». По оси абсцисс – частота, кГц; по оси ординат – спектральная плотность мощности в логарифмической шкале, дБ/Гц. Синяя линия – исходное состояние спокойного бодрствования, красная – спектральная плотность мощности во время «боя самцов».

менений. Первая группа данных включает результаты, полученные от мышей. Во вторую группу мы отнесли результаты, зафиксированные у кроликов, мини-свиней и хомяков. Общность изменений также характерна и для ультразвуков, излучаемых макаками резусами, крысами и морскими свинками (третья группа результатов). К четвертой группе нами был отнесен человек.

Охарактеризовав животных и человека по мощности ультразвукового сигнала и сгруппировав данные по убыванию этого признака, получим следующий ряд: морские свинки → мини-свиньи → кролики → обезьяны → крысы → хомяки → человек → мыши. Таким образом, морские свинки, например, издают небольшое количество ультразвуковых сигналов в состоянии спокойного бодрствования, но они – наиболее мощные. А ультразвуковая вокализация мышей в сходном состоянии практически не выражена или отсутствует. Данный факт подтверждает имеющиеся сведения о том, что вокализация мышей обычно связана с состоянием, отличным от состояния спокойного бодрствования, размножением и т.д. (т.е. в покое не наблюдается) и условно разделяется на 2 вида – «40-кГц» и «70-кГц» – вокализация [16]. Мощность УЗВ-сигнала мини-свиней, возможно, коррелирует с таковой звука в слышимом диапазоне в силу их видовых особенностей («шумные» животные), встречаемости кратных частот и т.д.

Анализ СПМ ультразвука крыс подтвердил литературные данные о том, что этим животным характерна т.н. «22-кГц ультразвуковая вокализация» (диапазон 20-30 кГц), и, в силу того, что исследо-

вания связаны с транспортным стрессом, возможно, она является моделью изучения тревожного состояния взрослых крыс, вызывающего страх [14].

Мы полагаем, что вероятность регистрации УЗВ коррелирует с остротой слуха животных, поэтому редкость встречаемости частот в области 75-100 кГц связана с тем, что большинство животных этих звуков не слышит и, соответственно, не воспроизводит [1].

Анализируя результаты эксперимента с электрокожным раздражением, можно сделать вывод о том, что данный стресс-фактор усиливает ультразвуковую вокализацию крыс, что соответствует результатам опыта, проведенного M.Weber, G.Paxinos и R.Richardson [15]. Оценивая результаты наших экспериментов с «боем самцов», можно сказать о том, что частота ультразвуковой вокализации, равная приблизительно 50 кГц, связана со стрессовым состоянием данных животных, что также подтверждает имеющиеся сведения [13].

Доказано, что ультразвуковая вокализация в интервале частот 20-30 кГц отражает отрицательные состояния, сходные со страхом и унынием у человека [11, 18, 19]. Высокочастотная вокализация (50 кГц) имеет частоту пика энергии 32-96 кГц, звуки имеют узкий диапазон (1-7 кГц), но более короткую длительность (30-50 мсек), чем 22 кГц вокализация [18, 19]. Выделяют два подтипа 50 кГц-вокализации. Первый из них связан с приятными ощущениями (юношеские игры, спаривание, еда, электростимуляция мозга и др.), второй, напротив, – с отрицательной стимуляцией (запах кота, звук шагов, яркий свет). 50-кГц вокализация может быть индикатором

комфортных и дискомфортных состояний второго типа, представляющим гомологию радости человека [18].

Появляется все больше данных о том, что УЗВ крыс полностью зависит от ситуации, опыта животного и может отражать его различные эмоциональные состояния. В частности, УЗВ взрослых крыс наблюдается в ожидании искусственного вознаграждения, фармакологического воздействия или при электростимулировании медиального пучка переднего мозга [4, 9]. Предполагается, что УЗВ такого рода отражает положительное аффективное состояние, сродни радости у человека [9, 12].

Наряду с попытками физиологической интерпретации механизмов УЗВ [6, 11, 16, 17, 19], в самое последнее время появились сообщения о молекулярно-генетических механизмах восприятия и генерации ультразвука млекопитающими. Группа ученых [20, 21, 22] из Мичиганского и Лондонского университетов изучили изменения синтеза белка престина, а также генов, ответственных за этот процесс, под воздействием ультразвука. В этих условиях престин способен удлинять волоски клеток улитки внутреннего уха и, вследствие этого, усиливать звуковой сигнал определенной частоты. Были использованы гены, отвечающие за синтез престина у 25 различных видов млекопитающих (дельфины, собаки, коровы, мыши, свиньи, кошки, летучие мыши). Хотя в этой группе только летучие мыши, киты и дельфины способны к ориентированию с помощью эхолокации, у всех животных имеется определенная схожесть гена престина.

Однако, несмотря на то, что летучие мыши и дельфины произошли в ходе

эволюции от совершенно разных животных, они оказались ближайшими родственниками по генетическому коду престина. Дело в том, что в процессе конвергентной молекулярной эволюции как у китов, так и у летучих мышей происходила замена одних и тех же аминокислот в молекуле престина до такой степени, что они приобрели большое сходство и похожий современный вид. Для нас существенно важно, что одним из выводов этих исследователей является способность престина, содержащего весьма ограниченное количество аминокислотных последовательностей, активно функционировать для усиления ультразвуковых колебаний.

Таким образом, животные и человек способны генерировать сигналы в ультразвуковом диапазоне. Нами установлены сходства и различия информативных параметров УЗВ, которые позволяют использовать УЗВ как инструмент при моделировании разнообразных психоэмоциональных состояний, включая стрессорное воздействие, а также для исследования эффектов фармакологических средств. Полученные данные позволяют осуществлять экстраполяцию результатов исследований на лабораторных животных в отношении человека.

Выводы

1. Ультразвуковая вокализация в состоянии покоя характерна всем исследованным нами лабораторным животным (мыши, крысы, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи, обезьяны), а также человеку, но у людей эти феномены УЗВ ярче проявляются при физической и психоэмоциональной на-

грузке.

2. Наиболее адекватными животными, используемыми в качестве биомodelей в экспериментах по оценке функционального состояния методом анализа УЗВ, вероятно, являются хомяки и крысы.

3. Ультразвук мышей характеризуется преобладанием частот в диапазонах 20-30 кГц и 45-60 кГц.

4. Для кроликов, мини-свиней и хомяков характерна ультразвуковая вокализация частотой 20-25 кГц, в меньшей степени – 35 кГц; также хомяки способны излучать ультразвук частотой приблизительно 55 кГц.

5. Основная частотная составляющая ультразвука макак резусов, крыс и морских свинок лежит в диапазоне 30-50 кГц с пиком в области 37-42 кГц.

6. Спектральная плотность мощности ультразвука человека при физической нагрузке содержит пики небольшой амплитуды на частотах, приблизительно равных 20 кГц, 45, 55 кГц; также отмечается плато в диапазоне 60-80 кГц. Общая тенденция спектрограммы УЗВ человека характеризуется плавным гиперболическим снижением мощности сигнала по мере возрастания частоты.

7. Доминирование УЗВ в диапазоне 20-30 кГц отображает дистрессорное состояние, тогда как 50-55 кГц характеризуют, в зависимости от перераспределения мощностных характеристик СПМ, комфортное или дискомфортное состояние. Эти проявления характерны для всех исследованных нами животных и человека.

8. Способность человека и животных генерировать ультразвуковые колебания в сопоставимых диапазонах частот

позволяет использовать информативные параметры УЗВ для экстраполяции результатов исследований на лабораторных животных в отношении человека.

Список литературы

1. **Акопян В.Б., Ершов Ю.А.** Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э.Баумана. – 2005. – с. 224.
2. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК. – 2007. – с. 448.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. **Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева.** – М.: Профиль-2С. – 2010. – с. 358.
4. **Каркищенко Н.Н.** Фармакология системной деятельности мозга. – Ростов-на-Дону: Ростиздат. – 1975. – с. 260.
5. **Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н.** Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. – 2010. – № 5. – с. 17-21.
6. **Blumberg M.S., Sokoloff G.** Do infant rats cry? // Psych Rev 108:83-95. – 2001.
7. **Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Francis D., Plotsky P.M., Meaney M.J.** Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. 95. – 5335-40.
8. **Gourbal B.E.F., Barthelemy M., Petit G., Gabrion C.** Spectrographic

analysis of the ultrasonic vocalizations of adult male and female Balb/c mice // *Naturwissenschaften*. – 2004. – 91:381-385.

9. **Groenink L., Verdouw P.M., Ruud van Oorschoot, Olivier B.** Models of Anxiety: Ultrasonic Vocalizations of Isolated Rat Pups // *Current Protocols in Pharmacology*, UNIT 5.18 / http://www.currentprotocols.com/protocol/ph0518?quicktabs_cp=to, December. – 2008.

10. **Hashimoto H., Moritani N., Aoki-Komori S., Tanaka M., Saito T.R.** Comparison of ultrasonic vocalization emitted by rodent pups // *Exp Anim.*, – 2004. – 53:409-416.

11. **Knutson B., Burgdorf J., Panksepp J.** Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats // *Psychol Bull.* – 2002. – 128:961-977.

12. **Panksepp J., Burgdorf J.** «Laughing» rats and the evolutionary antecedents of human joy? // *Physiology and Behavior*. – 2003. – 79. 533-47.

13. **Portfors C.V.** Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice // *J Am Ass Lab An Sci.* – 2007. – Vol. 46. – No. 1. – pp. 28-34.

14. **Sanchez C.** Stress-induced vocalization in adult animals. A valid model of anxiety? // *Eur J Pharmacol.* – 2003. – 28;463(1-3):133-43.

15. **Weber M., Paxinos G., Richardson R.** Conditioned Changes in Ultrasonic Vocalisations to an Aversive Olfactory Stimulus are Lateralized in 6-Day-Old Rats // <http://www2.psy.unsw.edu.au/Users/richardson/PDF/WeberPaxinosRichardson2000.pdf>, ed. –2000.

16. **White N.R., Prasad M., Barfield R.J., Nyby J.G.** 40- and 70-kHz vocalizations of mice (*Mus Musculus*) during copulation // *Physiology and Behavior*, 63 (43), 467-473.

17. **Wöhr M., Borta A., Schwarting R.K.W.** Overt behavior and ultrasonic vocalization in fear conditioning paradigm: A dose-response study in the rat // *Neurobiol Learn Mem.* – 2005. – 84:228-240.

18. **Wöhr M., Houx B., Schwarting R.K.W., Spruijt B.** Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats // *Physiology and behavior*. – 2008. – 93. – pp. 766-776.

19. **Wöhr M., Rainer K.W. Schwarting** Ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation in rodents // <http://www.avisoft.com/rats.htm>. – 2010.

20. **Yang Liu, James A. Cotton, Bin Shen, Xiuqun Han, Stephen J. Rossiter, Shuyi Zhang.** Convergent sequence evolution between echolocating bats and dolphins // *Current Biology* – 2010. – 20(2) – pp. R53-R54.

21. **Yang Liu, Stephen J. Rossiter, Xiuqun Han, James A. Cotton, Shuyi Zhang.** Cetaceans on a Molecular Fast Track to Ultrasonic Hearing // *Current Biology* – 2010. – 20(20) – pp. 1834-1839.

22. **Yang Liu, Zhen Liu, Peng Shi, Jianzhi Zhang.** The hearing gene Prestin unites echolocating bats and whales // *Current Biology* – 2010. – 20(2) – pp. R55-R56.

23. **Zippelius H.M., Schleidt W.M.** Ultraschall-Laute bei jungen Mäusen // *Naturwissenschaften* – 1956. – 43, 502.

Ultrasonic vocalization and its informative parameters in animals and man

N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, D.S. Sakharov, V.N. Karkischenko,
G.D. Kapanadze, D.B. Chayvanov

For the first time in our scientific research we discovered that ultrasonic vocalization is typical for all laboratory animals that we studied in rest condition (mice, rats, hamsters, guinea pigs, rabbits, minipigs, monkey) as well as for human. In human these manifestations of USV are shown more graphic under physical and psychoemotional load. The most adequate animals that are used as biomodels in experiments of estimation of functional condition by USV analyzing method probably are hamsters and rats. For rabbits, minipigs and hamsters ultrasonic vocalization of 20-25 kHz frequency is typical and in less extent hamsters are capable to radiate ultrasound frequency approximately 35 kHz; and also hamsters are capable to radiate ultrasound frequency approximately 55 kHz. The basic frequency component of ultrasound of macaca mulatta, rats and guinea pigs lies in a range 30-50 kHz with peak in the field of 37-42 kHz. Spectral density of man's ultrasound power under physical load contains peaks of small amplitude approximately at 20, 45, 55 kHz frequency; also we can mark tableland at the range of 60-80 kHz. Dominance USV in range 20-30 kHz reflects distress, at the same time 50-55 kHz USV characterized comfort or discomfort status in dependence of redistribution of spectral power density characteristics. The general tendency of spectrogram USV of man is characterized by smooth hyperbolic drop of capacity of a signal in process of frequency increase. Mans and animals ability to generate ultrasonic fluctuations in comparable frequency ranges allows to use informative parameters USV for extrapolation of results of probes on laboratory animals concerning the man.

Key words: ultrasonic vocalization (USV) in mice, rats, hamsters, guinea pigs, rabbits, minipigs, monkey and human, USV-communications, spectral power density of USV, probability of occurrence of US-signals, informative characteristics extrapolation on man.



Современные методы фармакоэлектроэнцефалографии в оценке фармакодинамики средств для тотальной внутривенной анестезии

В.М. Женило, О.Ю. Соколов, В.В. Хоронько, М.В. Женило,
О.М. Куделина, О.А. Махарин, Н.В. Карнушина, И.М. Зооль Ахмед

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контактная информация: sokolov@rnd.runnet.ru Олег Юрьевич Соколов

Современные средства для тотальной внутривенной анестезии (ТВВА) позволяют повысить показатели управляемости неингаляционного наркоза. При этом ежегодно регистрируется большое число случаев интраоперационного пробуждения пациентов, отражающего неадекватность процесса анестезии. В этой связи актуальной задачей современной фармакологии является поиск адекватных параметров оценки фармакодинамики средств ТВВА. Наиболее информативными показателями такой оценки сегодня являются результаты фарм-ЭЭГ исследований.

Ключевые слова: фармэлектроэнцефалография (фарм-ЭЭГ), тотальная внутривенная анестезия, спектральный анализ ЭЭГ, вызванные потенциалы

Основными концепциями современной анестезиологии являются многокомпонентность и максимальная управляемость общей анестезии. Внедрение в современную практику неингаляционных анестетиков ультракороткого действия придает внутривенной анестезии все более управляемый характер и, в этом плане, приближает ее к ингаляционной. Этому способствует техническая разработка инфузионных систем, обеспечивающих точное дозирование лекарственных средств, с возможностью «инфузии по целевой концентрации», основанной на построении фармакокинетических мо-

делей для неингаляционных анестетиков. Метод «инфузии по целевой концентрации» позволяет анестезиологу выбрать целевую концентрацию анестетика в крови необходимую для достижения эффекта, а затем контролировать глубину анестезии, поддерживая концентрацию препарата при помощи автоматического шприцевого дозатора [1, 3, 11].

Однако, сочетание дозозависимых эффектов и коротких периодов полувыведения средств тотальной внутривенной анестезии (ТВВА) позволяет предположить, что даже кратковременное прекращение или снижение скорости введения

препаратов может привести к выходу на более поверхностный уровень анестезии и возможному пробуждению пациента.

В этой связи в последние годы появляется все больше работ, посвященных проблеме интраоперационного пробуждения во время наркоза, когда сознание у пациента может сохраняться даже на фоне вполне адекватной, по оценке анестезиолога, анестезии [4, 6, 11, 13, 14]. Частота интраоперационных критических инцидентов колеблется от 0,1 до 4% даже при «хорошо проведенных анестезиях». При этом во время проведения хирургических операций, частота пробуждений составляет — 0,2-1,3%, в акушерстве — 2%, в кардиохирургии — 1,5-4% , в травматологии — 11-43% [13, 14].

Возможными последствиями интраоперационных критических инцидентов являются ранние когнитивные расстройства у больных, перенесших оперативные вмешательства в условиях общей анестезии. Степень выраженности этих расстройств колеблется от лёгких нарушений сна до эпизодов спутанности сознания с дезориентацией больного. Последствия изменений когнитивных функций, приводящие к неполноценному функциональному восстановлению пациентов, стали сегодня причиной многочисленных исков, связанных с неадекватным обеспечением анестезиологического пособия [14].

В такой ситуации, используемые в настоящее время критерии оценки фармакодинамики анестетиков, основанные на мониторинге только показателей центральной и периферической гемодинамики, не могут обеспечить адекватный контроль глубины анестезии [1, 2, 3, 4, 14, 28, 29]. Проблема, измерения уровня анестезии, осложняется отсутствием универсальных определений глубины наркоза. Наиболее логичным является

представление о том, что глубина анестезии — это фармакодинамическая мера угнетения ЦНС. Влияние анестетиков на глубину анестезии зависит от взаимосвязи концентрации и действия препарата, а также степени стрессорных воздействий на больного [7, 10].

Современные достижения клинической фармакологии средств для наркоза позволили уточнить значение понятий глубины и адекватности анестезии. Часто термином «глубина анестезии» определяется степень выраженности гипнотического и анальгетического эффектов, которые могут быть реализованы путем введения гипнотиков и анальгетиков. Глубина анестезии зависит от двух противоположных факторов: эффектов анестетиков, обеспечивающих различные компоненты анестезии и хирургической стимуляции с активацией симпатической нервной системы, повышением уровня сознания, вегетативных и соматических реакций [21].

По определению В.В. Лихванцева и соавт. [7], глубина анестезии является интегративной характеристикой, которая является сложной функцией концентрации анестетика в эффекторном органе (ЦНС), интенсивности боли, индивидуальной чувствительности организма к ней и действию анестетика. Глубина анестезии динамично изменяется от состояния бодрствования через различные стадии сна до передозировки и смерти. Для достижения адекватной глубины анестезии, как правило, необходимо комбинированное использование лекарственных средств.

Адекватность анестезии — состояние динамического равновесия, при котором воздействующие на человека силы (повреждающие и защищающие) наносят минимальный вред организму. Адекватность — это постоянный баланс между

интенсивностью боли и глубиной анестезии. Рациональное назначение анестетиков должно соответствовать понятию адекватности анестезии, когда при умеренной боли можно использовать более поверхностную анестезию, а при более интенсивной, необходимо углублять её [7, 10].

В связи с этим ЭЭГ контроль нейрональной активности во время наркоза считается наиболее объективным методом оценки эффективности средств ТВВА. В настоящее время для оценки фармакодинамики анестетиков используются следующие ЭЭГ методики контроля нейрональной активности:

- нативная ЭЭГ;
- информационная насыщенность ЭЭГ;
- спектральные характеристики ЭЭГ;
- корреляционный анализ;
- биспектральные характеристики ЭЭГ;
- вызванные потенциалы головного мозга.

Анализ показателей нативной ЭЭГ при проведении тотальной внутривенной анестезии

ЭЭГ имеет большое значение в качестве неинвазивного чувствительного и не требующего внешних раздражений индикатора активности средств ТВВА.

Применение мониторинга ЭЭГ для оценки действия анестетиков началось с первых шагов существования метода. Впервые изменение картины ЭЭГ во время индукции в анестезию были описаны Джибс Ф.А. в 1937 году. Основной задачей этих исследований являлась оценка глубины наркоза с тем, чтобы поддерживать его на оптимальном уровне.

Кертин Р.Ф. и соавт. [16] установили на основании динамики ЭЭГ семь стадий анестезии:

- нарушение альфа-ритма и постепенное его замещение быстрой активностью;
- появление медленных форм активности наряду с частыми колебаниями;
- снижение амплитуды биопотенциалов, нерегулярная медленная активность;
- медленная активность с периодами электрического молчания не менее 3 сек;
- периоды биоэлектрического молчания до 10 сек;
- периоды электрического молчания более 10 сек, чередующиеся со вспышками медленных волн невысокой амплитуды;
- полное электрическое молчание.

Фолкнер и Бикфорд [18] описали характерные изменения ЭЭГ под влиянием различных анестетиков, которые проявляются в замедлении частоты и первоначальным подъемом, за которым следует снижение амплитуды ЭЭГ в зависимости от клинического диапазона глубины анестезии. Такие изменения наблюдаются при применении большинства современных анестетиков. Позднее были проведены исследования по определению стадий общей анестезии на основе ЭЭГ при различных видах мононаркоза [17, 24, 25]. Изменения ЭЭГ зависят от дозы вводимого препарата, а также скорости и способа введения. Из публикаций Гусева Е.И., Женило В.М., Казанцевой Н.В., Каркищенко Н.Н., Скворцовой В.И. следует, что при введении большинства известных анестетиков имеется линейная зависимость степени изменений ЭЭГ от дозы вводимого препарата. В то же время некоторые группы препаратов почти всегда вызывают специфические изменения ЭЭГ независимо от дозы лекарства и типа ЭЭГ, регистрируемой до начала лечения [8, 11].

Многочисленные исследования посвящены изучению взаимосвязи между из-

менениями ЭЭГ и концентрациями анестетиков в крови. ЭЭГ «шаблоны» были успешно применены для титрования доз барбитуратов, пропофола, мидазолама, во время вводного наркоза. [11, 13, 20, 25, 29].

Отмечено, что на фоне неадекватной анестезии в головном мозге развивается «реакция активации», выражающаяся в десинхронизации ЭЭГ и переходе к более быстрой электрической активности [2]. Изучение ЭЭГ реакций на сенсорную стимуляцию позволяет создавать модели с управляемой обратной связью для автоматизации ТВВА [11].

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что применяемые сегодня средства для ТВВА оказывают различное влияние на параметры ЭЭГ. При использовании пропофола ЭЭГ характеризуется первоначальным увеличением альфа-ритма с последующим преобладанием тета и дельта-волновой активности [1]. При высоких дозах анестетиков может появиться эпилептиформная активность из-за подавления тормозных стволовых уровней, при дальнейшем нарастании концентрации анестетика удлиняются периоды подавления ЭЭГ, которые затем могут перейти в отсутствие электрической активности на ЭЭГ. Эпилептиформная активность на ЭЭГ характерна для наркоза диссоциативными анестетиками (кетамин).

Анестезия кетаминотом характеризуется преобладанием высокоамплитудного тета-ритма в лобных отделах. При увеличении дозы отмечается прерывистая полиморфная дельта-активность очень высокой амплитуды сочетающаяся с бета-активностью низкой амплитуды [21, 25].

Введение мидазолама сопровождается появлением на ЭЭГ высокоамплитудного бета-ритма в передних отделах по-

лушарий мозга, альфа-ритм при этом менее выражен, могут нарастать медленные волны [20].

Опиоиды вызывают дозозависимый эффект, а именно снижение частоты и увеличение амплитуды ЭЭГ. Однако, в зависимости от первоначальной дозы и выбранного препарата, ЭЭГ возвращается к исходной с преобладанием альфа и бета-активности. ЭЭГ картина соответствует фармакокинетическим параметрам опиоидов. При назначении ремифентанила отмечается наиболее быстрое восстановление исходной ЭЭГ [11, 28].

Изучение восстановления исходных параметров ЭЭГ при выходе больного из наркозного сна используется для оценки процессов восстановления нейрональной активности в посленаркозном периоде. При изучении ЭЭГ после назначения анестетиков, применяемых для ТВВА, было установлено, что препараты и их комбинации оказывают различное по длительности депримирующее воздействие на мозг (от получаса до 18 часов и более). Исходная биоэлектрическая активность головного мозга после применения средств ТВВА изначально восстанавливается в подкорковых структурах и позже — в коре [1].

При визуальном анализе ЭЭГ можно характеризовать морфологию волн, их частоту, амплитуду, характер распределения по коре и, таким образом, составить представление о диффузных и локальных изменениях функционального состояния мозга. Однако, в условиях операционной при динамическом наблюдении этот процесс становится весьма трудоемким и сложным с позиции интерпретации результатов и оценки фармакодинамических параметров средств ТВВА. В такой ситуации компьютерная обработка исходного сигнала ЭЭГ позволяет

оптимизировать процесс оценки фармакодинамики анестетиков, применяемых для ТВВА. Методы анализа ЭЭГ основаны на контроле изменений в спектре ЭЭГ или в формальном спектре мощности, а также на некоторых простых оценках средней амплитуды или средней частоты.

Информационная насыщенность ЭЭГ

Для количественной оценки фармакодинамики средств ТВВА используется метод изучения информационной насыщенности ЭЭГ (ИНЭЭГ). Метод основан на определении количества информации, которую заключает в себе нативная электроэнцефалограмма. Она определяется в процентах из отношения дисперсии сигнала, полученного сжатием нативной ЭЭГ, к дисперсии исходной ЭЭГ. Установлено, что увеличение потока импульсации (прежде всего болевой) с периферии ведет к повышению уровня ИНЭЭГ. Введение анестетика в этих случаях приводило к снижению информационной насыщенности независимо от изменений других мониторируемых параметров [8, 10].

Спектральный анализ ЭЭГ в изучении фармакодинамики средств ТВВА

Оценка спектра при помощи преобразования Фурье

Наиболее популярным методом, используемым в фарма-ЭЭГ исследованиях анестетиков является компрессионный спектральный Фурье — анализ, основанный на преобразовании составляющих ЭЭГ колебаний и графическом их разложении на ряд гармонических частот. Достоинством данного метода является его доступность, возможность длительной регистрации спектров, представление

их в сжатой форме, возможность количественной оценки результатов и их сопоставления. Спектральный анализ мощности частот спектра описывает распределение мощности по различным частотам, которые, являются составляющими нативной ЭЭГ эквивалентно квадрату их амплитуды. Из этих распределений мощности выделяют единичные параметры [5, 18, 25].

Оценка спектра авторегрессионным моделированием (линейное предсказание)

Метод авторегрессионного анализа или моделирования принципиально отличается от преобразования Фурье. В последнем сигнал анализируется без учета его особенных характеристик, тогда как именно особенные характеристики сигнала используются для вычислений и формируют интегральную часть авторегрессионного анализа, пока «модель» (в математическом, а не физиологическом смысле) имитации реального сигнала не будет сформирована. Авторегрессионный анализ известен как параметрический метод, так как параметры моделирования сигнала детерминированы. Тогда как преобразование Фурье — это непараметрический метод [5].

Краевая частота спектра

Среди наиболее распространенных фармакодинамических параметров оценки эффективности средств ТВВА можно отметить краевую частоту спектра ЭЭГ 90% и 95% (SEF 90 и SEF-95) и среднюю частоту спектра 50% (SEF 50 или MDFr). Краевая частота спектра определяется отношением мощности выбранного участка частотного диапазона ЭЭГ, в который входит не менее 90% или 95% мощности

данной частоты к общей мощности спектра, а соответственно средняя частота — частота, на которую приходится не менее 50% общей мощности сигнала.

Считается, что SEF выражает степень замедления и ускорения ЭЭГ активности. Под действием большинства из применяемых средств ТВВА в динамике SEF отмечается дозозависимая тенденция к снижению. Спектральные характеристики ЭЭГ закономерно изменяются в условиях мононаркоза, однако различные комбинации анестетиков, анальгетиков и других лекарственных средств могут вызвать изменения SEF, не соответствующие выраженности гипнотического действия каждого из средств ТВВА [7]. Причина такого несоответствия в том, что спектральные методы оптимальны для регулярных (синусоидальных, симметричных) периодических сигналов, но применимость этих методов становится весьма ограниченной, когда сигналу присуща хаотическая динамика, внутренняя нерегулярность без острых пиков и хорошо разграниченных частотных полос [10].

Одним из возможных методов анализа нестационарности ЭЭГ при ТВВА является постоянное измерение амплитуды или частоты ЭЭГ, или комбинации того и другого. Было установлено, что разные соотношения частоты и амплитуды наблюдались при максимальном возбуждении пациентов и на фоне выраженной седации. В настоящее время используется система непрерывного определения кратковременной средней частоты (в отличие от частот, полученных при пересечении нулевой линии) и средней амплитуды. Для оценки интенсивности гипнотических эффектов анестетиков используется «индекс нерегулярности», рассчитываемый из энтропии спектра мощности [25].

Корреляционный анализ

Наряду со спектральными методами анализа ЭЭГ, дающими ее амплитудно-частотную характеристику, для оценки фармакодинамических параметров средств ТВВА используют методы корреляционного анализа, отражающие взаимоотношения ритмов ЭЭГ между отдельными точками мозга внутри одного полушария или между полушариями (кросс-корреляция, когерентность) или между различными эпохами и по разным ритмам в одном отведении (автокорреляция, биспектральный индекс) [5, 14, 15, 20, 21, 22, 25, 26, 28].

Попытки преодолеть трудности при использовании мониторинга ЭЭГ с математическими методами обработки породили к жизни множество систем анализа, которые направлены на сокращение объема полученной информации, выражение ее в количественных параметрах, сокращение времени обработки полученных данных, желательно в текущем времени. Лопес да Сильва [23] насчитал 174 различные системы автоматического анализа ЭЭГ. Среди подобных систем можно отметить использование автокорреляционного анализа для оценки коматозного состояния. Монитор ЭЭГ, разработанный С.М. Бородкиным, позволяющий в текущем времени производить регистрацию и анализ ЭЭГ с цифровым и графическим представлением спектров мощности и когерентности биоэлектрических процессов мозга. Клиническое применение нашел монитор функций мозга (МФМ), разработанный и сконструированный Мэйнардом Д. с целью использовать достоинства ЭЭГ, как метода прямого измерения функций мозга [9].

Биспектральный индекс

В середине 90-х годов на рынке медицинского оборудования появились первые мониторы ЭЭГ фирмы Aspect Medical System, Inc (США) с новой функцией расчета, так называемого биспектрального индекса (Bispectral Index, BIS). Вычисление биспектрального индекса состоит из двух этапов. Первый этап заключается в создании базы данных. Первоначально была создана база данных на основе записей нативной энцефалограммы (около 5000) больных во время операций и добровольцев, которым проводилась общая анестезия прополом, мидазоламом, тиопенталом, изофлюраном, севофлюраном, различными опиоидами и закисью азота, а также клинических данных (показателей центральной и периферической гемодинамики); результатов различных тестов, определяющих уровень седации и экспертных заключений специалистов. В дальнейшем, при помощи различных статистических методик проведен поиск наилучших корреляций между клиническими показателями (уровнем седации) и результатами биспектрального и спектрального анализа ЭЭГ. На основе этих результатов была создана библиотека изменений ЭЭГ и соответствующих им клинических состояний. Затем была построена многофакторная статистическая модель, способная предсказать тот или иной уровень седации, независимо от выбранного анестетика, на основе комбинаций из различных показателей ЭЭГ. Вторым этапом является собственно работа монитора. После удаления артефактов, нативная ЭЭГ посекундно обрабатывается в двух режимах спектральном и биспектральном. Эти участки сравниваются с библиотекой базы данных, полу-

ченной на предшествующем этапе исследований, в электронной памяти монитора. Далее, на основе многофакторной модели комбинируется значение BIS, которое в числовом виде от 100 до 0 линейно соответствует уровню седации пациента. BIS индекс — это число на шкале от 0 до 100, соотносящееся с конкретными клиническими состояниями, наблюдаемыми у пациентов в период действия анестетика. BIS индекс, близкий к 100, означает бодрствование, а 0 указывает на полное отсутствие мозговой активности (т.е. изолинию на ЭЭГ). Если индекс BIS снижается ниже 70, резко уменьшается вероятность формирования воспоминаний о процедуре, а падение BIS ниже 60, указывает на крайне низкий уровень сознания пациента. BIS ниже 40 означает еще большее воздействие анестетика на угнетение функциональной активности мозга больного — такие низкие значения BIS определяются, в основном, высокой степенью подавления ЭЭГ [28]. Проспективные клинические исследования показали, что поддержание BIS индекса на уровне 40-60 обеспечивает адекватный анестезиологический эффект и улучшает процесс выхода пациента из наркоза [13, 20, 24, 25, 29]. Большинство авторов указывают на высокую корреляцию между степенью гипнотического эффекта и уровнем BIS при использовании средств для ТВВА. Аналогично BIS индексу в последние годы для оценки эффективности средств ТВВА получило распространение использование мониторов на основе оценки индекса состояния мозга (cerebral state index, CSI) [17].

Вызванные потенциалы

Вызванные потенциалы (ВП) — это ответы ЦНС на специфические внеш-

ние стимулы. На сегодня существует более двадцати хорошо изученных компонентов ВП. Однако с целью контроля глубины проводимой анестезии в клинике нашли применение: сомато-сенсорные (ССВП) и слуховые (аудио) вызванные потенциалы (АВП) [3, 5, 11, 25]. В основе этого метода лежит исследование вызванной биоэлектрической активности головного мозга. Установлено, что латентность ВП отражает уровень общего угнетения ЦНС. Что касается АВП, то было отмечено, что с углублением анестезии происходит снижение амплитуды и увеличение латентности ответов [11]. Средства ТВВА практически не изменяют стволовые компоненты ВП. Кортикальный компонент, мультисинаптический по своей природе, чувствителен и угнетается большинством средств ТВВА в зависимости от их дозировки [3, 11]. Латентность одного из компонентов АВП -№ по мнению ряда исследователей является наиболее чувствительным параметром для оценки гипнотических свойств средств ТВВА [3, 11, 15, 25, 27]. В последние годы появились автоматизированные мониторы для оценки эффектов анестетиков на основании индекса контроля глубины анестезии. В основе расчета данного индекса положены параметры латентности АВП [21, 24].

Разрабатываются методы оценки фармакодинамики средств ТВВА на основе изучения ноцицептивных вызванных потенциалов [4].

Значительное разнообразие используемых моделей фарма-ЭЭГ свидетельствует о том, что пока не найдено единое адекватное феноменологическое описание ЭЭГ-сигнала для оценки фармакодинамики средств ТВВА. При этом необходимость адекватного контроля фармако-

логических эффектов данной группы лекарственных средств в целях обеспечения безопасности пациентов и оптимизации ТВВА остается важнейшей задачей современной фармакологии.

Список литературы

1. **Буналян А.А.** Рациональная фармакоанестезиология: Руководство для практикующих врачей — М.: Литтера, 2006. — Т. 14. — 560 с.
2. **Виноградов В.Л.** Мониторинг глубины анестезии // практическое руководство по анестезиологии. — М.: Медицинское информационное агентство. — 1998. — с. 243-263.
3. **Женило В.М.** Современные объективные критерии адекватности общей анестезии // Анестезиология и реаниматология. — 2000. — № 3. — с. 8-10.
4. **Зайцев А. Ю.** Метод оценки анальгезии — ноцицептивные вызванные потенциалы. Первые клинические наблюдения // Анестезиология и реаниматология. — 2008. — № 5. — с. 53-55.
5. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Том 1. Основы биомедицины и фармако моделирования. — М: Изд-во ВПК. — 2007.
6. Критические ситуации в анестезиологии: Пер. с англ. / Под ред. **Д.М. Габа.** — М.: Медицина. — 2000. — с. 440.
7. **Лухванцев В.В.** Анестезия в малоинвазивной хирургии — М. Миклош. — 2005. — с. 350.
8. **Петров О.В.** Мониторинг информационной насыщенности ЭЭГ - новый интраоперационный метод оценки антиноцицептивной защиты организма. // Анестезиология и реаниматология. — 1996. — № 4. — с. 46-50.
9. **Сазонова О.Б.** Мониторинг спонтанной биоэлектрической активно-

сти мозга в нейроанестезиологии и нейрохирургии // Российский журнал анестезиологии и интенсивной терапии. — 1999. — № 1. — с. 63-71.

10. **Субботин В.В.** Информационный метод анализа ЭЭГ в анестезиологии // Журнал им. Н.И. Пирогова. — 2003. — № 3. — с. 81-84.

11. Тотальная внутривенная анестезия: Пер. с англ. / Под ред. **И. Смут, П.Уайт.** - М.Бином. — 2006. — с. 176.

12. **Федоров С.А.** Влияние интранаркозного пробуждения на развитие переходящих расстройств психики у больных в послеоперационном периоде: Дис. ... канд. мед. наук. — М. — 2008.

13. **Agarwal J.** Comparison of closed loop vs. manual administration of propofol using the Bispectral index in cardiac surgery //J. Acta Anaesthesiol. Scand. — 2009. — Vol. 53. — № 3. — p. 390-397.

14. **Avidan M.S.** Anesthesia Awareness and the Bispectral Index // N. Engl. J. of Med. — 2008. — Vol. 11. — p. 1097-1108.

15. **Bonhomme V.** Monitoring the depth of anaesthesia: why, how and at which cost? // Rev. Med. Liege. — 2007. — Vol. 62. Spec. No. — p. 33-39.

16. **Courtin R.F.** The classification and significance:of EEG-patterns produced by nitrous oxid-ether anesthesia during surgical operations // Proc. Mayo Clin. — 1950. — V.25. — p. 197.

17. **Delfino A.E.** Propofol consumption and recovery times after bispectral index or cerebral state index guidance of anesthesia //Br. J. Anaesth. — 2009. — Vol. 103. — p. 255-259.

18. **Faulconer A. Jr., Bickford R.G.** Electroencephalography in Anaesthesiology. Thomas, Springfield, Illinois. — 1960.

19. **Ghoneim M. M.** Awareness

during anesthesia: risk factors, causes and sequelae: a review of reported cases in the literature // Anesth. Analg. — 2009. — Vol. 108. — № 2. — p. 527-535.

20. **Glass P. S.** Bispectral Analysis Measures Sedation and Memory Effects of Propofol, Midazolam, Isoflurane, and Alfentanil in Healthy Volunteers // Anesthesiology. —1997. — Vol. 86. — № 4. — p. 836-847.

21. **Grover V.K.** Measuring depth of anesthesia - an overview on the currently available monitoring systems // The Indian Anesthetists' Forum. — 2008. — № 1.— p. 33.

22. **Jospin M.** Depth of anesthesia index using cumulative power spectrum // Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. — 2007. — p. 15-18.

23. **Lopes da Silva F.H.** The state of data procesing in clinical neurophysiology in Europe // EEG clin. Neurophysiol. — 1973. — Vol. 34. — p. 790-798.

24. **Mendez J.A.,** Adaptive computer control of anesthesia in humans // Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin. — 2009. — Vol. 11. — № 5 Miller, R.D.

25. **Miller R.D.** Miller's Anesthesia — USA: ELSEVIER Churchill, Livingstone. — 2005. — p. 3376.

26. **Molae-Ardekani B.** Delta waves differently modulate high frequency components of EEG oscillations in various unconsciousness levels // Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. — 2007. — p. 1294-1297.

27. **Schwilden H.** Concurrent recording of AEP, SSEP and EEG parameters during anaesthesia: a factor analysis // British Journal of Anaesthesia. — 2005. — Vol. 95. — № 2. — p. 197-206.

28. **Vanluchene A.L.** Spectral entropy measurement of patient responsiveness during propofol and remifentanil: A comparison with the bispectral index.

- Vanluchene AL, Struys MM, Heyse BE, Mortier EP: //Br J Anaesth. — 2004. — 93:645–54
29. Zhang M. - Z., Yu Q., Huang Y. - L., Wang S.-J., Wang X.-R. A comparison between bispectral index analysis and auditory-evoked potentials for monitoring the time to peak Eur. J. Anaesthesiol. — 2007. — Vol.24. — № 10. — p. 876- 881.

Modern methods pharamelectroencephalography in farmdynamics estimation for total intravenous anesthesia

V.M. Genilo, O.U. Sokolov, V.V. Horonko, M.V. Genilo, O.M. Kudelina, O.A. Maharin, N.V. Karnushina, I.M. Zool Ahmed

Modern means for total intravenous anesthesia (TIVA) allow to raise indicators of controllability of not inhalation narcosis. Thus the great number of cases intraoperational the awakening of patients reflecting inadequacy of process of anesthesia annually is registered. There is search of adequate parameters of an estimation farmdynamics means TIVA upon an actual problem of modern pharmacology. The most informative indicators of such estimation today are results farm-EEG researches.

Key words: pharamelectroencephalography (farm-EEG), total intravenous anesthesia (TIVA), the spectral analysis EEG, the caused potentials



Экспериментальное моделирование заживления хирургических ран в полости рта

К.А. Аксёнов, М.В. Ломакин, Г.Д. Капанадзе¹, Н.В. Смешко

Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва

¹ — *Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область*

Контактная информация: giyak@yandex.ru Гия Джемалиевич Капанадзе

Проблема недостаточной прогнозируемости заживления слизистой оболочки, связанная с несостоятельностью хирургических швов, приобретает свою актуальность при проведении операций, в основе которых лежит принцип направленной тканевой регенерации. Использование лабораторных мини-свиней в качестве биомоделей для изучения и дальнейшей экстраполяции особенностей заживления слизистой оболочки при реконструктивных вмешательствах в полости рта позволяет провести визуальную и гистоморфологическую оценку на всех этапах течения раневого процесса. Полученные в ходе экспериментального исследования результаты, подтверждают необходимость применения методики дифференцированного наложения швов в хирургической практике.

Ключевые слова: экспериментальное биомоделирование с использованием светлогорской породы мини-свиней, адекватность воспроизведения заживления хирургических ран полости рта, направленная тканевая регенерация, методика дифференцированного наложения швов.

Несмотря на значительное разнообразие методик инструментального контроля процесса заживления хирургических ран в полости рта, эффективно дополняющих клинико-лабораторные методы оценки, далеко не все нашли применение в стоматологической хирургической практике. Доплеровская флоуметрия, ультразвуковое исследование, инфракрасная термография, измерение тканевых электропотенциалов и/или напряжения газов в области раны относятся к неинвазивным, но основаны на принципах

косвенной оценки состояния заживающих тканей. В отличие от вышеперечисленных методик гистоморфометрическое исследование позволяет проводить качественный и количественный анализ течения раневого процесса на всех этапах заживления [9, 14, 15].

Задачей экспериментального моделирования является изучение причин, патогенеза и методов коррекции патологических процессов у животных и сопоставление их с заболеваниями человеческого организма. Изучение типовых форм па-

тологии воспроизведенной с помощью лабораторных животных — биомоделей позволяет проводить глубокий анализ изменений на уровнях: молекулярном, субклеточном, клеточном, органном, системном и организменном. В течение последнего десятилетия в ряде биомедицинских исследований мини-свиньи заменили собак и приматов. Появление специализированных пород и генетически чистых линий способствовало расширению возможностей использования мини-свиней в качестве стандартных лабораторных животных. Первые лабораторные мини-свиньи были выведены на основе Юкатанской и Вьетнамской натуральных пород. На сегодняшний день существует более десятка пригодных для экспериментальных исследований разновидностей мини-свиней. К 1974 году в Научно-исследовательской лаборатории экспериментальных биомоделей АМН СССР (ныне НЦБМТ РАМН) в результате скрещивания минисибсов с геттингенской породой свиней была создана светлогорская популяция миниатюрных свиней (рис. 1).

Сходство организма свиньи и человека в функционировании таких органов и систем как сердечно-сосудистая, зубочелюстная, пищеварительная, иммунная, мочеполовая, эндокринная и паракринная системы, а также строения почек, печени, органов зрения, наружных покровов и т.д., делает возможным создание биомоделей, обладающих высокой степенью адекватности изучаемых явлений [2, 7, 12, 21, 23, 30].

Материалы и методы

Разработка и совершенствование стоматологических хирургических вмешательств, основанных на принципе направленной тканевой регенерации, невозможно без углубления знаний и повышения уровня оперативной техники при выполнении этапов операций. Применяемые дополнительные материалы — изолирующие мембраны, в том числе каркасные, и/или титановые сетки — могут увеличивать риск развития послеоперационных осложнений [3, 4, 5, 17, 20, 22, 26]. Для изучения особенностей течения



Рис. 1. Мини-свинья светлогорской популяции, 1,5 года, вес — 40 кг

раневого процесса при проведении реконструктивных вмешательств в полости рта было запланировано контролируемое экспериментальное исследование с воспроизведением сложных условий для заживления слизистой оболочки пасти мини-свиней. Для этого были разработаны следующие 3 модели хирургических ран, различающихся своим дном (табл. 1, рис. 2).

но 3 зоны хирургических вмешательств: два на уровне жевательных групп зубов справа и слева, а также резцов нижней челюсти. Это позволило сократить общее число экспериментальных животных без ущерба для количества образцов полученного материала и его статистического анализа.

Для исследования было отобрано 6 животных одного возраста — 1,5 года,

Таблица 1

Модели хирургических ран с воспроизведением обычных и сложных условий заживления

Модели ран	Сходства		Различия (дно раны)
№1	Резаная рана прямолинейной формы, длиной 2,5-3,0 см.	Края раны представлены слизисто-надкостничными лоскутами, отслоенными от поверхности кости на 1 — 1,5 см от линии разреза	Нативная кость
№2	Резаная рана прямолинейной формы, длиной 2,5-3,0 см.	Края раны представлены слизисто-надкостничными лоскутами, отслоенными от поверхности кости на 1 — 1,5 см от линии разреза	Резорбируемая коллагеновая мембрана
№3	Резаная рана прямолинейной формы, длиной 2,5-3,0 см.	Края раны представлены слизисто-надкостничными лоскутами, отслоенными от поверхности кости на 1 — 1,5 см от линии разреза	Титановая сетка



Рис. 2. Модель хирургической раны № 2

В качестве внутригруппового контроля была выбрана 1-я модель хирургической раны. Учитывая анатомические и функциональные особенности строения пасти мини-свиньи, было выделе-

со сходным весом 35-40 кг. Животные были разделены в произвольном порядке на контрольную и исследуемую группы, в каждой по 3 животных. В ходе операции, с вестибулярной стороны альвеолярной части нижней челюсти производились разрезы с последующим ушиванием хирургических ран. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 4-е, 7-е и 30-е сутки, с последующим проведением забора материалов для гистоморфометрического исследования (таб. 2).

Протокол экспериментального исследования

			Данные объективной оценки заживления хирургических ран			Морфологические признаки заживления хирургических ран		
			Сроки оценки заживления хирургических ран (выведение животных из эксперимента)					
			4-е сутки	7-е сутки	30-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	30-е сутки
Контрольная группа (3 животных — А,В,С)	Дно раны	Нативная кость (3 препарата от 3-х животных)	А	В	С	А	В	С
		Резорбируемая мембрана (3 препарата от 3-х животных)	А	В	С	А	В	С
		Титановая сетка (3 препарата от 3-х животных)	А	В	С	А	В	С
Исследуемая группа (3 животных — D,E,F)		Нативная кость (3 препарата от 3-х животных)	D	E	F	D	E	F
		Резорбируемая мембрана (3 препарата от 3-х животных)	D	E	F	D	E	F
		Титановая сетка (3 препарата от 3-х животных)	D	E	F	D	E	F

Перед операцией животное мыли и обсушивали, после внутримышечного введения 2-3 мг золетила-100 сбрасывали волосяной покров вокруг пасти. Животное укладывали на операционный стол, фиксировали ремнями и накрывали стерильными простынями. После обработки пасти раствором хлоргексидина биглюконата 0,05%, выполняли инфильтрационную анестезию 3-4 мл 2% раствора лидокаина. В каждом участке челюсти выполнялись прямолинейные разрезы длиной 2,5-3,0 см в пределах неприкрепленной десны до поверхности кости. После отслаивания слизистой — надкост-

ничных лоскутов, обнаженные участки костной ткани закрывали предварительно адаптированными по форме дефекта резорбируемыми мембранами «Bio Gide» (Geistlich) или титановыми сетками «Конмет», последние фиксировали микровинтами «Конмет». В качестве внутригруппового контроля дно одного из трех участков челюсти было представлено нативной костью. В дальнейшем, слизисто-надкостничные лоскуты были мобилизованы, наложены швы. В контрольной группе раны были ушиты однорядными узловыми швами Vicryl 5-0 (Ethicon), что продемонстрировано на

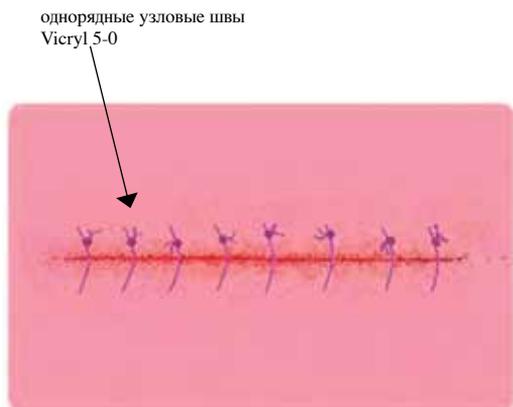


Рис. 3. Модель хирургической раны. Контрольная группа. Рана ушита согласно общепринятой методике

рис. 3 с помощью схемы и фотографии.

В исследуемой группе применялась методика дифференцированного наложения вертикальных матрасных швов

Vicryl 5-0 (Ethicon), выполнявших разгружающую и направляющую функции, и узловых швов Vicryl 6-0 (Ethicon), обеспечивающих точное сопоставление кра-

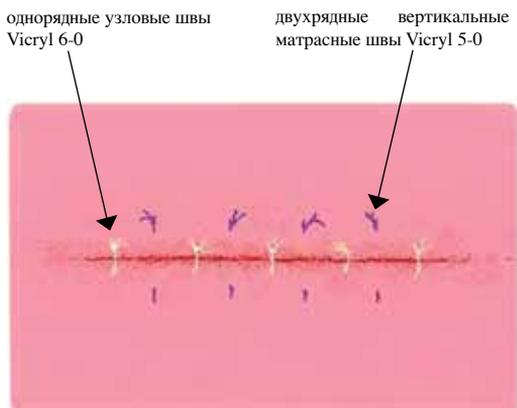


Рис. 4. Модель хирургической раны. Исследуемая группа. Методика дифференцированного наложения швов

ев раны (схема и фотография на рис. 4).

В качестве основного компонента периоперационного медикаментозного сопровождения использовался цефазолин: превентивно за 30 минут до операции 1 г — в/м, в последующем — по 1 г каждые 8 часов в течение первых суток, затем, в течение 5 дней — по 1 г в сутки. Снятие швов проводилось у животных С и F на

7-е сутки после операции (таб. 2). Содержание, уход и наблюдение за животными осуществлялись в условиях вивария Научного центра биомедицинских технологий РАМН.

На протяжении всего исследования проводилась визуальная оценка заживления хирургических ран, с последующим гистоморфологическим изучением по-

лученных материалов. После выведения животных из эксперимента, фрагменты слизисто-надкостничного комплекса были иссечены в каждом участке проведенных операций, материал фиксировали в 10% формалине [1, 8, 10, 11, 13, 16, 18, 19, 25, 28, 29].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенной экспериментальной работы по изучению особенностей течения раневого процесса в полости рта были получены следующие данные.

После операции, в контрольной группе отмечалась несостоятельность швов уже на 3-4 сутки, заживление протекало по типу вторичного натяжения с наличием свищей и формированием грубых рубцов к 30-м суткам. Данные гистоморфологического исследования подтверждали результаты визуальной оценки, о чем свидетельствовала структура грануляционной ткани, площадь и объем рубцов.

В исследуемой группе швы были состоятельны и наблюдались признаки заживления первичным натяжением. К 3-4 суткам в области ран по их протяжению еще не было полной эпителизации, однако определялось плотное соединение краев ран. Площадь раневого дефекта, объем экссудата и грануляционной ткани были меньше, чем в контрольной группе, причем последняя не имела характерной для заживления вторичным натяжением структуры. К 30 суткам рубцы были представлены узкой полоской соединительной ткани несколько расширяющейся вглубь. В отличие от образцов группы контроля, воспалительной инфильтрации в тканях практически не оставалось. В исследуемой группе не определялось значительных качественных и ко-

личественных отличий между процессами заживления ран независимо от их дна [3, 6, 24, 27].

Выводы

1) Использование мини-свиней для биомоделирования позволяет воспроизвести условия течения раневого процесса при проведении реконструктивных вмешательств в полости рта.

2) Экспериментальное моделирование хирургических ран исходя из обычных и сложных условий их заживления способствует углубленному пониманию процессов репаративной регенерации слизистой оболочки полости рта, что может повысить клиническую эффективность восстановительных методов лечения.

3) Дальнейшее совершенствование дифференцированного подхода к этапу ушивания хирургической раны, позволит снизить риск послеоперационных осложнений, связанных с несостоятельностью швов.

Список литературы

1. *Абаев Ю.К.* Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. — Ростов-на-Дону: Феникс. — 2006. — с. 427.
2. *Адо А.Д.* Вопросы общей нозологии. — М.: Медицина. — 1985. — с. 240.
3. *Аксенов К.А., Ломакин М.В.* Визуальная оценка данных экспериментального исследования заживления хирургических ран в полости рта. — отдано в печать // Российская стоматология. — 2010.
4. *Аксенов К.А., Ломакин М.В.* Особенности заживления хирургических ран в полости рта, том 1 // Российская стоматология. — 2008. — № 1. — с. 69-72.
5. *Альфарио Ф.Э.* Костная пластика в стоматологической имплантоло-

гии. Описание методик и их клинического применения. — Москва: Издательский дом Азбука. — 2006. — с. — 235.

6. **Аничков Н.Н., Волкова К.Г., Гаршин В.Г.** Морфология заживления ран. — Москва: АМН СССР. — 1951. — 127. — с. 1-9.

7. **Ашуев Ж.А., Кулаков А.А., Капанадзе Г.Д.** Использование мини-свиней в экспериментальной имплантологии. // Биомедицина. — 2007. — № 6. — с. 81-88.

8. **Буянов В.М., Егиев В.Н., Удотов О.А.** Хирургический шов. — Москва: ТОО «Рапид-принт». — 1993. — с. 1-50.

9. **Ерюхин И.А., Гельфанд Б.Р., Шляпников С.А.** Хирургические инфекции: Практическое руководство. Издание 2-е, переработанное и дополненное. — Москва: Литера. — 2006. — с. 736.

10. **Золтан Я.** Операционная техника и условия оптимального заживления ран. — Будапешт: Издательство академии наук Венгрии. — 1983. — с. 175.

11. **Измайлов С.Г., Измайлов Г.А.** Новые технологии в хирургии ран. — Нижний Новгород: НГМА. — 2004. — с. 340.

12. **Капанадзе Г.Д.** Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // Биомедицина. — 2006. — № 2. с. 40-51.

13. **Кочнев О.С., Измайлов С.Г.** Способы ушивания ран. — Казань: Издательство Казанского Государственного Университета. — 1992. — с. 55-137.

14. **Кудишов В.А.** Патогенез операционной травмы и особенности ее течения при плановых хирургических манипуляциях в ЧЛЮ // Стоматология. — 1996. — № 2. — с. 34-36.

15. **Кузин М.И., Костюченко Б.М.** Раны и раневая инфекция. — Москва: Медицина. — 1981. — с. 592.

16. **Кутуков В.В.** Оперативные способы профилактики несостоятельности

швов на органах желудочно-кишечного тракта: Диссертация на соискание ученой степени д.м.н./Астраханская государственная медицинская академия. — 2001. — с. 290.

17. **Литтман И.** Оперативная хирургия. — Будапешт: Издательство академии наук Венгрии. — 1985. — с. 1130-1138.

18. **Ломакин М.В., Смбалян Б.С.** Пародонтологические швы, часть 1 // Пародонтология. — 2003. — № 3. — с. 14-16.

19. **Ломакин М.В., Смбалян Б.С.** Пародонтологические швы, часть 2 // Пародонтология. — 2003. — № 4. — с. 26-28.

20. **Майорана К., Массимо С.** Передовые методики регенерации кости с БИО — ОСС и БИО — ГАЙД. — Москва, Санкт — Петербург, Киев, Алматы, Вильнюс: Издательский дом Азбука. — 2005.— с. 104.

21. **Михайлов В.В.** Основы патологической физиологии: Руководство для врачей. — Москва: Медицина. — 2001. — с.704.

22. **Саломатина М.С., Ломакин М.В., Панин А.М.** Варианты течения раневого процесса в глубоких операционных ранах полости рта, том 1 // Российская стоматология. — 2008. — № 1. — с. 29-32.

23. **Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горикова Ю.В.** Междисциплинарные исследования в медицине. — Москва: Техносфера. — 2007. — с. 368.

24. **Серов В.В., Шехтер А.Б.** Соединительная ткань. — Москва: Медицина. — 1981. — с. 312.

25. **Слепцов И.В., Черников Р.А.** Узлы в хирургии. — Санкт-Петербург: Салит-Медкнига. — 2004. — с. 112.

26. **Черкасский Б.Л.** Риск в эпидемиологии. — Москва: Практическая Медицина. — 2007. — с. 9-12.

27. *A. Richard Ten Cate, P. Mark Bartold, Christopher A. Squier, Antonio Nanci.* Oral Histology. — Montreal. — 2003. — p. 445.

28. *Edward S. Cohen.* Atlas of cosmetic and reconstructive periodontal surgery. — Boston, Massachusetts. — 1994. — p. 9-30.

29. *Lee H. Silverstein.* Principles of dental suturing. — Atlanta. — 1999. — p. 80.

30. *Mike E. Tumbleson, Lawrence B. Schook.* Advances in swine biomedical research. — New York. — 1996. — p. 1-19.

Experimental modeling of surgical wound healing in oral cavity

K.A. Aksenov, M.B. Lomakin, G.D. Kapanadze, N.V. Smeshko

A problem of gingiva's healing insufficient prediction closely connected to sutures failure and becomes actual in operations based on guided tissue regeneration principles. The application of mini - pigs as biomodels for gingival healing features' studying and further extrapolation during reconstructive operations in oral cavity, permits carrying out histomorphological evaluation in all stages of wound healing process. The results received in experimental research, acknowledge the necessity of differentiated suturing method using in surgical practice.

Key words: Experimental biodesign with the use of svetlogorsky mini-pigs, adequacy of reproducing of cicatrisation of surgical wounds of cavity of mouth, directed tissue regeneration, method of the differentiated imposition of guy-sutures.

Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс

В.М. Брюханов¹, И.В. Смирнов¹, А.А. Бондарев¹, О.С. Талалаева¹,
В.М. Шабанова¹, Я.Ф.Зверев¹, В.В. Удут²

¹ — Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

² — НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск

Контактная информация: gc_ivan@mail.ru д.м.н., профессор Владимир Васильевич Удут

В экспериментах на крысах, а также методом квантово-химических расчетов было показано, что гидрохинон и арбутин обладают выраженной активностью в отношении процессов свободно-радикального окисления. Структурные отличия обеспечивают веществам разный характер этого действия. Было установлено, что гидрохинон обладает прямым антиоксидантным эффектом. У арбутина, наряду с прооксидантным действием, выявлена антиоксидантная активность, обусловленная, по всей вероятности, активацией факторов неферментной антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: арбутин, гидрохинон, свободно-радикальное окисление, антиоксидантная активность.

Многочисленные исследования последних лет показали, что активные формы кислорода (АФК) — важное звено многих физиологических процессов

в живых организмах. Вместе с тем, избыточное образование АФК вызывает нарушение клеточного гомеостаза и лежит в основе перекисного окисления липидов (ПОЛ). Равновесие между продукцией и выгодной и безопасной утилизацией свободных радикалов обеспечивает антиоксидантная система защиты тканей. Нарушение баланса между антиоксидантной и оксидантной системами организма приводит к развитию большого числа заболеваний человека [1, 2, 11].

В этих условиях для поддержания гомеостаза патогенетически обоснованным является введение лекарственных препаратов, повышающих возможности антиоксидантной защиты организма [11]. Однако, несмотря на исключительную значимость рассматриваемой проблемы, в распоряжении практического врача до сих пор остается весьма ограниченный перечень фармакологических средств, используемых как антиоксиданты. С этих позиций большой интерес представляют антиоксиданты растительного происхождения, которые доказали свою эффективность и низкую токсичность [3, 4]. Не секрет, что в последнее время актуальность использования лекарственных растений и фитопрепаратов в качестве полифункциональных средств неизмеримо возросла. Антиоксиданты на основе растений широко применяют не только в комплексной терапии заболеваний, но и как самостоятельные средства. Хорошо известна антиоксидантная активность таких растений, как ортилия однобокая, толокнянка, грушанка круглолистная и др. В свою очередь, препараты растительного происхождения представляют собой отдельные группы БАВ или их смеси,

фармакологические свойства которых обусловлены гармоничным сочетанием и взаимодействием веществ, содержащихся в растительном сырье и обладающих разной степенью выраженности лечебными свойствами. Несомненно, терапевтический эффект лекарственных средств на основе растительного сырья определяется всей совокупностью веществ, содержащихся в растениях [4, 6]. При этом, особое внимание заслуживают фенольные соединения, являющиеся обязательными компонентами растений.

Многие растения-антиоксиданты содержат в своем составе арбутин и гидрохинон. Известно, что арбутин подавляет перекисное окисление линолевой кислоты и нейтрализует свободные радикалы в бесклеточных системах *in vitro*. Имеются сведения, что арбутин защищает кожу от повреждений, вызванных свободными радикалами [5]. Вместе с тем, в опытах *in vivo* показано, что отвары толокнянки, проявляют антигипоксическое действие, которое авторы связывают с содержанием в них гидрохинона. Описано влияние гидрохинона на некоторые метаболические процессы, поглощение кислорода тканями, содержание в крови глюкозы и др. В литературе приводятся данные и о других терапевтических эффектах арбутина и гидрохинона. Однако влияние этих веществ на процессы свободно-радикального окисления (СРО) до конца не изучено. Более того, в литературе нет единого мнения, какому из этих веществ присуща более выраженная антиоксидантная активность. Между тем, не исключено, что именно арбутин и гидрохинон обеспечивают развитие противовоспалитель-

ного и диуретического эффектов многих растений. В связи с вышеизложенным, представлялось важным провести сравнительное квантово-химическое исследование структуры молекул арбутина и гидрохинона и изучить влияние этих веществ на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс в условиях экспериментального формалинового воспаления.

Материалы и методы

Квантово-химические расчеты структур молекул проводились с использованием метода функционала плотности DFT B3LYP, базиса 6-31G** (d,p). Для оптимизированной геометрии был проведен расчет инфракрасного спектра, отсутствие отрицательных частот доказывает стабильность найденных структур. Расчет выполнен с помощью программного комплекса PC GAMESS (Firefly), версия 7.1.С., разработанная группой под руководством профессора Грановского А.А., в лаборатории химической кибернетики МГУ [12, 13].

Для изучения антиоксидантной активности арбутина и гидрохинона была избрана модель экссудативного воспалительного отека лап крыс. Данная методика позволяет оценить активность антиоксидантной и оксидантной систем в крови в условиях экспериментального воспаления. Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления изучали на третьи сутки эксперимента, так как ранее было показано, что максимальные изменения антиоксидантного и оксидантного статуса возникают через три дня после введения формалина [9]. В тех же экс-

периментальных условиях было исследовано влияние арбутина и гидрохинона на процессы СРО в ткани почек.

Опыты *in vivo* по изучению антиоксидантных и оксидантных свойств фенологликозида арбутина и гидрохинона проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 200-220 г. Для эксперимента брали две группы животных. Одной группе крыс в течение двух недель вводили зондом в желудок арбутин в дозе 18 мкМоль/кг, а второй — гидрохинон в той же дозировке.

Затем через трое суток производили декапитацию и брали для анализа кровь и почки. Процесс свободно-радикального окисления оценивали как единство оксидантной и антиоксидантной систем. Для этого в плазме крови и гомогенате коркового вещества почек определяли показатели оксидантного статуса: содержание тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП), в том числе малонового диальдегида и общую оксидантную активность (ОАА) [10]. ОАА — суммарный показатель концентрации всех оксидантов и свободнорадикальных метаболитов — оценивали по накоплению в модельной системе продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Антиоксидантный статус в гемолизате эритроцитов и гомогенате коркового вещества почек оценивали по изменению интегративного показателя общей антиоксидантной активности (ОАА) и активности антиоксидантных ферментов: каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). ОАА определяли по степени ингибирования Fe²⁺-аскорбат-индуцированного окисления ТВИН-80 гемолизатом эри-

троцитов (либо гомогенатом ткани). Активность КАТ оценивали по содержанию цветных комплексов молибдата натрия с перекисью водорода. Активность СОД — по реакции восстановления нитротетразолия супероксидными радикалами [10]. Маркером активности ГПО служило определение неокисленного глутатиона по цветной реакции с реактивом Элмана [7].

Предварительно антиоксидантная активность арбутина и гидрохинона изучалась теоретически. Был проведен квантово-химический расчет термодинамики процессов взаимодействия арбутина и гидрохинона с гидроксильным

радикалом.

Результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов Стьюдента. Полученные данные сравнивали с показателями оксидантной и антиоксидантной активности в крови и почках крыс в условиях формалинового воспаления.

Результаты и их обсуждение

Результаты квантово-химических исследований представлены в табл. 1 и 2. На рис. 1 и 2 представлены оптимизированные структуры арбутина и гидрохинона.

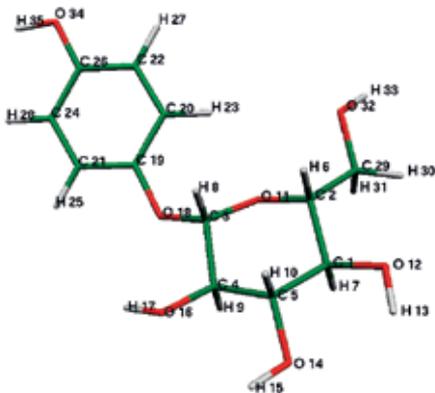


Рис. 1. Пространственное строение и оптимизированная структура молекулы арбутина

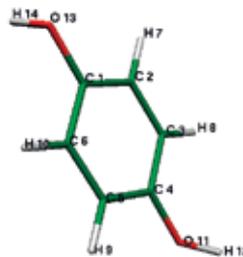


Рис. 2. Пространственное строение и оптимизированная структура молекулы гидрохинона

Таблица 1

Термодинамика процесса образования радикалов арбутина при взаимодействии с гидроксильным радикалом

Радикал	dG, кДж/моль	dG pсм, кДж/моль	dH, кДж/моль	dH pсм, кДж/моль	dS, кДж/моль
Арбутин Н13	-38,440	-62,057	-40,239	-63,856	-6,034
Арбутин Н15	-45,744	-69,089	-39,696	-63,041	20,285
Арбутин Н17	-47,133	-67,406	-41,622	-61,895	18,482
Арбутин Н33	-61,788	-75,841	-57,487	-71,540	14,427
Арбутин Н35	-140,467	-165,323	-143,128	-167,984	-8,924

Наибольшая антирадикальная активность для молекулы арбутина наблюдается при взаимодействии центра

Н35 с гидроксильным радикалом энергия Гиббса -165,323 кДж/моль.

Таблица 2

Термодинамика процесса образования радикалов гидрохинона при взаимодействии с гидроксильным радикалом

Радикал	dG, кДж/моль	dG pcm, кДж/моль	dH, кДж/моль	dH pcm, кДж/моль	dS, кДж/моль
Гидрохинон Н12	-149,156	-173,637	-141,864	-166,345	24,459
Гидрохинон Н14	-149,024	-173,457	-141,8	-166,229	24,242

В молекуле гидрохинона центры Н12 и Н14 эквивалентны, энергии Гиббса взаимодействия равны и составляют — 173,637 кДж/моль.

Из термодинамических данных, рассчитанных в водной среде в модели РСМ, видим, что наибольшей антирадикальной активностью обладает молекула гидрохинона. Разница энергий Гиббса для арбутина и гидрохинона 8,14 кДж/моль.

Тогда соотношение констант равновесия этих процессов для данных молекул при температуре 298 К равно 28,71. Значит, арбутин будет проявлять антирадикальную активность сравнимую с гидрохиноном лишь в концентрациях в 29 раз больших, чем гидрохинон.

В табл. 3 приведены результаты исследования влияния длительного введения арбутина и гидрохинона на показате

Таблица 3

Влияние арбутина и гидрохинона на показатели свободно-радикального окисления в крови крыс

ТБРП(мкМ)	ОАА(%)	КАТ(%)	СОД(%)	ГПО(ЕД/мгНв)	ОАА(%)
Интактные животные					
N=22 2,5±0,22	N=20 45±1,1	N=34 12,2±1,27	N=29 16,9±0,8	N=26 233±7,3	N=26 74±0,5
Формалиновое воспаление					
N=29 4,1±0,21*	N=28 49±1,2*	N=33 22,4±1,02*	N=26 28,3±1,1*	N=30 243±11,2	N=27 88±0,9*
Арбутин					
N=21 4,3±0,13*	N=21 75±1,6*	N=14 10,9±2,64	N=19 31,5±1,51*	N=17 336±27,8*	N=19 71±2,8
Гидрохинон					
N=19 2,7±0,18	N=17 27±3,1*	N=23 27,4±1,63*	N=20 25,5±1,53*	N=21 287±9,2*	N=20 79±1,5*

Примечание:

N — количество экспериментов; звездочками обозначены достоверные изменения (p<0,05) по отношению к интактным животным, подчеркнуты цифры, достоверно отличающиеся от показателей крыс с формалиновым воспалением.

тели свободно-радикального окисления в крови крыс.

Из табл. 3 видно, что формалиновое воспаление индуцировало у животных изменения процесса свободно-радикального окисления, которые можно охарактеризовать как развитие окислительного стресса. На это указывает существенный рост содержания в крови тиобарбитуратреактивных продуктов, что обусловило повышение показателя общей оксидантной активности. Не удивительно, что это привело к активации таких быстро реагирующих антиоксидантных ферментов как каталаза и супероксиддисмутаза, что и обеспечило значительный рост интегративного показателя общей антиоксидантной активности.

На этом фоне длительное применение арбутина приводило к развитию разнонаправленных эффектов. С одной стороны, мы наблюдали существенный рост общей оксидантной активности, что потребовало активизации супероксиддисмутаза и, главным образом, глутатионпероксидазы, активность которой увеличилась примерно на 40%. Уменьшение показателя КАТ указывает на истощение к данному моменту возможностей образования этого фермента. С другой стороны, в экспериментах с использованием арбутина показатель общей антиоксидантной активности ОАА значительно уменьшился, практически достигнув уровня интактных животных. Это заставляет предположить активизацию под влиянием арбутина факторов неферментной антиоксидантной защиты, что и обусловило снижение такого интегративного показателя как ОАА.

Применение гидрохинона привело к развитию несколько иной картины. Как

видно из той же табл. 3, для данного соединения была характерна четко выраженная прямая антиоксидантная активность. Это выразилось в снижении до уровня интактных крыс содержания в крови тиобарбитуратреактивных продуктов и в значительном подавлении показателя общей оксидантной активности, которая уменьшилась более чем в 1,5 раза в сравнении с крысами, не получавшими гидрохинон. Это указывает на прямую способность препарата «гасить» свободные радикалы, уменьшая их количество в плазме крови. Естественно, на этом фоне не потребовалось значительного напряжения системы антиоксидантной защиты, показатели которой существенно не изменились по сравнению с исходным уровнем.

Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что арбутин и гидрохинон способны воздействовать на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс. При этом эффекты исследованных препаратов существенно различались. Так, выявленное нами в опытах *in vivo* резкое снижение общей оксидантной активности указывает на снижение концентрации свободных радикалов в плазме. По-видимому, это обусловлено прямой антирадикальной активностью гидрохинона, позволяя ему выступать в качестве своеобразной ловушки продуктов свободно-радикального окисления. Напротив, при введении арбутина в крови отмечался рост показателей оксидантного статуса. При этом общая антиоксидантная активность крови все же заметно снижалась, что указывает на активизацию процессов неферментной антиоксидантной защиты. Это может обозначать,

что арбутин в данных экспериментальных условиях активизирует неферментные механизмы антиоксидантной защиты, которые определяются некоторыми водорастворимыми соединениями, находящимися в плазме крови (аскорбат, глутатион, мочева кислота и др.), а также рядом жирорастворимых компонентов клеточных мембран (α -токоферол, ретинол и др.). Не исключено, что изученный препарат тем или иным способом активизирует один или несколько неэнзимных механизмов, что и обеспечивает в итоге снижение показателя ОАА. Не секрет, что все неферментные антиоксиданты, нейтрализуя АФК, образуют радикальные производные [1, 2, 11]. Так что в основе прооксидантного эффекта арбутина может лежать накопление оксидантных производных фенологликозида, образующихся в процессе нейтрализации свободных радикалов.

Приведенные результаты позволяют утверждать, что антиоксидантный эффект гидрохинона выше, чем у арбутина. Данные, полученные методом квантово-химического анализа, подтверждают более высокую антирадикальную активность гидрохинона, превышающую такую арбутина в 29 раз.

В экспериментах на животных также было установлено, что арбутин обеспечивает рост активности глутатионпероксидазы, тогда как гидрохинон оказывает направленное действие на каталазу. Интересно, что субстратом для обоих ферментов может служить перекись водорода. При этом сродство глутатионпероксидазы к перекиси водорода выше, чем у каталазы. Поэтому ГПО более эффективно работает при низких концентрациях перекиси водорода. В то же время в за-

щите клеток от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями перекиси водорода, ключевая роль принадлежит каталазе [11]. Исходя из этого, можно предположить, что арбутин и гидрохинон влияют на продукцию перекиси водорода в средах организма. Изменение концентрации перекиси водорода, вероятно, вторично, и объясняется высоким сродством гидрохинона и арбутина к гидроксильным радикалам. Возможно, менее выраженный антирадикальный эффект арбутина обеспечивает активацию глутатионпероксидазы, которая, как известно, наряду с перекисью водорода нейтрализует гидроксильные радикалы. В основе описанных эффектов могут лежать и другие механизмы. Так, есть данные, что неферментные антиоксиданты растительного происхождения способны вызывать индукцию генов, ответственных за синтез антиоксидантных ферментов [7]. Не исключено, что неэнзимные антиоксиданты, повышая буферную емкость антиоксидантной системы, вторично защищают ферменты [2, 11]. Таким образом, несмотря на некоторый рост показателей оксидантного статуса, в крови и в почках опытных крыс преобладает активация антиоксидантной системы. Это является еще одним доказательством антиоксидантного действия исследуемых веществ.

Не исключено, что разная направленность действия арбутина и гидрохинона обусловлена особенностями их химического строения и, следовательно, отличиями в фармакокинетике. Известно, что арбутин является фенологликозидом, который под влиянием фермента арбутазы расщепляется на глюкозу, свободный гидрохинон и воду. В свою очередь, гидро-

хинон относится к веществам с лабильным водородом. Высокая реакционная способность гидрохинона позволяет ему активно взаимодействовать со свободными радикалами в общем кровотоке. Ясно, что в этом случае антиоксидантная активность гидрохинона будет преобладать в крови. Ввиду того, что арбутин отличается от гидрохинона наличием гликона, напрашивается предположение, что разница в эффектах этих соединений обусловлена именно фрагментом молекулы глюкозы. Вероятно, по сравнению с гидрохиноном арбутин более устойчив к окислению, что позволяет ему транспортироваться в почки в неизменном виде. Не исключено, что благодаря гликону арбутин в меньшей степени реабсорбируется в канальцах почек, где, таким образом, накапливается. Есть предположение, что структурные особенности арбутина позволяют ему взаимодействовать с мембранными структурами клетки, что ожидаемо должно усилить его влияние на процессы свободно-радикального окисления в почках. Нельзя не отметить, что глюкоза обладает собственной антиоксидантной активностью, усиливающей эффект арбутина [11]. Так или иначе, не вызывает сомнений, что фрагмент глюкозы, встроенный в молекулу арбутина, изменяет антиоксидантную активность вещества.

Выводы

Таким образом, в экспериментах *in vivo*, а также методом квантово-химических расчетов было доказано, что гидрохинон и арбутин обладают выраженной активностью в отношении процессов свободно-радикального окисле-

ния. Вместе с тем, структурные отличия обеспечивают веществам разный характер этого действия. Было установлено, что гидрохинон обладает прямым антиоксидантным эффектом. У арбутина, наряду с прооксидантным действием, выявлена антиоксидантная активность, обусловленная, по всей вероятности, активацией факторов неферментной антиоксидантной защиты.

Список литературы

1. **Варшавский Б.Я.** Химия и биохимия свободно-радикального окисления. — Барнаул. — 2002. — с. 36.
2. **Владимиров Ю.А.** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах — М.: Наука. — 1972. — с. 252.
3. **Владимиров Ю.А.** Свободные радикалы в живых системах Биофизика. Итоги науки и техники / Ю.А. Владимиров и др. — М.: ВИНТИ АН СССР. — 1991. — с. 252.
4. **Замятина С.В.** Влияние растительных сборов с противовоспалительной активностью на процессы свободно-радикального окисления / Замятина С.В., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф. // Барнаул. — 2006. — с. 13.
5. **Куцк Р.В., Зузук Б.М., Недоступ А.Т., Пецк Т.** Толокнянка обыкновенная. // Провизор. — 2003. — № 18.
6. **Макарова М.Н.** Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами // Фармация. — 2004. — № 2. — с. 30-32.
7. **Моин В. М.** Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. — 1986. — № 12. — с. 724-727.
8. **Плотникова Т. М.** Влияние экстракта маакии амурской на липидный

- спектр и перекисное окисление липидов в мембранах эритроцитов после овариоэктомии у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2008. — Т.7. — № 6. — с. 28-30.
9. *Тихомирова С.В.* Антиоксидантное действие сбора лекарственных растений, применяемого при экспериментальном гломерулонефрите // Нефрология. — 2004. — Т.8. — № 2. — с. 155-156.
10. *Чевари С.* Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. — 1991. — № 10. — с. 9-13.
11. *Шанин Ю.Н.* Антиоксидантная терапия в клинической практике — СПб.: ЭПБИ-СПб. — 2003.
12. *Granovsky A. A.* PC GAMESS/Firefly version 7.1.C, [www http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html](http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html)
13. *Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al.* // J.Comput.Chem. — 1993. — 14. — p. 1347-1363.

Arbutin's and hydroquinone's influence on free radical oxidation in rats blood.

V.M. Brukhanov, I.V. Smirnov, A.A. Bondarev, O.S. Talalaeva,
V.M. Shabanova, Y.F.Zverev, V.V. Udut

The research confirmed that arbutin and hydroquinone have antioxidant activity. With this ,the structural distinctions insure different character of antiradical action for agents. It was established, that theoretically direct (not enzymatic) antioxidant effect of hydroquinone was more above arbutin.

Key words: arbutin, hydroquinone, antioxidant activity.



Термодинамический спектр взаимодействия фуросемида с белковыми молекулами в водной среде

А.А. Бондарев¹, И.В. Смирнов¹, П.С. Постников², В.Д. Филимонов²,
В.В. Удут³, В.Н. Каркищенко⁴

¹–Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

²–Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

³–НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск

⁴–Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: gc_ivan@mail.ru д.м.н., профессор Удут Владимир Васильевич

Проведен квантово-химический расчет термодинамики взаимодействия функциональных групп молекулы фуросемида с олигопептидами в водной среде. Полученный термодинамический спектр позволяет оценить потенциальные возможности молекул, в частности молекулы фуросемида, в процессе комплексообразования с белковым субстратом. Что позволяет оценить величину максимально возможного аффинитета. Для фуросемида он оказался равен -39,5 кДж/моль при взаимодействии центров фуросемида с олигопептидами.

Ключевые слова: спектр, фуросемид, фармакодинамика, лекарство, термодинамика.

Целью работы, было определение основных термодинамических параметров процесса комплексообразования между молекулой фуросемида и олигопептидами в водной среде. Затем с помощью рассчитанных значений энергий Гиббса построить энергетический спектр возможных комплексов фуросемида с белковым субстратом. При расчетах необходимо учитывать что эти молекулы имеют прочные сольватные оболочки, и в процессе образования комплекса происходит их частичное изменение и замещение молекул растворителя, молекулами, вступающими во взаимодействие.

Существует множество методов, позволяющих оценить энергию взаимодей-

ствия молекул лекарственного вещества с биологическими мишенями. Наиболее перспективными и точными на сегодняшний день являются расчеты ab initio [4, 5, 6, 7, 8, 9].

Оценка термодинамики таких процессов играет ключевую роль в понимании биологической активности органических молекул, которые способны взаимодействовать с белковыми молекулами, образуя прочные комплексы, изменять пространственную и электронную структуру субстрата. Такой формальный подход, без учета конкретной структуры мишеней, позволяет оценить потенциальные возможности конкретных молекул, в частности, какова максимально

возможная прочность комплексов с белковыми молекулами в водной среде. Эта характеристика влияет на эффективную дозировку, чем прочнее комплексы, тем в меньшей концентрации будут наблюдаться биологическая активность препарата.

Также такой подход позволяет определить, какие функциональные группы обеспечивают прочность комплекса, а каким выгоднее взаимодействовать с молекулами растворителя и не вступать во взаимодействие с функциональными группами белкового субстрата. Эти величины важны при целенаправленном проектировании различных модификаций исходного вещества [3, 4].

Величины энергий комплексов, и количество этих линий в спектре позволяет оценить, сколько данное вещество может иметь побочных действий, кроме основного вида биологической активности. Разница в энергиях и количество соответствующих белков мишеней позволит провести анализ заселенностей молекул по этим энергетическим уровням и оценить количественно величину основного и побочных действий, при определенной дозировке и при температуре 310К.

Материалы и методы

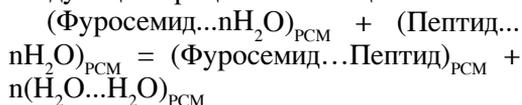
Квантово-химические расчеты структур молекул проводились с использованием метода функционала плотности DFT B3LYP с использованием базиса 6-31G++ (d,p). Использование дополнительных р-функций в базисе необходимо для корректного расчета параметров водородной связи. Для оптимизированной геометрии был проведен расчет инфракрасного спектра, отсутствие отрицательных частот доказывает стабильность найденных структур. Термодинамические параметры рассчитывали с учетом поправок, рассчитанных для газовой фазы.

Квантово-химический расчет выполнен с помощью программного комплекса

PC GAMESS (Firefly), версия 7.1.C., разработанная группой под руководством профессора Грановского А.А., в лаборатории химической кибернетики МГУ [1, 2].

На первом этапе были оптимизированы геометрии образующихся комплексов фуросемида с олигопептидами. Образование таких структур происходит за счет одной или нескольких водородных связей. Затем, исходя из конечных структур комплексов, были построены исходные системы, таким образом, чтобы молекулы растворителя образовывали межмолекулярные водородные связи, подобные связям в структурах образующихся комплексов. Одним из требований, предъявляемых к рассматриваемым системам, является равенство числа водородных связей в исходных супермолекулах и в результирующем комплексе, так как в водной среде при температуре 298К все водородные связи насыщены. Таким образом, производился учет специфической сольватации. Для учета общей сольватации все системы, включая молекулы растворителя, были рассчитаны с использованием модели Томази (PCM). В ходе процесса комплексообразования молекула фуросемида замещает молекулы воды в сольватационной оболочке олигопептида, и наоборот молекула олигопептида замещает молекулы воды в оболочке лекарственного вещества. Таким образом, при образовании комплексов происходит частичное замещение молекул воды в сольватных оболочках. Высвобождаемые молекулы воды также образуют водородные связи с молекулами растворителя.

С учетом всех этих факторов для оценки прочности комплексов были рассчитаны термодинамические параметры следующих процессов замещения:



Результаты и их обсуждение

1. Структура образуемых комплексов

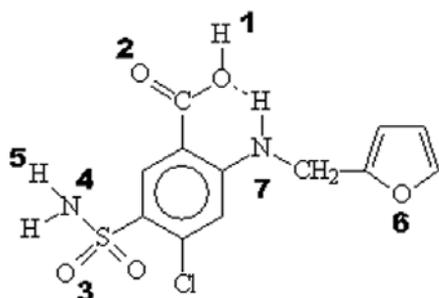
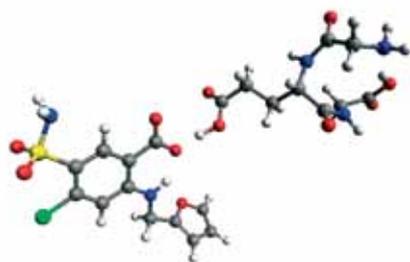
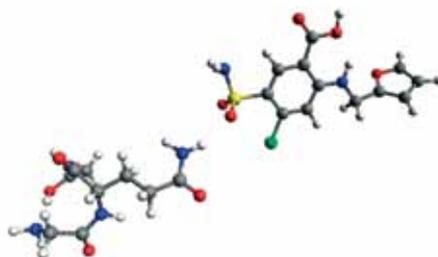


Рис. 1. Активные центры молекулы фуросемид

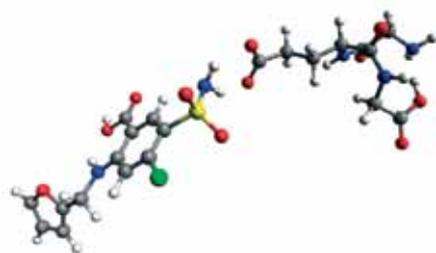
Проведены расчеты всех вариантов взаимодействия молекулы фуросемида с олигопептидами строения Gly-X-Gly, моделирующими остатки аминокислот в пептиде. В качестве X – аминокислоты, способные образовывать водородные связи с молекулой фуросемида и молекулами воды (рис. 1, 2). Для всех систем был рассчитан ИК спектр и термодинамические поправки для 298 К. Во всех структурах имеются одна или несколько межмолекулярных водородных связей.



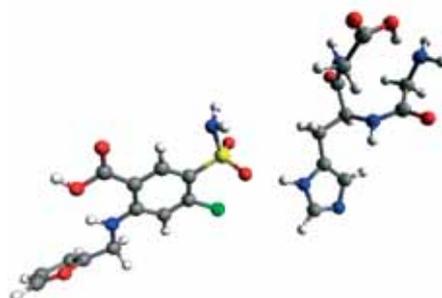
Fur-1+Glu-1



Fur-3+Gln-1



Fur-55+Glu-11



Fur-3+His-1

Рис. 2. Структура наиболее прочных комплексов фуросемида с олигопептидами

2. Термодинамические параметры замещения

Для всех вариантов взаимодействия были рассчитаны термодинамические параметры процесса комплексообразования,

с замещением молекул воды в сольватной оболочке (табл. 1). Рассчитаны значения констант прочности образующихся комплексов при 298° К.

**Термодинамика процессов образования комплексов с использованием
комбинированной модели (специфическая сольватация и РСМ)**

Процесс	ΔE	ΔS	ΔH	ΔG	ΔE_{pcm}	ΔH_{pcm}	ΔG_{pcm}
$(Arg-2+H_2O) + (Fur-2+H_2O) = (Arg-2+Fur-2) + (2H_2O)$	-8,08	-97,46	-12,74	16,32	10,12	5,46	34,52
$(Arg-2+H_2O) + (Fur-3+H_2O) = (Arg-2+Fur-3) + (2H_2O)$	-28,41	-85,73	-31,86	-6,30	16,80	13,36	38,92
$(Arg-3+2H_2O) + (Fur-67+2H_2O) = (Arg-3+Fur-67) + (4H_2O)$	-21,02	-164,31	-29,26	19,73	-12,58	-20,81	28,18
$(Asn-12+2H_2O) + (Fur-12+2H_2O) = (Asn-12+Fur-12) + (4H_2O)$	-2,63	-31,58	-4,99	4,42	-0,77	-3,13	6,29
$(Asn-12+2H_2O) + (Fur-45+2H_2O) = (Asn-12+Fur-45) + (4H_2O)$	11,32	-28,04	7,38	15,74	6,33	2,39	10,75
$(Asp-1+H_2O) + (Fur-1+H_2O) = (Asp-1+Fur-1) + (2H_2O)$	-45,36	-54,24	-57,08	-40,91	11,60	-0,12	16,05
$(Asp-1+H_2O) + (Fur-5+H_2O) = (Asp-1+Fur-5) + (2H_2O)$	-5,84	-23,52	-8,67	-1,66	4,95	2,11	9,13
$(Gln-112+2H_2O) + (Fur-245+2H_2O) = (Gln-112+Fur-245) + (4H_2O)$	-16,16	-74,16	-19,63	2,48	-9,48	-12,95	9,16
$(Gln-12+2H_2O) + (Fur-12+2H_2O) = (Gln-12+Fur-12) + (4H_2O)$	-3,85	-41,80	-6,62	5,84	-5,76	-8,53	3,93
$(Gln-1+H_2O) + (Fur-2+H_2O) = (Gln-1+Fur-2) + (2H_2O)$	0,92	-77,88	-1,07	22,15	-2,55	-4,53	18,69
$(Gln-1+H_2O) + (Fur-3+H_2O) = (Gln-1+Fur-3) + (2H_2O)$	4,15	112,14	14,37	-19,06	-3,04	7,19	-26,25
$(Gln-1+H_2O) + (Fur-6+H_2O) = (Gln-1+Fur-6) + (2H_2O)$	0,02	-101,67	-3,36	26,95	-4,89	-8,27	22,04
$(Gln-2+H_2O) + (Fur-1+H_2O) = (Gln-2+Fur-1) + (2H_2O)$	9,33	-59,14	4,97	22,60	3,79	-0,58	17,06
$(Gln-2+H_2O) + (Fur-5+H_2O) = (Gln-2+Fur-5) + (2H_2O)$	-5,94	-32,14	-5,76	3,82	-0,95	-0,77	8,81
$(Glu-11+2H_2O) + (Fur-55+2H_2O) = (Glu-11+Fur-55) + (4H_2O)$	4,38	19,22	2,85	-2,88	3,93	2,41	-3,32
$(Glu-1+H_2O) + (Fur-1+H_2O) = (Glu-1+Fur-1) + (2H_2O)$	-67,69	-106,57	-82,91	-51,13	-21,33	-36,55	-4,78
$(His-1+H_2O) + (Fur-2+H_2O) = (His-1+Fur-2) + (2H_2O)$	-6,21	-42,94	-5,78	7,03	-3,31	-2,88	9,92
$(His-1+H_2O) + (Fur-3+H_2O) = (His-1+Fur-3) + (2H_2O)$	-7,39	38,75	-5,25	-16,80	0,21	2,35	-9,21
$(His-1+H_2O) + (Fur-4+H_2O) = (His-1+Fur-4) + (2H_2O)$	15,89	-85,10	15,42	40,79	9,85	9,38	34,76
$(His-1+H_2O) + (Fur-6+H_2O) = (His-1+Fur-6) + (2H_2O)$	14,23	-52,91	12,48	28,26	0,92	-0,83	14,94
$(His-2+H_2O) + (Fur-1+H_2O) = (His-2+Fur-1) + (2H_2O)$	-25,02	-86,39	-30,08	-4,32	-8,01	-13,07	12,69
$(His-2+H_2O) + (Fur-5+H_2O) = (His-2+Fur-5) + (2H_2O)$	-22,14	-34,20	-18,57	-8,38	-6,03	-2,46	7,74
$(Lys-1+H_2O) + (Fur-2+H_2O) = (Lys-1+Fur-2) + (2H_2O)$	-10,53	-51,69	-10,52	4,89	11,65	11,66	27,07

$(\text{Lys-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-3}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Lys-1}+\text{Fur-3}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-53,35	-90,60	-56,18	-29,17	12,04	9,21	36,22
$(\text{Lys-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-7}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Lys-1}+\text{Fur-7}) + (2\text{H}_2\text{O})$	4,78	54,90	11,21	-5,16	23,53	29,96	13,59
$(\text{Ser-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-2}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Ser-1}+\text{Fur-2}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-7,80	10,30	-5,36	-8,43	-7,82	-5,38	-8,45
$(\text{Ser-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-3}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Ser-1}+\text{Fur-3}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-6,51	-40,57	-8,68	3,42	-0,12	-2,29	9,80
$(\text{Ser-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-4}+\text{H}_2\text{Ox}) =$ $(\text{Ser-1}+\text{Fur-4}) + (2\text{H}_2\text{O})$	9,83	-101,61	6,44	36,74	4,78	1,39	31,69
$(\text{Ser-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-6}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Ser-1}+\text{Fur-6}) + (2\text{H}_2\text{O})$	11,55	-48,34	7,44	21,85	6,91	2,80	17,21
$(\text{Ser-2}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-1}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Ser-2}+\text{Fur-1}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-1,56	-84,07	-4,99	20,07	7,89	4,46	29,53
$(\text{Ser-2}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-5}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Ser-2}+\text{Fur-5}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-7,05	-79,67	-9,50	14,26	2,32	-0,13	23,63
$(\text{Thr-12}+2\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-12}+2\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Thr-12}+\text{Fur-12}) + (4\text{H}_2\text{O})$	11,46	8,38	13,33	10,83	-31,38	-29,52	-32,02
$(\text{Thr-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-2}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Thr-1}+\text{Fur-2}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-8,04	33,55	-0,79	-10,80	-2,24	5,01	-4,99
$(\text{Thr-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-3}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Thr-1}+\text{Fur-3}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-6,60	23,53	-0,84	-7,86	1,27	7,02	0,01
$(\text{Thr-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-4}+\text{H}_2\text{Ox}) =$ $(\text{Thr-1}+\text{Fur-4}) + (2\text{H}_2\text{O})$	13,35	-39,20	17,14	28,83	11,76	15,54	27,23
$(\text{Thr-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-6}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Thr-1}+\text{Fur-6}) + (2\text{H}_2\text{O})$	13,19	-107,71	9,06	41,17	9,86	5,73	37,84
$(\text{Thr-2}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-1}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Thr-2}+\text{Fur-1}) + (2\text{H}_2\text{O})$	0,02	-95,25	-7,29	21,11	4,40	-2,91	25,49
$(\text{Thr-2}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-5}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Thr-2}+\text{Fur-5}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-5,52	-93,28	-10,04	17,77	8,83	4,30	32,11
$(\text{Trp-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-2}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Trp-1}+\text{Fur-2}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-7,44	-50,92	-6,21	8,98	-1,23	0,00	15,19
$(\text{Trp-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-3}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Trp-1}+\text{Fur-3}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-6,13	-35,31	-5,31	5,22	-0,85	-0,03	10,50
$(\text{Trp-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-4}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Trp-1}+\text{Fur-4}) + (2\text{H}_2\text{O})$	10,34	-112,77	6,53	40,15	-1,17	-4,99	28,63
$(\text{Trp-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-6}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Trp-1}+\text{Fur-6}) + (2\text{H}_2\text{O})$	7,94	-79,39	3,70	27,37	160,02	155,77	179,44
$(\text{Tyr-12}+2\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-12}+2\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Tyr-12}+\text{Fur-12}) + (4\text{H}_2\text{O})$	-10,89	-6,17	-6,81	-4,97	3,06	7,14	8,98
$(\text{Tyr-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-3}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Tyr-1}+\text{Fur-3}) + (2\text{H}_2\text{O})$	-2,26	1,06	0,49	0,17	6,90	9,64	9,33
$(\text{Tyr-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-4}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Tyr-1}+\text{Fur-4}) + (2\text{H}_2\text{O})$	21,55	-88,77	19,68	46,15	15,78	13,92	40,38
$(\text{Tyr-1}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-6}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Tyr-1}+\text{Fur-6}) + (2\text{H}_2\text{O})$	13,84	-24,99	14,00	21,45	10,35	10,51	17,96
$(\text{Tyr-2}+\text{H}_2\text{O}) + (\text{Fur-5}+\text{H}_2\text{O}) =$ $(\text{Tyr-2}+\text{Fur-5}) + (2\text{H}_2\text{O})$	2,10	-131,92	-4,71	34,62	-6,12	-12,93	26,40

Из всех видов взаимодействия способны увеличивать прочность лишь некоторые типы взаимодействия. Всего таких видов взаимодействия шесть: Fur-3-Gln-1, Fur-55-Glu-11, Fur-1-Glu-1, Fur-3-His-1, Fur-2-Ser-1, Fur-2-Thr-1 (табл. 2).

Таблица 2

Энергия Гиббса для видов взаимодействия, способных увеличить прочность комплекса

Name	ΔG , кДж/моль	ΔG (pct), кДж/моль
Fur-3 - Arg-2	-6,297	38,917
Fur-1 - Asp-1	-40,907	16,048
Fur-3 - Gln-1	-19,060	-26,249
Fur-55 - Glu-11	-2,881	-3,324
Fur-1 - Glu-1	-51,133	-4,778
Fur-3 - His-1	-16,799	-9,206
Fur-1 - His-2	-4,322	12,693
Fur-5 - His-2	-8,375	7,738
Fur-3 - Lys-1	-29,168	36,222
Fur-7 - Lys-1	-5,156	13,590
Fur-2 - Ser-1	-8,426	-8,446
Fur-2 - Thr-1	-10,796	-4,994
Fur-3 - Thr-1	-7,859	0,006
Fur-12 - Tyr-12	-4,973	8,975

У фуросемида есть 7 центров способных образовывать водородные связи с субстратом, их взаимодействие с различными аминокислотными остатками дает набор возможных энергий взаимодействия и прочностей комплексов. Этот набор возможных значений образует термодинамический спектр (рис. 3).

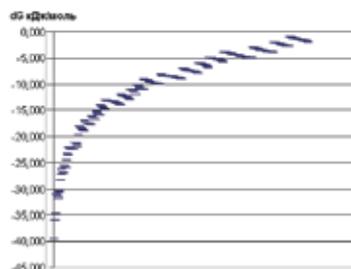


Рис. 3. Термодинамический спектр взаимодействия фуросемида с пептидами в водной среде (модель pct)

Линии в термодинамическом спектре фуросемида имеющие наибольшие значения констант прочности с белковым субстратом

ΔG , кДж/моль	Fur-1	Fur-2	Fur-3	Fur-4	Fur-5	Fur-6	Fur-7
-39,473	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-36,021	Glu-1	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-34,695	H ₂ O	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-31,027	Glu-1	H ₂ O	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-31,243	H ₂ O	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-31,735	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	His-2	H ₂ O	H ₂ O
-30,348	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	Asp-1	H ₂ O	H ₂ O
-30,662	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	Gln-2	H ₂ O	H ₂ O
-28,283	Glu-1	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	His-2	H ₂ O	H ₂ O
-27,210	Glu-1	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	Gln-2	H ₂ O	H ₂ O
-26,249	H ₂ O	H ₂ O	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-26,896	Glu-1	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	Asp-1	H ₂ O	H ₂ O
-26,957	H ₂ O	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	His-2	H ₂ O	H ₂ O
-25,570	H ₂ O	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	Asp-1	H ₂ O	H ₂ O
-25,883	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	Lys-1
-25,884	H ₂ O	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	Gln-2	H ₂ O	H ₂ O
-24,530	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	His-1	H ₂ O
-23,289	Glu-1	H ₂ O	Gln-1	H ₂ O	His-2	H ₂ O	H ₂ O
-23,505	H ₂ O	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	His-2	H ₂ O	H ₂ O
-22,002	His-2	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-22,118	H ₂ O	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	Asp-1	H ₂ O	H ₂ O
-22,216	Glu-1	H ₂ O	Gln-1	H ₂ O	Gln-2	H ₂ O	H ₂ O
-22,262	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	Ser-1	H ₂ O
-22,430	Glu-1	Ser-1	His-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-22,431	Glu-1	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	Lys-1
-22,432	H ₂ O	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	Gln-2	H ₂ O	H ₂ O
-21,078	Glu-1	Thr-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	His-1	H ₂ O
-21,105	H ₂ O	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	Lys-1
-21,108	Glu-1	His-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
-21,514	Glu-1	Ser-1	Gln-1	H ₂ O	H ₂ O	Тыр-1	H ₂ O
-21,902	Glu-1	H ₂ O	Gln-1	H ₂ O	Asp-1	H ₂ O	H ₂ O

Используя рассчитанный спектр, можно на основе распределения Гиббса оценить вероятность реализации этих микросостояний. То есть, оценить заселенность уровней в этом энергетиче-

ском спектре. Результаты представлены в табл. 4 и на рис. 4. Из приведенных данных можно определить, что лишь 17 наиболее низких по энергии уровней имеют заселенность более 0,1% . Это позволя-

семида лишь 17 из 296352 возможных состояний имеют заселенность выше 0,1%.

Полученный спектр описывает потенциальные возможности молекулы, однако не все эти состояния реализуются в реальных условиях. В реальном спектре возможны запрещенные состояния, когда в организме нет белковых молекул, обладающих необходимой структурой. Также возможны и вырожденные состояния, при разных видах взаимодействия имеющих равные энергией взаимодействия, это должно быть характерно для молекул имеющих несколько одинаковых функциональных групп. Идентификация линий в спектре и знание количества этих белковых молекул позволит провести анализ заселенностей и количественно рассчитать активность в отношении каждой мишени при определенной температуре и дозировке вещества.

Термодинамический спектр должен иметь отражение и в фармакологическом спектре данного вещества. Он является основой, определяющей биологическую активность молекул.

Список литературы

1. *Granovsky A. A.* PC GAMESS / Firefly version 7.1.C, www <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>
2. *Schmidt M.W., Baldrige K.K. et al.* // J.Comput.Chem., 14, 1347-1363, 1993.
3. *Бондарев А.А., Смирнов И.В., Удут В.В.* Термодинамические основы фармакодинамики. Томск, 2005. – 92 с.
4. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины в 2-х т. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
5. *Хельтье Х.Д., Зиппель В., Роньян Д., Фолькерс Г.* Молекулярное моделирование. Теория и практика. М.: Бинном, 2009. – 318 с.
6. *Vedani A., Zbinden P., et al.* Pseudoreceptor Modeling: The Construction of Three-Dimensional Receptor Surrogates // J. Am. Chem. Soc. 1995,117, 4987-4994.
7. *Beachy M. D., Chasman D., Murphy R.B. et al.* Accurate ab Initio Quantum Chemical Determination of the Relative Energetics of Peptide Conformations and Assessment of Empirical Force Fields // J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 5908-5920.
8. *Nakao K., Fujikawa M., Shimizu R., Akamatsu M.* QSAR application for the prediction of compound permeability with in silico descriptors in practical use // J Comput Aided Mol Des, 2009, 23:309–319.
9. *Zhang D.W., Zhang J.Z.H.* Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein–molecule interaction energy // J. Chem. Phys., 2003, Vol. 119, 3559-3605.

Фармакодинамические эффекты взаимного влияния веществ

И.В.Смирнов¹, А.А.Бондарев¹, В.В.Удут², Н.Н. Каркищенко³

¹– ГОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

²– НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск

³– Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: gc_ivan@mail.ru д.м.н., профессор Удут Владимир Васильевич

В рамках предлагаемой математической модели, описывающей распределение лекарственного вещества, дается описание взаимного влияния нескольких веществ. В статье рассматриваются только фармакодинамические эффекты. В рамках термодинамического описания, рассматриваются возможные механизмы активного аддитивного синергизма, гипосинергизма, потенцирования, сенситизации и т.д. Эти механизмы могут объяснить многие эффекты взаимного влияния веществ. Предложен новый класс лекарственных веществ, механизм действия которых основан на фармакодинамических закономерностях. Предлагается также перспективное направление по созданию группы лекарственных веществ, которые непосредственно не действуют на важные биологические подсистемы, но влияющие на активность эндогенных лигандов.

Ключевые слова: фармакодинамика, термодинамика, лекарственное вещество.

Вероятность химического взаимодействия молекул двух лекарственных веществ между собой в организме очень мала, однако, на практике очень часто наблюдается взаимное влияние одного лекарственного вещества на активность другого [1]. Вероятнее всего, это может быть связано с фармакодинамическими эффектами действия молекул лекарственных веществ на биологические мишени. Присутствие второго действующего вещества не изменяет аффинитет первого вещества к белковой мишени, но изменяет распределение этих молекул по различным состояниям. Изменяются биологические активности веществ, что в свою очередь отражается на наблюдаемых фармакологических эффектах [2].

Следует отметить, что в данной статье мы рассматриваем только различные виды прямого фармакодинамического

взаимодействия веществ, не касаясь косвенного, при котором вещества взаимодействуют на разные биологические подсистемы, а фармакологический эффект взаимодействия проявляется на уровне эффекторных систем клеток, органов и целых систем. Также мы не рассматриваем фармакокинетическое и другие виды взаимодействия биологически активных веществ в организме.

С позиции термодинамической теории следует рассматривать не только процесс образования комплекса лекарственного вещества-биологический субстрат, но и развивающееся при применении двух и более веществ взаимодействие. Попадая в организм, вещество может взаимодействовать не только с ксенобиотиками, но и с эндогенными лигандами (гормоны, медиаторы, нейропептиды и др.). Присутствие в среде треть-

го вещества в значительной мере может влиять на активность и фармакологический эффект лекарственных веществ и эндогенных лигандов.

При попадании в организм вещества, как правило, могут наблюдаться два основных вида взаимодействия веществ: синергетическое и антагонистическое [2, 3]. При синергетическом взаимодействии наблюдается однонаправленный фармакологический эффект (Ph), при антагонистическом – фармакологические эффекты взаимодействующих веществ направлены противоположно по отношению к основной биологической подсистеме.

Рассматривая синергетическое взаимодействие, при котором суммарный фармакологический эффект вещества X и Y превышает фармакологический эффект наиболее активного из них, можно выделить несколько возможных вариантов прямого синергизма.

Взаимодействие веществ X и Y, при котором их фармакологические эффекты суммируются, называется аддитивным синергизмом или суммацией. В этом случае количество биологических мишеней достаточно для образования комплекса всей свободной фракции обоих веществ, общий фармакологический эффект при их взаимодействии будет равен сумме PhX и PhY (рис.1).

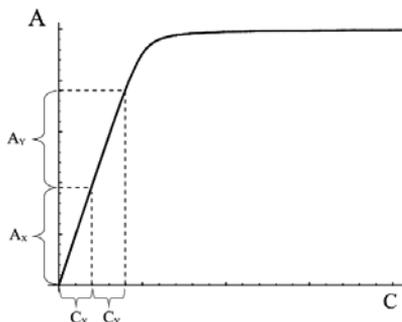
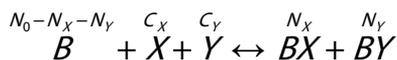


Рис. 1. Аддитивный синергизм

A – активность вещества, C – количественная характеристика вещества.



$$A_X = \frac{K_X \cdot (N_0 - N_X - N_Y)}{1 + K_X \cdot (N_0 - N_X - N_Y)}$$

При малых NX, NY – уравнение имеет вид:

$$A_{X_0} = \frac{K_X \cdot (N_0 - N_X)}{1 + K_X \cdot (N_0 - N_X)},$$

т.е. активность вещества X не изменяется в присутствии вещества Y. Здесь и далее B – биологическая подсистема, на которую действует вещество.

Взаимодействие веществ, при котором фармакологический эффект комбинации веществ PhX+Y меньше, чем сумма фармакологических эффектов каждого вещества в отдельности PhX + PhY можно назвать гипосинергизмом. При таком взаимодействии наблюдается конкуренция двух лигандов за биологическую мишень. Каждое вещество способно взаимодействовать со свободной фракцией биосубстрата (рис. 2).

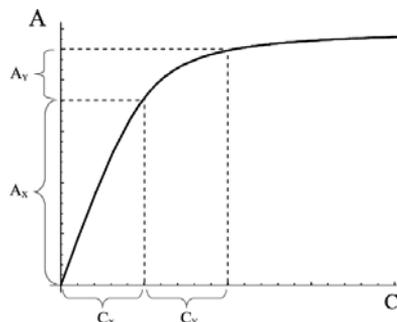


Рис. 2. Гипосинергизм

A – активность вещества, C – количественная характеристика вещества.

$$A_Y = A_{Y_0} = \frac{K_Y \cdot (N_0 - N_Y)}{1 + K_Y \cdot (N_0 - N_Y)}$$

т.е. $Ph_{X+Y} = Ph_X + Ph_Y$.

Это возможно, когда N_X и N_Y достаточно большие величины, сравнимые с N_0 , свободная фракция биологического

$$\frac{K_X \cdot (N_0 - N_X - N_Y)}{1 + K_X \cdot (N_0 - N_X - N_Y)} < \frac{K_X \cdot (N_0 - N_X)}{1 + K_X \cdot (N_0 - N_X)}; A_X < A_{X_0}$$

$$\frac{K_Y \cdot (N_0 - N_X - N_Y)}{1 + K_Y \cdot (N_0 - N_X - N_Y)} < \frac{K_Y \cdot (N_0 - N_Y)}{1 + K_Y \cdot (N_0 - N_Y)}; A_Y < A_{Y_0}$$

субстрата меньше N_0 , что сказывается на активности.

Если при взаимодействии веществ X и Y общий фармакологический эффект Ph_{X+Y} превышает сумму Ph_X и Ph_Y , такое взаимодействие носит название потенцирование [1, 3, 4]. Развитие такого варианта прямого взаимодействия веществ возможно только в случае различного аффинитета веществ X и Y к побочным биологическим мишеням (рис. 3). Если константа прочности комплекса YB_2 больше, чем XB_2 , вещество Y замещая вещество X на побочной мишени, например, на транспортном белке альбумине, повышает свободную фракцию X в среде в несколько раз, что приводит к образованию значительно большего числа комплексов XB_1 и, соответственно, к значительному увеличению основного фармакологического эффекта Ph_X .

Следует отметить, что в случае если вещество Y не вызывает основного фармакологического эффекта $Ph_Y=0$, но является конкурентом вещества X за комплексообразование с побочной биологической мишенью, то такое взаимодействие носит название сенситизации (рис. 4). Это явление очень часто встречается в клинике при комбинации лекарственных веществ, обладающих разным механизмом действия.

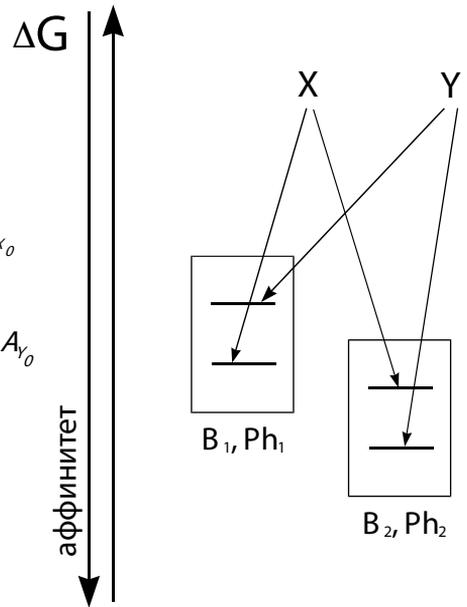


Рис. 3. Диаграмма эффекта потенцирования ΔG – термодинамический спектр вещества, горизонтальные линии в прямоугольниках соответствуют уровням активации биологических подсистем B_1 или B_2 .

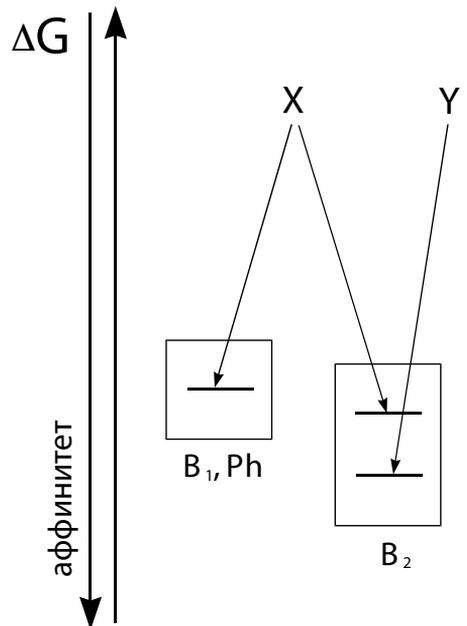


Рис. 4. Диаграмма эффекта сенситизации. Обозначения как на рис. 3

$$Ph_{x+y} > Ph_x + Ph_y, \text{ при } Ph_y = 0.$$

В прямом антагонистическом взаимодействии веществ можно выделить две основные формы: конкурентный антагонизм и десенситизацию [4, 5]. Следует отметить, что на уровне биологической активности возможные случаи рассмотрены выше, но когда фармакологический эффект различных биологических мишеней противоположен, фармакологические эффекты вычитаются.

При возникновении конкурентного антагонизма вещество Y имеет больший аффинитет к основной мишени, чем вещество X и при попадании в организм вытесняет его из комплекса с белком. Константа прочности комплекса YB_1 имеет большую величину, чем комплекса XB_1 , как при аддитивном варианте синергизма, однако фармакологические эффекты Ph_x и Ph_y имеют разный вектор. Это означает, что одно из веществ-конкурентов (в данном случае вещество X) является стимулятором по отношению к основной биологической мишени, образуя с ней комплекс, оно увеличивает внутреннюю активность $Ph_x > Ph_0$. Вещество Y является блокатором (литиком) данной биологической подсистемы, уменьшая внутреннюю активность $Ph_x > Ph_y < Ph_0$.

Математически такое взаимодействие можно выразить следующим образом:

$$Ph_{x+y} > Ph_x + Ph_y$$

В случае, если вещество Y, обладая аффинитетом к мишени при образовании комплекса YB_1 замещает вещество X, не вызывая снижения физиологической функции подсистемы, т.е. стабилизирует подсистему в физио-

логическом состоянии, такое взаимодействие называется десенситизацией и математически выражается следующим образом:

$$Ph_{x+y} > (Ph_x + Ph_y = Ph_x), \text{ при } Ph_y = 0.$$

Как было показано выше, величина ΔG количественно отражает величину аффинитета к биологической подсистеме, следовательно, зная ее значение по отношению к конкретному белку и величину аффинитета вступающих во взаимодействие биологически активных веществ, можно не только прогнозировать вид взаимодействия (синергизм, потенцирование, конкурентный антагонизм и др.), но и количественно рассчитывать величину этого взаимодействия.

Резюмируя выше сказанное, следует отметить, что работа по расчету величины и предсказанию направления взаимодействия веществ в организме, при котором одно биологически активное вещество изменяет фармакодинамику другого, является важным научным направлением в области теоретической фармакологии. Описанные эффекты, связанные с фармакодинамическим взаимодействием веществ могут служить основой для создания нового особого класса лекарственных веществ, действие которых основано на этих закономерностях. Новые вещества, назовем их *модуляторами фармакологической активности*, будут изменять фармакологическую активность лигандов, влияя на их свободную концентрацию в биологической системе, не обладая собственной фармакологической активностью к данной биологической мишени. Механизм модулирующего действия, как показано выше, основан на вытеснении молекул основ-

ного действующего вещества с транспортных и конструкционных белков. Эти препараты позволят резко снизить дозу лекарственных веществ.

Следует отметить, что все рассмотренные фармакодинамические эффекты в полной мере относятся и к эндогенным лигандам. Перспективным классом лекарственных веществ на наш взгляд могли бы быть вещества, которые непосредственно не действуют на важные биологические подсистемы, но способны изменять эффективную концентрацию естественных регуляторов – эндогенных лигандов.

Список литературы

1. *Балткэйс Я.Я., Фатеев В.А.* Взаимодействие лекарственных веществ. – М.: Медицина. – 1991.
2. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины в 2-х т. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
3. *Кукес В.Г., Стародубцев А.К.* Клиническая фармакология и фармако-терапия. – М.: GEOTAR-MED. – 2002.
4. *Харкевич Д.А.* Фармакология. – М.: GEOTAR-MED. – 2002.
5. *Ariëns E.J., Simons A.M.* Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. – 1977.– Vol. 297. – p. 37-41.

Matuematical modeling of interactions of substances

I.V. Smirnov, A.A. Bondarev, V.V. Udut, N.N. Karkischenko

The thermodynamical model account of drug distribution, mutual influence some substances. This article about pharmacodynamical effects, bat not chemical, pharmacokinetical influence and interaction on the biological mechanism's. The possibly mechanism's of additive synergism, hyposynergism, sensitivity had been examine of thermodynamical description. The description of interaction influence of substances by one's mechanism's. The new drug's class suggested. The action mechanism that drug on pharmacodynamical law. We propose prospect direction of found drug's group. The one is direct influence on endogenous ligand activity, but not impotent biological subsystem.

Key words: pharmacodynamyc, thermodynamyc, drug.

Математическое моделирование процесса приготовления таблетированной формы чумной живой вакцины

С.А.Швецов, Н.А.Черкасов, А.В.Ежов, С.В.Багин,
В.В.Тетерин, Д.А.Мохов

48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны РФ, Киров

Контактная информация: Швецов Сергей Александрович
610017, г. Киров, Октябрьский проспект 119, тел./факс 8(8332)38-15-27

Многочисленность влияющих факторов и их взаимосвязь в технологии таблетированной формы чумной живой вакцины обуславливают сложность протекания указанного процесса и, в случае неправильного их учета, создаются предпосылки к получению препарата или низкого качества, или вообще не соответствующего требованиям. Целью настоящей работы явилось математическое моделирование процесса приготовления таблетированной формы чумной живой вакцины. Показано, что полученные модели оценки основных показателей качества полуфабрикатов и готового препарата обладают высокой надёжностью и диагностической эффективностью, что позволяет использовать их для контроля и управления процессами приготовления не только таблетированных, но и других форм иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: таблетированная форма вакцины, биотехнологический процесс, факторный анализ, математическая модель.

Успех в решении задач по организации и проведению массовой экспрессной вакцинации, позволяющей быстро иммунизировать большие контингенты людей, зависит не только от выбора оптимального способа введения препарата в организм, но и от создания новых форм выпуска вакцин [1]. Наиболее перспективной формой живых вакцин являются таблетированные препараты, состоящие из биологически активных субстанций (биокомпонента) и специального наполнителя, обеспечивающего придание таблетке необходимых физико-химических и вкусовых качеств. Это в полной мере относится и к таблетированной форме вакцины чумной живой, являющейся средством экспрессной профилактики чумной инфекции [2].

Технологический процесс получения таблетированной чумной живой вакцины

предусматривает выполнение ряда последовательных операций, направленных, в конечном итоге, на придание прессуемой смеси свойств, обеспечивающих получение готового препарата, соответствующего установленным нормативной документацией требованиям. При этом сама таблетка должна полностью удовлетворять не только нормативам, которые установлены для нее госфармакопеей как к лекарственной форме, но и содержать требуемое количество полноценных живых микробов вакцинного штамма, обеспечивающих необходимую иммунизирующую дозу [3].

Многочисленность влияющих факторов и их взаимосвязь в процессе непосредственного прессования обуславливают сложность протекания указанного процесса и, в случае неправильного их учета, создаются предпосылки к получе-

нию препарата или низкого качества, или вообще не соответствующего требованиям. Это указывает на необходимость изучения закономерностей процесса прессования и нахождения математических зависимостей, описывающих взаимосвязи между влияющими факторами и показателями качества готовой таблетки, с целью дальнейшей оптимизации процесса.

К настоящему времени математическое описание процессов подготовки таблеточных смесей, содержащих сухой биокомпонент, к прессованию, и собственно их таблетирование не нашли широкого освещения в отечественной литературе, несмотря на ряд публикаций, посвященных получению такого рода биопрепаратов [4, 5, 6]. Это послужило основанием для проведения соответствующих исследований и обсуждения полученных результатов.

С учетом изложенного, целью настоящей работы явилось математическое моделирование процесса приготовления таблетированной формы чумной живой вакцины.

Материалы и методы

Объектом исследования служили структура и характер многофакторных отношений между технологическими параметрами и показателями качества таблетированной формы чумной живой вакцины, которые представляют собой цепь причин и следствий.

Предметом исследования было выявление из множества возможных причин «мнимых», якобы вызывающие брак, и «реальных» факторов, действительно ведущих к снижению качества вакцины. Оценку вклада отобранных «немногочисленных существенно важных» факторов в изменение качества продукции

проводили методом математического моделирования.

Аналізу подвергалась технология получения вакцины чумной живой таблетированной. В работе исследовалось 10 серий готовой формы вакцины и ее полуфабрикатов. База данных, характеризующих технологический процесс приготовления таблетированной вакцины, сформирована на основе результатов контроля основных стадий производства: приготовление концентрированной суспензии клеток вакцинного штамма, ее обезвоживание, приготовление таблеточной массы и таблетки. Каждая из стадий представлена в базе данных соответствующим набором характеристик, которые и исследовались с использованием математического аппарата — факторного, дискриминантного и регрессионного анализов. Алгоритмы расчёта целевых функций реализованы на ПЭВМ.

Для изучения влияние комплекса технологических факторов на качество вакцины определяющими показателями были выбраны специфическая активность и механическая прочность таблетки.

При получении сокращенного математического описания объекта исследования применяли факторный метод анализа [7]. Для оценки вклада каждого параметра в действие определённого фактора использован графический метод, где обобщающие факторы представлены двумя осями, а параметры — векторами, проведёнными из начала координат в точки с координатами соответствующих факторных нагрузок.

Величины нагрузок измеряемых параметров на оси координат показывают степень их зависимости от определяющих факторов. Сумма квадратов нагрузок по каждому фактору составляет итоговый вклад параметров в суммар-

ную дисперсию всех параметров. Основным (ведущим) фактором в системе считается тот, на который приходится большая доля общей дисперсии. Коэффициенты корреляций в факторном пространстве между параметрами равны произведению длин векторов, умноженных на косинус угла между ними. Вращение оси координат позволяет, изменять нагрузки на факторы при неизменных коэффициентах корреляции между параметрами и суммарной дисперсии. Для интерпретации факторных решений угол вращения осей подбирали таким образом, чтобы графическое изображение имело вид, при котором параметры, характеризующие хорошо знакомые свойства системы, имели бы столь высокие нагрузки на соответствующий фактор, насколько это возможно. Полученная окончательная матрица нагрузок, объясняющая вариации отдельных параметров действием двух обобщающих факторов, позволяет исключить из дальнейшего исследования параметры с минимальным влиянием. После отбора наиболее информативных показателей, на их основе разрабатывали математические модели соответствующей стадии биотехнологического процесса. Для этой цели использовали аппарат регрессионного анализа [8].

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного факторного анализа свидетельствуют, что не менее 50 % (51, 96) изменений всех параметров, характеризующих процесс высушивания, смешивания обезвоженной культуры с гранулятом и прессования смеси в таблетку можно описать действием 2-х основных факторов: биологического ($\Phi 2$), представляющего собой обобщенное влияние свойств биологическо-

го компонента, и технологического ($\Phi 1$), представляющего обобщенное влияние группы технических параметров на формирование основных показателей качества — концентрации живых микробов в таблетке и ее механическую прочность.

Анализ показал, что технологический фактор является определяющим в формировании качества таблетки. На его долю приходится большая часть «объясненной» дисперсии. На рисунках 1 и 2 представлен пример графического изображения исходного и итогового факторных решений по стадии приготовления сухой микробной культуры при производстве таблетированной чумной вакцины.

На стадии приготовления сухой культуры (рис. 1) технологический фактор идентифицируется изменениями параметров, характеризующих условия сублимационного высушивания — продолжительность замораживания ($T_{зам}$), разрежение в сублимационной камере ($P_{суб}$), продолжительность ($T_{дос}$) и температура досушивания ($t_{дос}$). Изменение указанных векторов обратно направлению изменения фактора $\Phi 1$.

Параметры, определяющие условия подготовки вакцинной взвеси к высушиванию и режим ее замораживания, имеют низкие нагрузки на технологический фактор, что свидетельствует об их малой значимости для пространства исследуемых признаков и является основанием для исключения из дальнейших расчетов.

Биологический фактор ($\Phi 2$) процесса высушивания идентифицируется векторами параметров, которые характеризуют свойства жидкого биокомпонента, такими, как общее содержание клеток в вакцинной взвеси ($OK_{вв}$), концентрация в ней жизнеспособных клеток ($БК_{вв}$) и её кислотность ($pH_{вв}$). Биологический фактор определяет лишь 16,80 % диспер-

сии параметров и поэтому его влияние на поведение системы менее значимо.

Факторный анализ показал, что технологический и биологический факторы не равноценны по своему влиянию на сохранение жизнеспособной биомассы в культуре после сублимационного высушивания (БКск). После определения векторов, которые имели на факторы наибольшую нагрузку, было составлено итоговое графическое решение, которое описывает 71,2 % изменений всех параметров, характеризующих процесс обезвоживания вакцинной взвеси. На его основе сформировали пространство признаков, вносящих наибольший вклад в изменение показателя концентрации живых клеток в сухой культуре. Полученный набор признаков использовали в качестве исходных для математического описания процесса обезвоживания вакцинной взвеси. Итоговое факторное решение по стадии приготовления сухой культуры и аналитическое выражение модели представлены на рисунке 2 и аналитическом выражении (1).

$$\text{БКск} = 14,29 - 0,24 \cdot \text{ОКвв} + 2,69 \cdot \text{БКвв} + 32,18 \cdot \text{Тдос} + 0,66 \cdot \text{тдос}, (1)$$

где: БКск — концентрация жизнеспособных клеток в сухой микробной культуре, млрд кл.в см³;

14,29 — свободный член;

ОКвв — общее содержание клеток в вакцинной взвеси, млрд кл.в см³;

БКвв — концентрация жизнеспособных клеток в вакцинной взвеси, млрд кл.в см³;

Тдос — продолжительность досушивания, ч;

тдос — температура досушивания, °С.

Представленное уравнение имеет высокую сходимость с экспериментальными данными (коэффициент множествен-

ной регрессии равен 0,77 при критическом 0,71, а коэффициент детерминации - 0,59).

Аналогичным образом с помощью факторного анализа определялось влияние технологического и биологического факторов в процессе приготовления таблеточной массы и на стадии приготовления готовой формы вакцинного препарата. Итоговые факторные решения относительно показателей концентрации жизнеспособных клеток в таблеточной массе (БКтм) и готовой таблетке (БКт) позволили представить взаимосвязи параметров на этих стадиях в виде функций (2) и (3).

$$\text{БКтм} = 41,67 + 0,42 \cdot \text{БКск} - 10,66 \cdot \text{Тхр/ск} - 4,95 \cdot \text{ДВэ} + 5,33 \cdot \text{ДВк}, (2)$$

где: БКтм — концентрация жизнеспособных клеток в таблеточной массе, млрд кл.в см³;

41,67 — свободный член;

БКск — концентрация жизнеспособных клеток в сухой микробной культуре, млрд кл.в см³;

Тхр/ск — продолжительности хранения сухой культуры, ч;

ДВэ — давление воздуха на эжекторе смесителя, кПа;

ДВк — давление воздуха на соплах смесителя, кПа.

Представленное уравнение имеет высокую сходимость с экспериментальными данными (коэффициент множественной регрессии равен 0,87 при критическом 0,71, а коэффициент детерминации - 0,73).

$$\text{БКт} = 170,35 + 0,056 \cdot \text{БКтм} - 16,23 \cdot \text{Вмп} - 18,29 \cdot \text{Спр} - 0,50 \cdot \text{Дпр} + 15,11 \cdot \text{Дт}, (3)$$

где: БКт — концентрация жизнеспособных клеток в таблетке, млрд кл.в см³; 170,35 — свободный член; БКтм — концентрация жизнеспособных клеток в таблеточной массе, млрд кл.в см³; Вмп — высота матричного пространства, мм; Спр — скорость прессования, мм.с⁻¹; Дпр — давление прессования, МПа; Дт — диаметр таблетки, мм.

О надёжности прогностической оценки содержания живых микробов в готовом таблетированном препарате с использованием представленной функции свидетельствует коэффициент множественной корреляции, равный 0,92 ($R_{t0,95} = 0,75$) и коэффициент детерминации, равный 0,85.

Что же касается остальных показателей из выборки экспериментальных данных, не вошедших в представленные модели, их недостаточная информационная значимость, по-видимому, обусловлена незначительным влиянием на результаты соответствующей технологической операции, а также, возможно, методиками их определения. Дальнейшие исследования и расширение базы данных позволят уточнить сделанные выводы.

Изучение влияния технологических параметров на такой показатель качества таблетки, как её механическая прочность, имеет смысл только на стадии прессования таблеточной массы. Поэтому в факторном анализе были использованы параметры, характеризующие свойства таблеточной массы и режим её прессования. Для анализа нагрузок угол вращения оси координат подбিরали так, чтобы вектор, отражающий изменение значений механической прочности совпадал с осью координат Ф1. Наи-

большую нагрузку на Ф1 имели параметры: скорость прессования (Спр), высота матричного пространства (Вмп), масса таблетки (Мт) и давление прессования (Дпр). Нагрузка остальных векторов на эту ось значительно ниже. Отобранные параметры, вектора которых имели наибольшую нагрузку на Ф1 (в том числе и диаметр таблетки), были использованы в качестве исходных для расчёта множественной регрессии.

Окончательный вид полученной модели представлен выражением (4):

$$\text{МПт} = 0,27 - 0,11 \cdot \text{Тхр/тм} - 0,17 \cdot \text{Вмп} + 0,20 \cdot \text{Спр} + 0,03 \cdot \text{Дпр} + 0,21 \cdot \text{Дт} - 0,43 \cdot \text{Мт}, \quad (4)$$

где: МПт — механическая прочность таблетки на истирание, процент; 0,27 — свободный член; Тхр/тм — продолжительность хранения таблеточной массы, ч; Вмп — высота матричного пространства, мм; Спр — скорость прессования, мм.с⁻¹; Дпр — давление прессования, МПа; Дт — диаметр таблетки, мм; Мт — масса таблетки, г.

Высокие значения коэффициента детерминации (0,83) и множественной корреляции ($R=0,91$ при $R_{t0,95}=0,81$) для представленного уравнения свидетельствуют о том, что полученная математическая модель значимо описывает 83 % изменений всех технологических параметров, оказывающих существенное влияние на формирование значения показателя механической прочности получаемой таблетки.

Таким образом, реализованный подход к разработке математического описания технологических процессов приготовления таблетированной формы чум-

ной вакцины, предусматривающий выявление наиболее значимых показателей на основе исследования взаимосвязей в изучаемом многопараметрическом пространстве с использованием факторного анализа, продемонстрировал свою эффективность при решении задач моделирования биотехнологических процессов. Полученные модели оценки основных показателей качества полуфабрикатов и готового препарата обладают высокой надёжностью и диагностической эффективностью, что позволяет использовать их для контроля и управления процессами приготовления не только таблетированных, но и других форм иммунобиологических препаратов.

Список литературы

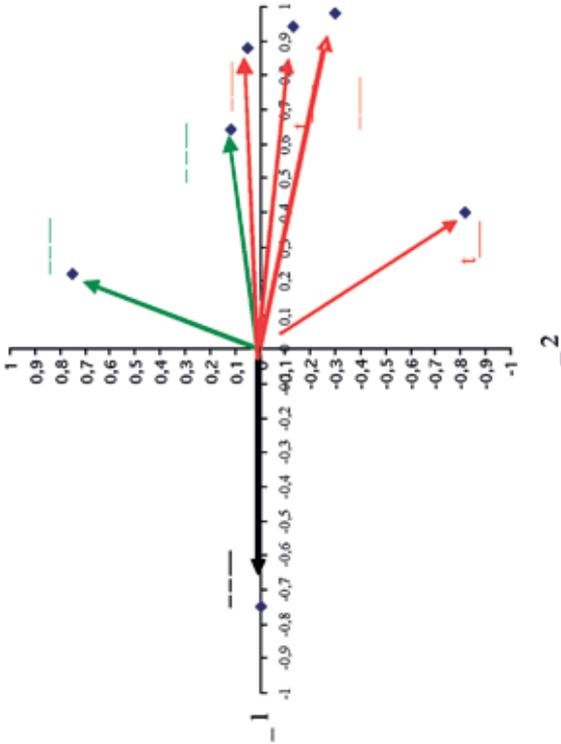
1. *Онищенко Г.Г., Дроздов И.Г.* Актуальные проблемы противодействия биологической опасности // Вестник РАМН. – 2004. – № 5. – с.14-20.
2. *Воробьев А.А., Лебединский В.А.* Массовые способы иммунизации. М.: Медицина. – 1977. – с. 256.
3. *Воробьев А.А., Земсков В.М., Лебединский В.А. и др.* Пероральная иммунизация живой чумной вакциной ЕВ в эксперименте на животных // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1969. – № 8. – с. 112-116.
4. *Белявская В.А., Ромашова Н.Г., Сорокулова И.Б. и др.* Разработка технологии получения таблеточной формы препарата субалин // Биотехнология. – 2002. – № 2.– с. 64-69.
5. *Смирнов А.О., Садовой Н.В., Литусов Н.В. и др.* Выживаемость бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* при прессовании таблеток биоспорина // Биотехнология. – 1997. – № 4. – с. 17-21.
6. *Смирнов А.О., Харечко А.Т., Садовой Н.В. и др.* Разработка технологии таблеточной формы препарата Биоспорин // Биотехнология. – 1996. – № 11. – с. 51-55.
7. *Таршиш М.Г., Константинов В.М.* Математические методы в эпизоотологии. М.: Колос. – 1975. – с.176.
8. *Львовский Е.Н.* Статистические методы построения эмпирических формул. М.: Высшая школа. – 1982. – с. 239.

Mathematical modeling of preparation of lozenge-formed live plague vaccine

S.A.Shvetsov, N.A.Cherkasov, A.V.Ezhov, S.V.Bagin, V.V.Teterin, D.A.Mokhov

Wide range of influence factors and their interrelation at producing lozenge-formed live plague vaccines is making the specified process difficult: when being incorrectly assessed, the preparation is possible to be of low quality or inappropriate to requirements. Aim of the given work is to mathematically model the process of preparation of lozenge-formed live plague vaccine. Developed models for assessing significant parameters of quality of the semi-manufactured goods and complete preparation were proved to be of high reliability and diagnostic efficiency that allows to use them for monitoring and arranging the process of producing lozenge as well as other forms of immunobiological preparations.

Key words: lozenge-formed vaccine, biotechnological process, factor analysis, mathematical model



Обозначение фактора	Нагрузки параметров на факторы							Дисперсия, процент
	Номер и сокращенное обозначение параметров условий приготовления сухой культуры							
	ОКвв	БКвв	Тзам	ткнд	Тдос	тдос	БКск	
Ф1 _{технологичес.}	0,12	0,75	0,05	-0,82	-0,30	-0,13	0,00	19,2
Ф2 _{биологический}	0,64	0,22	0,88	0,4	0,98	0,94	-0,75	52,0
Итого:								71,2

Примечания: БКск – концентрация жизнеспособных клеток в сухой микробной культуре, ОКвв – общее содержание клеток в вакциновой взвеси, БКвв – концентрация жизнеспособных клеток в вакциновой взвеси, Тзам – продолжительность замораживания, Тдос – продолжительность досушивания, тдос – температура досушивания, ткнд – температура конденсатора.

Рис. 2. Итоговое графическое изображение факторного решения по стадии приготовления сухой микробной культур



Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов

В.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, С.Е. Деньгина, Н.В. Станкова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: giyak@yandex.ru Гия Джемалиевич Капанадзе

С целью поиска объективной методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов был предложен тест вынужденного плавания. Представлены результаты экспериментального скрининга с использованием плавания животных с разными нагрузками. Был выбран оптимальный вариант.

Ключевые слова: оценка физической активности, изучение адаптогенной активности лекарственных препаратов, крысы линии WAG/GY, тест вынужденного плавания.

Для оценки адаптогенной активности препаратов используются ряд методик с использованием животных. Один из таких — широко известный тест Порсолта (Porsolt) или тест отчаяния [2].

Методика поведенческого отчаяния (беспомощности) по методу Порсолта является базисной моделью оценки антидепрессантов [1]. Суть метода состоит в том, что животные, попадая в воду, начинают проявлять бурную двигательную активность, направленную на поиск выхода из авersiveй (неприятной) ситуации. Затем животные оставляют попытки выбраться из сосуда и зависают в воде в характерной позе, оставаясь пол-

ностью неподвижными или совершая незначительные движения, необходимые для поддержания морды над поверхностью воды. Показателем выраженности депрессивного состояния по данному тесту является длительность неподвижности животных (иммобилизации). В тесте поведенческого отчаяния после активных попыток избавления из авersiveй ситуации у животных наступает стадия иммобилизации, которая отражает депрессивное состояние. Состояние иммобилизации оценивают визуально с определением ее длительности в течение 10 мин. наблюдения. Вещества с антидепрессивной активностью облегчают это

состояние, уменьшая длительность им- мобилизации.

Опираясь на описанный тест Пор- солта, мы решили разработать наиболее объективный способ оценки физической выносливости крыс в условиях стресса.

Целью работы являлась разработка объективной методики оценки физиче- ской выносливости мелких лаборатор- ных животных для дальнейшего изуче- ния адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов.

Материалы и методы

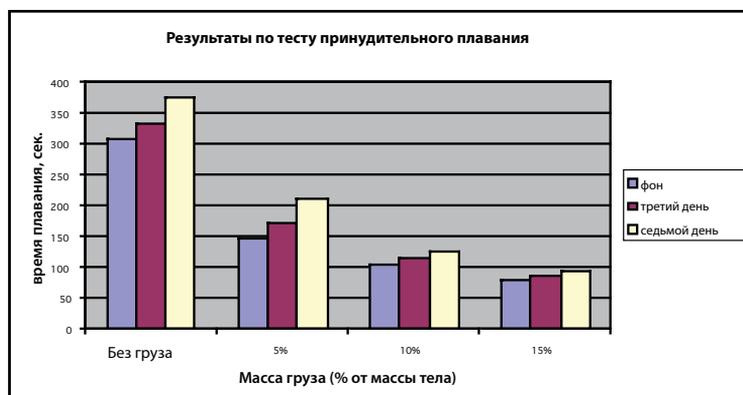
Исследования проводили в лаборатори- ии биомоделирования НЦБМТ РАМН на самцах крыс линии WAG/GY. Крыс содержали в пластиковых клетках при естественном освещении и температу- ре 20-22°C, кормили брикетированными комбикормами. Животные были взяты в эксперимент после 7 дней карантина. В эксперименте использовались половоз- релые самцы массой 230-240 г. Протокол эксперимента был рассмотрен и одобрен комиссией по биоэти- ке НЦБМТ РАМН.

Было сформиро- вано 4 группы живот- ных, в каждой группе находились по 6 голов крыс. Сосуды (сте- клянные прозрачные квадратные емкости размером в сечении 25x25x60 см.) напол- нялись водой на вы- соте 40 см. Животных метили водоустойчивой краской. Первая группа крыс запускалась в воду без груз- а. Животных второй группы помещали в воду с грузом, составляющей 5% от мас- сы тела, третья группа — с грузом 10% и

четвертая — грузом 15%. При наблюде- нии за животными засекали время их на- хождения в воде. Критическим являлся момент, когда животное было не в состо- янии удержаться над поверхностью воды самостоятельно. В этот момент крысу вынимали из воды, обсушивали полотен- цем и возвращали в клетку. Животные каждой группы плавали 3 раза — на 1, 3 и 7 день эксперимента.

Результаты и их обсуждение

Крысы вели себя в наших экспери- ментах в соответствии с описанной клас- сической методике Порсолта. При по- падании в воду животные начинали ак- тивно двигаться в поисках выхода. Впо- следствии они «зависали» в характерной позе без движения. Через некоторое вре- мя крыса начинала активно двигаться в поисках выхода из аверсивной ситуации. Уставая, животное начинало погружать- ся под воду все чаще и чаще, начиная то- нуть. Именно этот момент мы брали за точку окончания эксперимента.



Время плавания животных без груз- а на третий день по сравнению с фоно- вым показателем увеличилось на 7%, а на седьмой день — на 21%, что можно объяснить адаптацией животных к новой

среде и постепенным увеличением физической выносливости на фоне предельных нагрузок.

С грузом 5% время плавания животных в сравнении с первой группой значительно уменьшалась (почти в 2 раза), но при этом оставалась тенденция постепенного увеличения времени плавания в сравнении с фоновыми показателями. Аналогичная картина наблюдалась и в других группах при увеличении груза.

С нарастанием груза постепенно уменьшалось время плавания животных в целом, при этом уменьшался разрыв времени по отношению к фоновым показателям.

На наш взгляд, при оценке физической выносливости крыс для изучения адаптогенной активности лекарственных препаратов наиболее оптимальным является плавание животных с грузом 10% от массы тела. Груз 15% и более вызывает быстрое утомление животных, нарастает время восстановления организма. Трудно определить момент утопления, что может привести к их гибели. И, наоборот,

при плавании животных с грузом менее 5% эксперимент растягивается во времени, животные обучаются плавать, что может исказить результат.

С применением данной методики можно оценить физическую выносливость крыс в условиях стресса и предельных нагрузок. Метод удобен, прост в исполнении, не требует специального оборудования.

Список литературы

1. *Андреева Н.И.* Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ Минздрав РФ. — ЗАО ИИА Ремедиум. — 2000. — с.121-125.

2. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N. et al.* Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment // *Eur. J. Pharmacol.* — 1978. — v. 47. — p. 379-391.

Working out of a technique for physical endurance of small laboratory animals for studying of different medicine

V.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze, S.E. Dengina, N.V. Stankova

The forced swim test was offered with the purpose of the finding of objective estimation method of physical laboratory rats endurance for the study of different medicine activities. The results of experimental researches of rats swimming with different loadings are presented. Optimal method was determined.

Key words: estimation of physical activity, study of adaptogene medicine activity, rats WAG/GY line, forced swim test.

Морфологические изменения в области ложа желчного пузыря после воздействия препарата «Гемостоп» в эксперименте

Ю.А. Степанов¹, Н.Н. Каркищенко², М.Ф. Черкасов¹, В.Н. Каркищенко², Г.Д.Капанадзе²

¹– Ростовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Ростов-на-Дону

²– Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Гия Джемалиевич Капанадзе

В опыте на 25 животных была изучена эффективность отечественного гемостатического препарата «Гемостоп». В эксперименте была доказана эффективность препарата в достижении окончательного гемостаза при кровотечении из ложа желчного пузыря при холецистэктомии.

Ключевые слова: гемостоп, кровотечение, холецистэктомия.

Введение

В гепатобилиарной хирургии одними из важнейших задач, требующих новых подходов к решению, являются надежный и нетравматичный гемостаз и билистаз, от которых во многом зависит благоприятное течение послеоперационного периода. Описано множество методов остановки кровотечения при операциях на печени, однако проблема остается нерешенной [1].

Материалы и методы

В эксперименте на 25 мини-свиньях светлогорской породы в возрасте 6 месяцев с массой 20-22 кг проведены исследования по изучению морфофункциональных изменений в области ложа желчного пузыря при применении препарата «Гемостоп» после выполнения холецистэктомии.

Эксперимент предусматривал моделирование условий операции холецистэктомии. Всем животным выполнялась холецистэктомия с использованием для обработки ложа желчного пузыря препарата «Гемостоп».

Мини-свиньи для исследования процессов, происходящих в ложе желчного пузыря после применения препарата «Гемостоп» выбраны как достаточно хорошо изученный объект, имеющий много общих черт с человеком в анатомии и физиологии. Длина желчного пузыря у мини-свиней светлогорской породы составляет в среднем 6,0 — 10,0 см, своим дном прилежит к вентральному краю печени, что удовлетворяет условиям эксперимента.

Экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Министер-

ства Здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года.

Эксперимент проводился в специально оборудованных операционных в асептических условиях на V-образном столе желобе, изготовленного из металла-дюраля, отличающийся легкостью (5 кг), прочностью и устойчивостью к агрессивным средам и дезинфицирующим растворам в положении лежа на спине с фиксацией всех четырех конечностей [2].

Под 5% раствором тиопентала-натрия в физиологическом растворе внутривенно, после обработки операционного поля, всем мини-свиньям выполнялась лапаротомия, выделялся желчный пузырь и производилась типичная холецистэктомия от шейки с раздельной перевязкой пузырной артерии и пузырного протока. При выделении желчного пузыря из ложа не производилась его коагуляция а с целью гемостаза использовался новый отечественный препарат «Гемостоп».

«Гемостоп» является производным цеолита NaCaAX, обладающего высокой абсорбирующей способностью. Гемостатический эффект основан на быстром влагопоглощении. При контакте с кровью поглощается большой объем воды относительно массы и объема препарата, что приводит к локальной концентрации клеточных и крупных белковых компонентов крови (в т.ч. факторов свертывания), это в свою очередь индуцирует формирование кровяного сгустка. Кроме того, поверхностный потенциал цеолита способствует активации XII фактора свертываемости крови и тромбоцитов. «Гемостоп» также содержит кальций, который является ко-фактором во многих звеньях коагуляционного каскада. При использо-

вании изделие легко заполняет полость раны, не фиксируется к тканям, не всасывается, после применения легко удаляется механическим путем.

Порошок в количестве 20-25 грамм засыпали в ложе желчного пузыря, тампонировали марлевой салфеткой и через 5 минут удаляли тампон и вымывали остатки порошка для контроля гемостаза. Гемостаз считался достигнутым когда после удаления остатков порошка не наблюдалось видимого паренхиматозного кровотечения. Отметим, что во всех случаях после применения препарата, дополнительного гемостаза не понадобилось. По завершении операции брюшная полость ушивалась послойно наглухо. Кровопотеря во время операции составляла 100-150 мл.

Все животные хорошо перенесли операцию. Через 2–3 дня их было трудно отличить от неоперированных. Данные операции и послеоперационного наблюдения заносили в протокол. Срок наблюдения после операции от 1 до 14 суток. Общее состояние животных оценивали по их поведению, отношению к пище. В первый день послеоперационного периода животные получали только воду и находились на голодной диете, со второго дня их переводили на свободное кормление.

Животные выводились из эксперимента на 1 (5 свиньи), 3 (5 свиной), 5 (5 свиньи), 7 (5 свиньи) и 14 (5 свиной) сутки после оперативного вмешательства путем передозировки 5% раствора тиопентала-натрия введенного внутривенно.

Морфологическое исследование осуществлялось сразу после выведения животных из эксперимента. Проводилось макроскопическое описание ложа желчного пузыря и окружающих тканей и ор-

ганов. Для микроскопического исследования забирались фрагменты ложа желчного пузыря, обработанные препаратом «Гемостоп». Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, который после стандартной парафиновой проводки и изготовления парафиновых срезов толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и оригинальным методом по Маллори (специализированные окраски соединительной ткани). Аргирофильные волокна выявлялись методом серебрения по Футу, эластические — окраской по Вейгерту, для определения углеводных соединений использовалась ШИК-реакция. Микроскопическое исследование проводилось на микроскопе «DME» фирмы «LEICA» (Германия). Документирование результатов исследования выполнялось с помощью компьютерной программы анализа изображения «ДиаМорф Cito-W» (Россия), совмещенной с микроскопом.

Результаты и их обсуждение

Обзорная световая микроскопия гистологических препаратов печени экспериментальных мини-свиней спустя сутки после хирургического удаления желчного пузыря и обработки его ложа препаратом «Гемостоп» убеждает, прежде всего, в наличии в структурной организации органа классических пяти-шестиугольных печеночных долек, разделенных тонкими прослойками рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью. В принципе сохранено и балочное строение печеночных долек. В стенках обнаруживаемых в междольковой соединительной ткани кровеносных сосудов очевидны некоторые проявления деструктивных изменений — гомогенизация цитоплазмы

эндотелиоцитов и гладких миоцитов, гиперхроматоз их ядер. Утрата контуров клетками соединительной ткани сопряжена с незначительным отеком стромы печени. В просвете междольковых сосудов обычно обнаруживаются конгломераты из утративших форму и сконцентрировавшихся в сплошную массу эритроцитов. Характерные для междольковых кровеносных сосудов проявления подобного «застоя» эритроцитов также распространяются и во внутридольковые кровеносные капилляры (обычно расширены, особенно в центре дольки), центральные вены и поддольковые вены оттока крови их печеночной паренхимы. В их просветах весьма типично присутствие сгустков склеившихся и измененных по форме эритроцитов (рис. 1). В междольковых желчных выводных протоках весьма четко контурирован однослойный однорядный призматический каемчатый эпителий с малым объемом цитоплазмы эпителиоцитов и близ расположенными ядрами. Кариоплазма некоторых ядер гомогенизирована. В большинстве их видны глыбки хроматина и мелкие ядрышки.

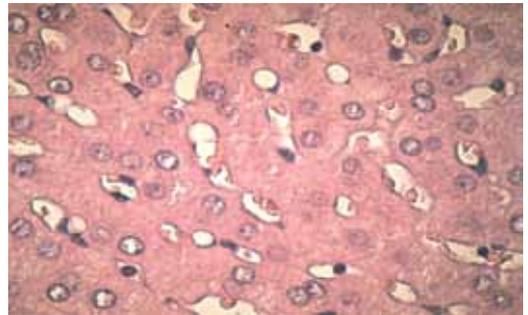


Рис. 1. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Свободнолежащие, агрегированные и агглютинированные эритроциты в расширенных синусоидах печени. Некроз и двуядерные гепатоциты. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

Морфологические изменения (локальные) очевидны и в более крупных артериальных (субсегментарных) и венозных синусах печени. По отношению к центрально проходящим в печеночных дольках венам (центральным) демонстративно радиальное расположение печеночных балок и внутривенных синусоидальных кровеносных капилляров. Гепатоциты периферических отделов долек в основном лежат сплошной массой «тесно прижавшись» друг к другу и кровеносные капилляры между печеночными балками (пластинками) выглядят в виде небольших дилатированных овальных пространств. Печеночные клетки, располагающиеся ближе к центру дольки, имеют крупные светлые ядра с узким ободком гетерохроматина под кариолеммой и типичными ядрышками. Встречаются гепатоциты с двумя ядрами или же с крупными ядрами и ядрышками. Последние обычно увеличены в размере, базофильны и нередко располагаются под кареолеммой. Очагово отмечается мутное набухание или зернистая дистрофия гепатоцитов, не являющаяся тяжелым повреждением клеток. Изредка обнаруживаются одиночные или небольшие группы из 1–3-х печеночных клеток с признаками цитолиза. Цитоплазма гепатоцитов также нередко вакуолизирована. Содержание гликогена весьма вариабельно (вплоть до отсутствия) в разных клетках и в разных дольках, но всегда его снижение более выражено по периферии печеночных долек. В печеночной паренхиме, расположенной под капсулой, гепатоциты также отличаются базофилией ядер и небольшим количеством глыбок хроматина (явно очевидна тенденция его к маргинации) в их кариоплазме, малыми размерами ядрышек, слабой базофилией, вакуолизацией и го-

могенизацией цитоплазмы. Достаточно много двухъядерных клеток.

На поверхности и вне среза ткани печени, а также в просвете сосудов определяются одиночные, разной величины (размером от гепатоцита до лимфоцита), чаще круглые, малопрозрачные, опалесцирующие, ШИК-положительные чужеродные структурные элементы «Гемостопа» с центральным X-образным или звездообразным дефектом в центре, которые могут фрагментироваться по протяжении этих дефектов и давать клиновидные, округлые или другой формы, но чаще овальные малкие осколки. В просвете сосудов, точнее — синусоидов этих структур могут лежать внахлест, но чаще становятся гомогенными, слабобазофильными. Эти массы эмболизируют просвет синусоидов на большем или меньшем протяжении, прижимают к стенке имеющиеся в просвете синусоидов эритроциты провоцируя их агрегацию или агглютинацию, нарушая или прерывая микроциркуляцию. По мере утилизации эти массы в просвете синусоидов становятся мелкозернистополоволоконистыми. Это вещество активно фагоцитируется клетками Купфера, которые раздуваясь при этом фагоцитозе, блокируют просвет синусоида.

На уровне ткани печени и отдельных долек синусоиды очагово расширены. Эндотелиоциты не определяются на значительном протяжении. Количество клеток Купфера увеличено, ядра некоторых из них — резко гипертрофированы. Однако большинство клеток Купфера пребывают в состоянии фагоцитоза, увеличены в размере, имеют овальную или шаровидную форму с отжатым к цитолемме ядром (рис. 2, 3).

В цитоплазме их определяется слабо базофильная, почти бесцветная го-

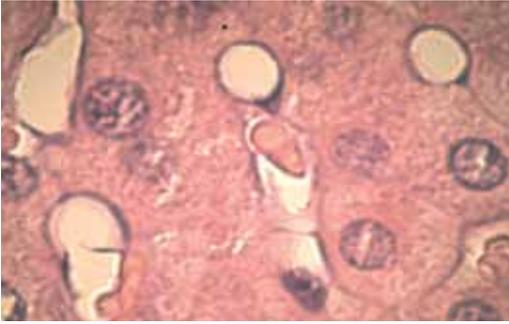


Рис. 2. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Эмболия синусоидов печени «Гемостопом». Фагоцитоз «Гемостопа» клетками Купфера. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х1000

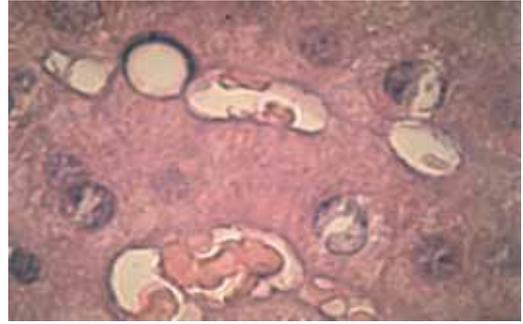


Рис. 3. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). «Гемостоп» и агглютированные эритроциты в синусоидах печени. Клетки Купфера с фагоцитированным «Гемостопом». Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х1000

могенная масса, иногда чуть отстоящая от плазмолеммы раздутой клетки Купфера через посредство мелких резорбционных вакуолей. Такие клетки ШИК-отрицательны и часто блокируют просвет синусов. В просвете последних редко встречаются единичные неизмененные эритроциты, или скопления их в виде «монетных столбиков», или остатки разрушенных эритроцитов. Однако на незначительном протяжении отмечается сладжирование крови с формированием очагово перекрывающих просвет синусои-

дов мелких округлых или удлинённых, прижатых к стенке синусоида структур из агрегированных (чаще) или агглютированных эритроцитов (рис. 4).

Примечательно, что скопления агглютированных эритроцитов обычно прижаты к стенке синусоида гомогенными почти бесцветными массами «Гемостопа». Пространства Диссе не определяются. Вены триад содержат эритроциты с выраженным отмежеванием плазмы. Центральные вены чаще пусты, или содержат плазму, или небольшое количество эритроцитов, редко — полнокров-

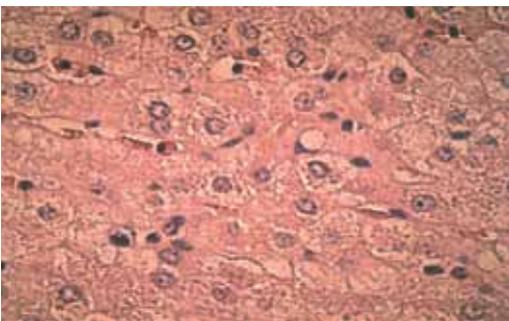


Рис. 4. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Сладжирование крови. Дистрофия гепатоцитов. «Гемостоп», эозинофил в просвете синусоидов. Клетка Купфера (в центре) с фагоцитированным «Гемостопом». Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

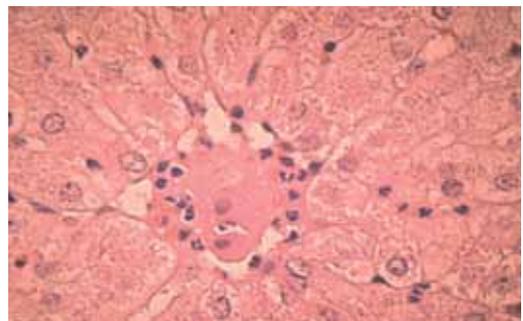


Рис. 5. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Сладжирование крови. Дистрофия гепатоцитов. «Гемостоп», эозинофил в просвете синусоидов. Клетка Купфера (в центре) с фагоцитированным «Гемостопом». Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

ны. Иногда в их просвете определяются полиморфноядерные лейкоциты (рис. 5), колонии микроорганизмов (рис. 6).

Поддольковые вены пусты и содер-

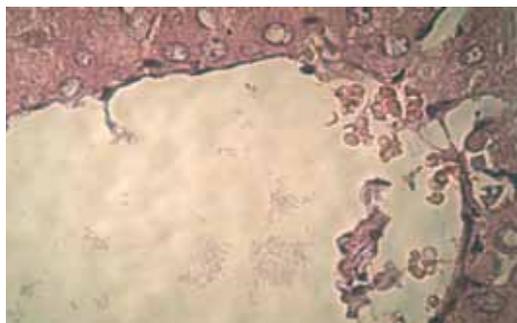


Рис. 6. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (1 сутки). Колонии микроорганизмов в просвете центральной вены. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

жат эритроциты или плазму со следами «Гемостопа». В них также встречаются колонии микроорганизмов — вероятный результат блокады клеток Купфера.

При гистологическом исследовании ткани печени экспериментальных животных на 3-и сутки, в отличие от 1-х, наблюдались следующие изменения:

1. Синусоиды чаще были расширены, что является компенсаторно — адаптивной реакцией на гипоксию.

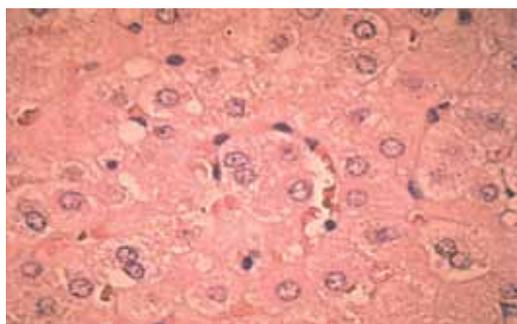


Рис. 7. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (3 сутки). Лизис агглютированных эритроцитов в синусоидах печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

2. Очагово выражен лизис агглютированных эритроцитов (рис. 7) и деструкция «Гемостопа», что улучшает реологические показатели крови.

3. В синусоидах (рис. 8) очагово определяются единичные не измененные эритроциты, ПЯЛ и лизирующиеся агглютинаты эритроцитов, а также фрагменты этих клеток, что отражает положительную динамику реологических показателей крови, несмотря на еще часто определяемые очаги агрегации и агглютинации эритроцитов.

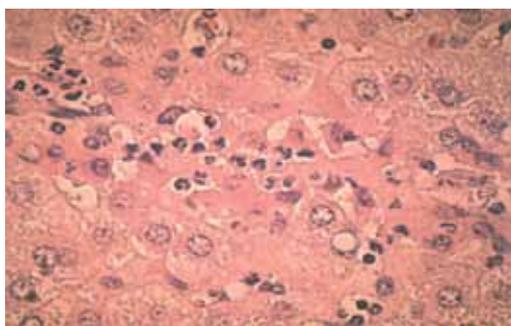


Рис. 8. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (3 сутки). Полиморфноядерные лейкоциты в просвете синусоидов (вверху справа эозинофилы). Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

4. В просвете не только некоторых синусоидов, но и других сосудов (особенно в зоне триад), а также в окружающей соединительной ткани появляются единичные группы полиморфноядерных лейкоцитов (рис. 9), что свидетельствует об активации микроциркуляции. Отмечаемые явления ПЯЛ — инфильтрации перипортальной соединительной ткани преимущественно в зоне триад. Эти изменения идут на фоне очагового лизиса эритроцитов и деструкции «Гемостопа».

5. Примечательно увеличение количества и дегрануляции эозинофилов

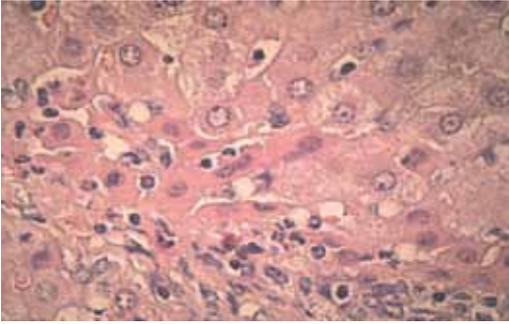


Рис. 9. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (3 сутки). Полиморфноядерная инфильтрация междольковой соединительной ткани печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

(редко до 2-3-х в поле зрения микроскопа при х400).

6. На этом фоне уменьшается выраженность зернистой дистрофии гепатоцитов. Имеющиеся одиночные или небольшие группы гепатоцитов в состоянии колликвационного некроза окружаются небольшими (до 10-15 клеток) скоплениями ПЯЛ.

Таким образом, проведенное гистологическое исследование печени экспериментальных животных на 1-е сутки свидетельствует об обнаружении проявлений нарушения микроциркуляции в приречных (поврежденных) участках органа в связи с блокированием прохождения крови по синусоидам. Последние (на этот срок исследования) заполнены «Гемостопом», который очагово не только заполняет просвет синусоидов, но и прессирует имеющиеся в нем эритроциты. Эти изменения очагово нарушают микроциркуляцию и в некоторых других сосудах (полнокровие вен триад или наличие только плазмы в некоторых поддольковых венах).

Поскольку нарушение микроциркуляции в печени не является тотальным, поэтому дистрофические изменения гепатоцитов носят очаговый и нерезко выра-

женный характер и относятся, вероятно, к гипоксическим.

«Гемостоп» активно фагоцитируется клетками Купфера, блокада которых ослабляет иммунитет, что подтверждается наличием колоний микроорганизмов в просвете вен, отводящих кровь из печени.

Как показали гистологические исследования печени экспериментальных животных на 3-и сутки выраженность патологических изменений ее гепатоцитов типа зернистой дистрофии и мелкоочагового некроза с ПЯЛ-инфильтрацией существенно не нарастает и обусловлена, как и на 1-е сутки, состоянием микроциркуляции в органе. Наблюдавшееся ее улучшение, вероятнее всего связано с лизисом агглютинированных эритроцитов и деструкцией «Гемостоп-эмболов». Объективным показателем этого (в том числе и реологии крови) в этот срок является появление полиморфноядерных лейкоцитов в просвете венозных сосудов и синусов.

Фрагменты печени экспериментальных животных, взятые на 5-е сутки после холецистэктомии, в принципе имеют близкое к нормальному строению ее стромы и паренхимы. Прежде всего это относится к кровеносным сосудам и желчным протокам междольковой соединительной ткани. Некоторое исключение составляют проявления реактивности эндотелиальных клеток артерии, приобретающих шарообразную форму, гиперхромия ядер, более выраженную плотность цитоплазмы и направляющих свои (1-3) шипообразные отростки к внутренней эластической мембране интимы. Ядродержащие участки эндотелия выступают в просвет артерии, обуславливая выраженный бугристый вид ее внутренней поверхности. Эритроциты в просвете сосудов практически все име-

ют форму дисков и лишь в венах изредка обнаруживаются их мелкие конгломераты. Внутريدольковые капилляры имеют просвет в виде щели в участках, прилежащих к центральной вене, а на периферии печеночных долек — ближе к овалу. Междольковая соединительная ткань в виде тонких ее прослоек обуславливает четкое контурирование границ между смежными печеночными дольками. В природной конструкции последних сохранено наличие радиально расположенных между капиллярами печеночных балок, образованных гепатоцитами. Последние несколько увеличены в размерах и характеризуются присутствием зернистого содержимого в цитоплазме. В крупных светлых округлой формы ядрах видны мелкие ядрышки и глыбки хроматина под кариотеккой. Встречаются двухъядерные клетки.

При гистологическом исследовании печени на 7-е сутки у экспериментальных животных нами отмечены следующие существенные изменения в морфологии органа:

1. Продолжается лизис агглютированных эритроцитов и «Гемостоп-эмболов» в синусоидах печени (рис. 10).

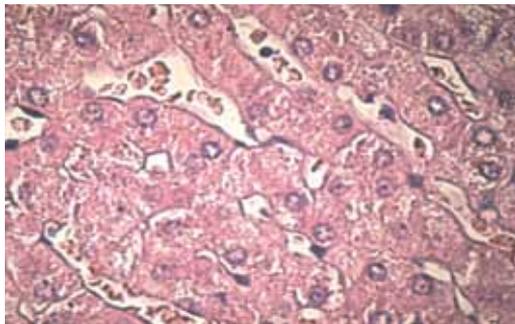


Рис. 10. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (7 сутки). Восстановление реологических свойств крови при лизисе агглютированных эритроцитов и «Гемостопа» в синусоидах печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

2. Нарастает ПЯЛ — инфильтрация некротизированных гепатоцитов; увеличивается количество нейтрофилов и в просвете венозных синусов и синусоидов (рис. 11).

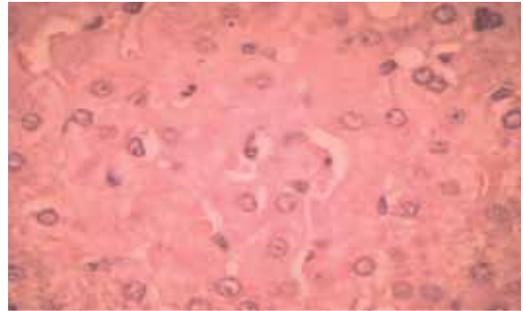


Рис. 11. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (7 сутки). Полиморфноядерные лейкоциты в просвете синусоидов печени. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

3. Появляются мелкие лимфоциточные инфильтраты вокруг отдельных атрофированных или единичных некротизированных гепатоцитов.

На 14-е сутки эксперимента в печени подопытных животных также отмечены:

1. Более тщательная ликвидация расстройств реологических свойств крови (рис. 12) на фоне восстановленной ми-

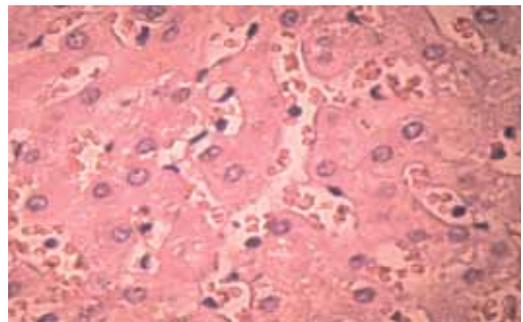


Рис. 12. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (14 сутки). Различная выраженность расстройств реологических свойств крови. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

кроциркуляции в синусоидах печени, поскольку мелкие агрегаты эритроцитов и остатки «Гемостоп-эмболов» еще сохранены в просвете синусоидов (рис. 13).

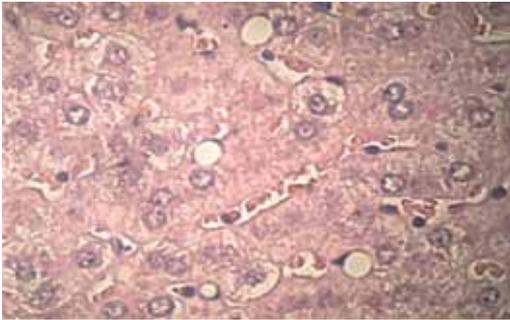


Рис. 13. Морфологические изменения в ложе желчного пузыря после воздействия препаратом «Гемостоп» (14 сутки). «Гемостоп» в просвете синусоидов и в клетках Купфера (4 клетки). Агглютинация эритроцитов. Гидропическая дистрофия гепатоцитов. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.х400

2. Обнаружение участков с более плотным расположением двуядерных и полиплоидных гепатоцитов.

3. Готовность к полноценному участию в кровоснабжении печени, кроме синусоидов, гораздо большего количества прочих венозных сосудов.

Таким образом, сохранность гепатоцитов и восстановление микроциркуляции в этом сроке наиболее выражена.

Выводы

Проведенные гистологические исследования показали, что «Гемостоп» вызывает мозаичную эмболию синусоидов и сладжирование крови вплоть до агглютинации эритроцитов. Мозаичная блокада синусоидов (очаговый тромбоз при сладжировании крови и «Гемостоп-эмболия») обеспечивают не только гемостатический эффект, но и удовлетворительную сохранность гепатоцитов.

Список литературы

1. *Борисов А.Е., Левин В.А., Земляной В.П. и др.* Технические особенности лапароскопической холецистэктомии и ее осложнения. СПб.: ООП НИИХ СПб ГУ. — 2001. — с. 188.
2. *Каркищенко Н.Н., Грачева С.В.* Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С. — 2010. — с. 358.

Morphological changes in the gallbladder bed after exposure to the drug «Gemostop» in experiment

Y.A. Stepanov, N.N. Karkischenko, M.F. Cherkasov, V.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze

In the experiment on 25 animals were studied the effectiveness of domestic haemostatic drug «Gemostop». In the experiment proved the effectiveness of the drug to achieve final hemostasis in bleeding sludge gallbladder at cholecystectomy.

Key words: gemostop, bleeding, cholecystectomy.

Сравнительная характеристика и возможность использования наркотизирующих препаратов Золетил 100 и диэтиловый эфир при проведении операций по вживлению ЭЭГ-электродов на крысах

Ю.В.Фокин, Д.С.Сахаров

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

*Контактная информация: fokin-yuri@yandex.ru Юрий Владимирович Фокин,
saxarovdm@yandex.ru Дмитрий Сергеевич Сахаров.*

Подбор правильного вида наркоза при проведении электроэнцефалографических, диагностических и прочих исследований и операций на животных – важная задача для специалистов. Некачественный наркоз или недостаточный по силе может значительно осложнить работу и даже привести к гибели животного. При проведении полостных операций на крысах предпочтительнее использовать те наркотизирующие препараты, соотношение длительности наркозного влияния, степени обезболивания и уровня миорелаксации которых является оптимальным.

Ключевые слова: крысы, наркоз, Золетил 100, диэтиловый эфир, длительность наркоза, болевая чувствительность, миорелаксация, электроэнцефалография.

По современным данным наркоз — состояние, характеризующееся обратимым угнетением центральной нервной системы, проявляющееся в выключении сознания, подавлении чувствительности (в первую очередь — болевой), рефлекторных реакций и снижении тонуса мышц.

Вопросы анестезиологии и реаниматологии в клинике мелких животных сегодня являются достаточно острыми и актуальными. Несомненно, это связано с возросшим уровнем хирургической помощи животным, расширением спектра и объема оперативных вмешательств, появлением новых хирургических методов лечения, позволяющих даже в критических ситуациях сохранить жизнь животному [2].

Подбор правильного вида и способа введения наркоза при проведении различных исследований и операций на живот-

ных — важная задача для специалистов. Некачественный или недостаточный по силе наркоз может значительно осложнить работу или вызвать гибель животного. Однако вероятность анестезиологического риска (летального исхода при проведении наркоза) у немолодых животных, а также постанестезиологических осложнений порой несколько преувеличивается практикующими врачами, с целью оградить себя от ответственности, связанной с возможной смертью животного. Это, в свою очередь, формирует ложное мнение у владельцев и часто приводит к отказу от важных диагностических исследований и хирургических манипуляций, результатом чего является сокращение жизни их питомцев.

Выбор вида анестезии зависит от возраста и общего состояния больного животного, объема оперативного вмеша-

тельства, технических возможностей клиники (наличие наркозной аппаратуры, медикаментозное обеспечение и т.д.), квалификации врача.

Однако следует заметить, что не все виды наркоза сходны по своей глубине (силе наркотизирующего эффекта) — степени обезболивания (анальгезии), длительности действия и уровню миорелаксации. Ранее были проведены исследования по изучению влияния неингаляционных препаратов для общей анестезии (в т.ч. и Золетила 100) на макаках резусах, одним из заключений которых являлась рекомендация использовать комбинацию «золетил 100 + ксилазин» для проведения серьезных манипуляций с данными животными [3]. В связи с чем нам показалось интересным провести эксперимент, протестировав наиболее доступные виды неингаляционного и ингаляционного наркоза (золетил 100 и диэтиловый эфир), чтобы сравнить их по нескольким вышеописанным показателям и оценить возможность их применения на лабораторных крысах при проведении операций по вживлению ЭЭГ-электродов, что и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в НЦБМТ РАМН на 5 крысах линии WAG/GY трехмесячного возраста (самки), массой 210–250 г. Содержание животных — по барьерной системе, в клетке со свободным доступом к питью и пище (комбинированный корм, фирма ООО «Лабораторкорм»), зоогигиенические показатели — в пределах нормы, микробиологический статус — SPF.

В качестве неингаляционного наркоза использовался «Zoletil 100» — препарат для общей анестезии, содержащий в ка-

честве действующих веществ тилетамина гидрохлорид и золазепам гидрохлорид. Тилетамин — общий анестетик диссоциативного действия, вызывающий выраженный анальгетический эффект, но недостаточное расслабление мышц. Он не подавляет глоточный, гортанный, кашлевой рефлекс, не угнетает дыхательную систему. Золазепам угнетает подкорковые области мозга, вызывая анксиолитическое и седативное действие, расслабляет поперечно-полосатую мускулатуру, усиливает анестетическое действие тилетамина. Он также предотвращает судороги, вызванные тилетаминем, улучшает мышечную релаксацию и ускоряет восстановление после наркоза. Выход из наркоза постепенный (2–6 часов) и спокойный, при условии отсутствия шума и яркого света. Препарат вводился внутривенно, в дозе 50 мг/кг.

Для ингаляционного наркоза нами был применен диэтиловый эфир — достаточно сильный анестетик, который долгое время широко использовался в ветеринарии при проведении хирургических манипуляций с мелкими животными (собаки, кошки, морские свинки, крысы, хомяки, мыши). Эфир практически не угнетает гемодинамику и функцию паренхиматозных органов, дает выраженный анальгезирующий эффект и хорошую мышечную релаксацию. Однако препарат имеет и ряд недостатков: раздражающее действие на слизистые оболочки с последующим усилением секретобразования, длительный период возбуждения и посленаркозного пробуждения [1]. Наркотизация препаратом осуществлялась в специальной маске, время наркотизации (до признаков глубокого наркоза) строго контролировалось.

Для оценки эффективности данных препаратов мы рассматривали *длитель-*

ность их наркотического влияния, степень обезболивания и уровень миорелаксации.

Длительность наркотического влияния определялась визуально с момента наступления наркоза (полного обездвиживания животных, замедления дыхания, уменьшения частоты сердечных сокращений, снижения чувствительности при болевом раздражении и т.д.) до момента полного окончания его воздействия (восстановление дыхательной и сердечной активности, свободное передвижение по клетке); время фиксировалось с помощью секундомера.

Уровень миорелаксации также определялся визуально и оценивался по балльной шкале в зависимости от двигательной активности животного в состоянии наркоза:

0 баллов — недостаточная миорелаксация, что характеризовалось «ползанием по клетке»;

1 балл — соответствовал шевелению конечностями, встряхиванию головы и т.д.;

2 балла — уровень миорелаксации, выражающийся в эпизодическом подергивании одной лапкой, движении вибриссов или языка и т.д.);

3 балла — полная миорелаксация (абсолютно обездвиженное животное).

Статистическая оценка достоверности различия данных по уровню миорелаксации и длительности наркотического влияния проводилась с помощью критерия Вилкоксона (как для зависимых выборок).

Степень обезболивания оценивали с помощью комплекса SONOTRACK (Metris, Нидерланды), анализируя частоту вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне. Для записи колебаний от 20 кГц до 90 кГц использовали специальный

микрофон. Оценка достоверности различий средних значений частот проводилась с применением факторного анализа ANOVA.

Эксперимент по определению степени устранения болевого эффекта в состоянии наркоза был разделен на следующие этапы:

I этап: помещение крысы в специально оборудованную клетку и регистрация с помощью системы SONOTRACK вокализации животного в состоянии бодрствования;

II этап: применение болевого раздражения (электростимуляция постоянным током в 1 А, напряжение 25 В) и запись ультразвуковой вокализации крысы;

III этап: введение наркоза и фиксирование ультразвука на стадии «глубокого наркоза»;

IV этап: электростимуляция на фоне состояния наркоза и запись вокализации животного.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных исследований показали качественные различия наркотического влияния на организм препаратов Золетил 100 и диэтиловый эфир.

Результаты по степени обезболивания (табл. 1 и 2) показали, что в состоянии бодрствования частота вокализации крыс находится в диапазоне 35-45 кГц. При болевом раздражении — достоверно увеличивается ($p=0,01$ для золетила 100 и $p=0,0006$ для эфира) и составляет примерно 50-90 кГц. В состоянии наркоза животные, на которых был использован Золетил 100, издают ультразвук, частота которого достоверно не отличается от фоновых данных. При использовании диэтилового эфира вокализации в состоянии наркоза у животных зафик-

сировано не было (прочерк в таблицах). При болевом раздражении животных, находящихся в состоянии наркоза, средняя частота вокализации при использовании золетила 100 и эфира составила 46,6 кГц и 38,6 кГц соответственно, что не отли-

чается от средних значений фоновых показателей, но достоверно отличаются от значений, полученных при электрокожном раздражении ($p=0,041$ для золетила и $p=0,0044$ для эфира).

Таблица 1

Измерение уровня звуковых колебаний при вокализации лабораторных крыс в различных состояниях, кГц (вид наркоза: Золетил 100)

Состояние бодрствования (фон)	Болевое раздражение	Состояние наркоза	Болевое раздражение в состоянии наркоза
37	73	–	48
40	56	37	37
37	53	37	37
43	92	66	65
41	67	44	46

Таблица 2

Измерение уровня звуковых колебаний при вокализации лабораторных крыс в различных состояниях, кГц (вид наркоза: эфир)

Состояние бодрствования (фон)	Болевое раздражение	Состояние наркоза	Болевое раздражение в состоянии наркоза
38	53	–	39
35	92	–	38
43	65	–	39
41	58	–	40
40	61	–	37

Таблица 3
Длительность наркотического влияния
(N=5, p=0.043), час.

Продолжительность действия Золетила 100	Продолжительность действия эфира
3,1	0,25
3,4	0,17
4,0	0,25
3,7	0,30
3,6	0,21

По степени обездвиживания наркотизированных животных средняя оценка золетила 100 составила 1,4 балла, средняя оценка эфира — 2,8 балла (из трех возможных). Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4
Степень миорелаксации животных
(в баллах) N=5, p=0,043

Оценка миорелаксационных свойств Золетила 100	Оценка миорелаксационных свойств диэтилового эфира
2	3
1	2
1	3
1	3
2	3

Ранее было установлено [4], что «болевым порогом» для крыс является частота вокализации, равная приблизительно 50 кГц. Сравнивая полученные результаты (см. табл. 2 и 3) с литературными данными, можно сказать, что все животные в состоянии бодрствования характеризовались практически идентичными показателями, не превышающими «болевого порога». При воздействии электрического тока частоты вокализации крыс также

практически одинаковы по своим числовым значениям и свидетельствуют о том, что животные находятся в состоянии болевого шока.

Животные, на которых был использован диэтиловый эфир, характеризовались абсолютным отсутствием вокализации в состоянии наркоза, что позволило сделать заключение о том, что эфир, по сравнению с Золетилем 100 (при котором вокализация наблюдалась), является более «глубоким» наркозом и значительно лучше обеспечивает снижение болевой чувствительности. Напротив, при использовании Золетила 100, возможно, состояние медикаментозного сна (как одного из компонентов глубокого наркоза) достигается не полностью, то есть этот вид наркоза может не обеспечивать достаточного снижения болевой чувствительности, вследствие чего после операции животное погибает от «болевого шока».

Сравнивая средние показатели длительности воздействия Золетила 100 и диэтилового эфира, можно сказать, что наркотическое влияние золетила превышает таковое эфира почти в 15 раз. По этой причине, при использовании эфира, требуется контролировать процесс выхода животного из наркоза и применять (по необходимости) дополнительные средства, обеспечивающие наркотизирующий эффект во время длительных операционных воздействий.

Анализ результатов по степени миорелаксации животных в состоянии наркоза говорит о том, что по данному показателю эфир в среднем в 2 раза превосходит золетил. Необходимое расслабление мышц наркотизированного животного во время операции значительно облегчает работу хирурга.

Выводы

1. Препарат для общей анестезии Золетил 100 не обеспечивает должным образом снижения болевой чувствительности крыс во время операционных воздействий.

2. Использование Золетила 100 при проведении операций на лабораторных крысах по вживлению электроэнцефалографических электродов нежелательно.

3. Диэтиловый эфир, как препарат для общей анестезии, значительно, по сравнению с золетилом 100, устраняет болевой эффект, является более «глубоким» наркозом, обеспечивающим хорошую миорелаксацию во время операции.

4. Длительность воздействия эфира почти в 15 раз уступает длительности воздействия золетила 100, поэтому необходимо тщательно контролировать процесс выхода животного из наркоза, проводить операцию в максимально сжатые сроки, либо использовать дополнительные препараты, с целью продления состояния медикаментозного сна.

Список литературы

1. *Елинов Н.П., Громова Э.Г., Синев Д.Н.* Справочник по лекарственным препаратам с рецептурой. — СПб.: Гиппократ. — 1994. — с.768–776.

2. *Назаров И.П.* Анестезиология и реаниматология. Учебное пособие для врачей и студентов ВУЗов. — М.: Высшая школа. — 1997. — с.12.

3. *Ревякин А.О., Касинская Н.В., Зобова Л.Н.* Влияние неингаляционных препаратов для общей анестезии, их сочетаний и схем применения на макак резусах. // Биомедицина. — 2009. — № 2. — с. 81–84.

4. *Amir S.* Effects of ACTH on responsiveness in mice. Interaction with morphine. — *Neuropharmacology*. — 1981. — Vol. 20. — p. 959–961.

The comparative characteristic and use possibility of anesthetizing preparations of zoletil 100 and a diethyl ether at carrying out of operations on implantation of EEG-electrodes for rats

Yu.V. Fokin, D.S. Sakharov

Selection of a correct kind of a narcosis at carrying out of electroencephalographic, diagnostic and other researches and operations on animals – the important problem for experts. The poor-quality narcosis or insufficient on force can complicate considerably work and even bring to ruin an animal. At carrying out of cavitory operations on rats it is more preferable to use those anaesthetising preparations, a parity of duration of narcotic influence, anaesthesia and level degree relaxation of muscles which is optimum.

Key words: rats, narcosis, Zoletil 100, diethyl ether, duration of a narcosis, painful sensitivity, relaxation of muscles, electroencephalography.



Изоляторные системы – новый методический подход в медико-биологических исследованиях

Л.А. Болотских, Х.Х. Семенов, И.Ю. Егорова, Т.В. Галахова, Т.Б. Бескова, Н. В. Касинская

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: тел. (495) 561-5257 к.с.х.н. Любовь Александровна Болотских

Разработана технология получения и выращивания гнотобиотических, в т.ч. лабораторных животных СПФ-статуса в изоляторной системе. Усовершенствованные методические приемы могут быть успешно использованы в лабораторном животноводстве для очистки конвенциональных животных от патогенной микрофлоры и перевода их в СПФ статус. Новый методический подход позволяет стандартизировать объекты медико-биологического исследования по микробиологическому статусу и повысить достоверность результатов эксперимента.

Ключевые слова: изоляторная система, гнотобиотический подход, гнотобиотические животные, СПФ-животные.

В связи с бурным развитием биотехнологии возрастают требования стандартности лабораторных животных как источника и продуцента биологического материала, объекта моделирования, универсальной биологической тест-системы для выявления и оценки мутагенных, канцерогенных, тератогенных, контаминирующих и других свойств и влияний среды, а также в доклинических испытаниях лекарственных и иммунобиологических препаратов [3]. В экспериментальной медицине все большее применение находят различные категории гнотобиотических животных. Все более очевидной становится необходимость проведе-

ния исследований на животных, свободных от специфических патогенных факторов (СПФ) в самых различных областях медико-биологических исследований. Предпочтение таких животных в научных экспериментах обусловлено тем, что значительно уменьшается риск появления у них спонтанной инфекции на экспериментальное воздействие, которое всегда является стрессовым фактором для организма. Важность учета влияния переменного микробного фактора, при оценке ответной реакции у лабораторных животных, имеет значение в экспериментальной патологии, физиологии, иммунологии, фармакологии, токсико-

логии, радиобиологии, биохимии и других областях медико-биологических исследований.

Вместе с тем, существовавшие до сих пор методы биологической изоляции и контроля микробного воздействия являются недостаточно совершенными и не позволяют надежно контролировать переменный микробный фактор. Используемые в экспериментах обычные лабораторные животные не контролируются по микрофлоре, что препятствует их стандартизации.

Различного рода инфекционные заболевания не только искажают полученные экспериментальные данные, но и ставят под угрозу гибель особо ценных лабораторных животных, в т.ч. и племенные ядра линейных мышей коллекционного фонда НЦБТМ РАМН.

Новым методическим подходом, позволяющим преодолеть эти недостатки и обеспечить стандартность объектов медико-биологического исследования по микрофлоре, является использование новых современных изоляторных систем. За основу в работе была положена гнотобиотехнология. В работе обобщены данные собственного опыта (с 1976 по 2010 гг.) по разработке технологии гнотобиологических систем, включающих аппаратуру и комплекс методических приемов по получению и выращиванию различных категорий гнотобиотических в т.ч. животных СПФ-статуса, контролируемых по микробному фактору [1, 2, 5, 6].

Материалы и методы

Работа проводилась с конвенциональными мышами коллекционного фонда: WR, BRSUNT, C57B7/6, AKR, DBA/2, BALB/c. В качестве самок-кормилиц ис-

пользовали мышей СПФ-статуса линии BALB/c-wal и гибриды (DBA/2×BALB/c). Очистка мышей коллекционного фонда от патогенной микрофлоры проводилась методом гистерэктомии. Животные получали стерильный гранулированный корм и белково-витаминную добавку.

В работе использовали новое зарубежное и отечественное оборудование: изоляторная система «RAIR Isosistemtm», английский гнотобиологический изолятор «TCOL», ламинар — С-1,2; стерилизатор воздушный ГП-640-ПЗ, автоклавы ГК-100-ЗМ и т.д. Зарубежное оборудование было закуплено в 2008-2010 гг. специально для воспроизводства гнотобиотических животных.

В создании коллекционного фонда мышей СПФ-статуса строго соблюдали гнотобиологическую технологию, которая включает аппаратуру и комплекс методологических приемов, направленных на получение и поддержание гнотобиотических в т.ч. СПФ-категорий животных. Основой гнотобиологической аппаратуры в данном случае был не гнотобиологический изолятор, а приобретенная современная зарубежная изоляторная вентилируемая система «RAIR». Данная изоляторная система содержания лабораторных животных обеспечивает защиту не только самих лабораторных животных, но и обслуживающего их персонала. Специальные воздушные клапаны очищают воздух, обеспечивая комфортную температуру и влажность для животных, а также снижают контакт обслуживающего персонала с животными, обеспечивая очистку воздуха помещений от аллергенных частиц кожи и шерсти животных, существенно снижает запахи в помещении, что улучшает условия работы для персонала. В течение часа воздух в клетке обменивается до 50 раз,

при этом система обеспечивает его подачу в клетку без сквозняков. При полном отключении микро-изолятора от системы воздухоподачи СПФ-статус животных сохраняется до четырех часов, за счет специального фильтра, размещаемого в крышке изолятора, что позволяет не только переносить клетки в пределах одного учреждения, но и перевозить их на значительное расстояние. Специальные датчики постоянно следят за состоянием микро-изолятора, отображая его условия на табло, что существенно упрощает обслуживание клеток. Обслуживание микро-изоляторов производится по стандартным операционным процедурам, как правило, не вызывающим существенных затруднений в работе.

Подготовка изоляторной системы к работе

Монтаж и первичная подготовка изоляторной системы к работе была произведена фирмой изготовителем. Также фирма-изготовитель обеспечила обучение обслуживающего персонала основным навыкам работы. Изоляторная система состоит из 144 клеток для содержания мышей, которые снабжают стерильным воздухом (рис. 1). Каж-



дая клетка снабжена входным и выходным фильтрами и представляет собой

микро-изолятор. Поэтому после первичного подключения работа обслуживающего персонала должна быть направлена на подготовку каждой клетки к работе, как обычного гнотобиологического изолятора. Клетки, после тщательной мойки в дезрастворе, стерилизуют в воздушном стерилизаторе. В стерильные клетки микро-изоляторы проводят всё необходимое для жизнеобеспечения животных: стерильные опилки, корм, воду и т.д. Всю работу с данной клеткой проводят в ламинаре (рис. 2). Заселение животными также производят при стерильном потоке воздуха в ламинаре.



Стерилизация

Стерилизацию проводят в основном в воздушном стерилизаторе ГП-640-ПЗ. Для новых микро-изоляторов были разработаны оптимальные режимы стерилизации. Клетки стерилизуют в воздушном стерилизаторе при 120°C в течение 5-7 минут. Подстилочный материал стерилизуют дважды. Сначала опилки стерилизовали в специальной ёмкости, а затем вторично с клеткой в воздушном стерилизаторе.

Корм и воду стерилизуют в автоклаве ГК-100-3М. Корм расфасовывают в хлопчатобумажные мешочки и автоклавируют с вакуумом при 1,2 атм. в тече-

ние 20 минут. Воду автоклавируют в стеклянной посуде при 2 атм. в течение 1 часа. Следует отметить, что гранулированный корм можно стерилизовать и в воздушном стерилизаторе при соответствующих режимах стерилизации.

Апробирован и другой способ стерилизации гранулированного корма гамма-лучами. Этот вид стерилизации считается наиболее щадящим по отношению к питательным веществам и, в первую очередь, к витаминам. Гранулированный корм расфасовывают в полиэтиленовые мешочки, устойчивые к химическим дезинфектантам и обладающим определенной механической прочностью. Запаявают мешочки на машине для сварки полиэтиленовых пленок М6-АП-2С. Герметично запаянные мешочки несколько большего размера. Упакованный в двойные мешочки корм подвергают облучению в дозе 2,5 Мрад на кобальтовом облучателе. Однако этот вид стерилизации требует больших материальных затрат.

Получение и выращивание гнотобиотических в т.ч. СПФ животных в изоляторной системе

Современное оборудование позволило усовершенствовать методические приемы получения стерильного потомства лабораторных животных. Вместо обычных гнотобиологических изоляторов, на подготовку которых уходило много времени (стерилизация изолятора, продувка, проведение стерильного корма, воды, опилок, клеток, крышек и т.д.), мы брали стерильную клетку микро-изолятор. В микро-изолятор помещали самку-кормилицу и ставили в ламинар, где проводили операцию гистерэктомии. После соответствующей обработки, извлеченное стерильное потомство подсаживали к самкам-кормилицам, и клетку

микро-изолятор возвращали на свое место в изоляторной системе.

Таким образом, изоляторная система «RAIR Isosistemtm» используется нами для перевода конвенциональных племенных ядер мышей коллекционного фонда в СПФ-статус. В одной такой изоляторной системе можно содержать 16 линий мышей коллекционного фонда. Как было отмечено, данная система работает в комплексе с ламинаром. Смена клеток, раздача корма, воды и т.д. производится только в стерильных условиях. Установлено, что во избежание случайной контаминации, работу, по обслуживанию животных в микро-изоляторах в ламинарах, надежнее проводить двум сотрудникам. Обслуживающий персонал работает с микро-изоляторами в масках и стерильных перчатках. Успех в работе во многом зависит от подготовки специалистов и их добросовестности (рис. 3).



В нашей работе использовали новый английский гнотобиологический изолятор «ТСОЛ» для содержания самок-кормилиц СПФ-статуса. Вся работа осуществлялась согласно правилам работы с гнотобиологическими изоляторами. Были использованы ранее разработанные жесткие режимы стерилизации корма, воды, подстилочного материала и т.д.

Все необходимые стерильные материалы проводили в изолятор в специальных контейнерах (рис. 4).



Микробиологический контроль

Для микробиологического контроля гнотобиотов разработан комплекс методических приемов, направленных на выявление контаминации. Принципиальная схема такого контроля описана Вагнером (1959). Общепринятые методы контроля с использованием различных питательных сред и условий культивирования обеспечивают надежное выявление контаминации гнотобиотов и идентификацию выделенных микроорганизмов. Вместе с тем, существующие методы контроля обладают одним существенным недостатком, что позволяет судить о микробиологическом статусе животных лишь ретроспективно, т.е. по их состоянию 2-3 недели назад, так как именно этот срок требуется для окончательного суждения о контаминации системы. В ряде лабораторий производится и вирусологический контроль гнотобиотических животных, но из практических соображений этот вопрос на сегодняшний день, как правило, опускается из-за сложности такого контроля. В то же время считается, что от экзогенных вирусов гнотобиологическая изоляция представ-

ляет такой же надежный барьер, как и для других микроорганизмов. Основные трудности в отношении вирусной контаминации зависят от трансплацентарной передачи вирусов. Этот вопрос требует своего дальнейшего углубленного изучения и поисков путей селекции животных свободных от носительства вирусов, передающихся вертикально.

По результатам контроля животные в изоляторной системе поддерживаются в СПФ-статусе.

Результаты и их обсуждение

Впервые в НЦБМТ РАМН была отработана технология получения и выращивания гнотобиотических лабораторных животных, в т.ч. СПФ-статуса, в изоляторной системе. За сравнительно небольшой срок от патогенной микрофлоры были освобождены 6 линий мышей коллекционного фонда: WR, BRSUNT, C57BL/6, AKR, DBA/2, BALB/c (рис. 5), которые были помещены для дальнейшего разведения в изоляторную систему. Состояние животных хорошее.



Разработанная технология содержания лабораторных животных СПФ-статуса в изоляторной системе представляет в настоящее время большой инте-

рес как для питомников, так и для экспериментаторов. Подводя итог, можно заключить, что для организации работы с животными СПФ-статуса необходимо иметь специальное оборудование и хорошо обученный персонал. Совершенно ясно, что невозможно проводить исследования не только на нестандартных лабораторных животных, но и на гнотобиотических, в том числе животных СПФ-статуса, в неподготовленных условиях, так как при выведении животных в обычную среду их ценность сводится к нулю. Игнорирование микробного фактора в конечном итоге будет обходиться значительно дороже, чем затраты на организацию медико-биологических исследований на стандартных животных.

Таким образом, можно сказать, что новый методический подход в создании не только гнотобиотов, но и лабораторных животных СПФ-статуса существенно дополняет методический арсенал. Внедрение этого методического подхода будет способствовать решению многих актуальных проблем в современной медицине.

Список литературы

1. *Болотских Л.А., Подопригора Г.И.* Разработка и использование гнотобиологических методов в лабораторном животноводстве / В сб.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М. — 1987. — с. 23.
2. *Болотских Л.А.* Гнотобиологический подход при создании лабораторных животных СПФ категории.
3. *Болотских Л.А., Лушникова З.С.* Усовершенствованный способ получения гнотобиотических животных. Биомедицина. — 2005. — № 1. — с. 114-117.
4. *Подопригора Г.И.* Гнотобиология на пути двух столетий. Вестник АМН. — 1996. — № 14. — с. 239-251.
5. *Подопригора Г.И.* Правила работы с гнотобиологическими изоляторами.
6. *Подопригора Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А. и др.* Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс и морских свинок. Вестник АМН. — 1981. — № 12. — с. 54-58.
7. *Подопригора Г.И., Душкин В.А.* Способы стерилизации гранулированного корма для гнотобиотических животных. Биомедицина. — 2007. — № 6. — с. 164-166.

The isolator systems as a new methodical approach in medical and biological researches

L.A. Bolotskykh, H.H. Semenov, I.Uj. Egorova, T.V. Galakhova, T.B. Beskhova, N. V. Kasinskaya

Selection of a correct kind of a narcosis at carrying out of electroencephalographic, diagnostic and other Technology of receipt and growing of gnotobiotic laboratory animals including SPF-status animal is developed in the isolator system. The improved methodical ways can be successfully used in a laboratory stock-raising for cleaning of convention animals from a pathogenic microflora and conversion them in SPF-status. New methodical approach allows to provide standardization of animals by a microbiology factors for medical and biological researches.

Key words: isolator system, gnotobiotic approach, gnotobiotic animals, SPF-animals.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвящённые разработке и внедрению *новых биомедицинских технологий, биологическому, математическому и комплексному моделированию*. Принимаются рукописи, касающиеся доклинических и клинических испытаний лекарственных препаратов и медицинской техники; выполненных на классических и альтернативных биологических объектах. Особое внимание уделяется вопросам *генетической, микробиологической, экологической стандартизации лабораторных животных*. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых биологических объектов, моделирующих патологические состояния человека, продуцентов вакцин и сывороток клеточных культур, органов и тканей для ксенотрансплантации. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных.

Обязательные требования

Работы экспериментального характера должны быть выполнены в соответствии со стандартами GLP (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»), клинические исследования — GCP (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика»), а в случаях производства продукции — GMP (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств»).

Особое внимание уделяется соблюдению этических норм (предъявляется заключение биоэтической или этической комиссии организации, где выполнялась экспериментальная или клиническая работа).

Общие требования к оформлению

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

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, 4) учреждения, в которых была проведена работа, город или населённый пункт. На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов), данная информация предоставляется так же на английском языке. В конце статьи приводится список цитированной литературы и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи. Нумерация страниц — сверху по центру (на первой странице её номер не проставляется).

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другую рубрику или номер журнала. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование. За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается. После опубликования статьи авторы получают бесплатно 1 экземпляр журнала.

Более подробно правила публикации размещены на сайте www.scbmt.ru

Рукописи направлять по адресу:

143332, Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые Горы, НЦБМТ РАМН, редакция журнала «Биомедицина».

Электронный адрес НЦБМТ РАМН: scbmt@yandex.ru

Телефон редакции: 561-52-64