БИОМЕДИЦИНА

№ 2 2006

Научный журнал. Основан в 2005 году
Научным центром биомедицинских
технологий РАМН

Главный редактор

Н.Н. Каркищенко,
академик РАРАН, член-корреспондент РАМН

Редакционный совет:

Dr. Hans-W. Ackermann, профессор (*Канада*)
И.П. Ашмарин, академик РАМН (*Россия*)
Dr. Iorgen Backmen, профессор (*Германия*)
В.А. Быков, академик РАМН и РАСХН (*Россия*)
Витан Влахов, профессор (*Болгария*)
Dr. Ralf Edwards, профессор (*Швеция*)
В.Н. Гурин, академик НАН (*Беларусь*)
А.А. Кубатиев, академик РАМН (*Россия*)
Р. С. Кузденбаева, академик НАН (*Казахстан*)
В.Г. Кукес, академик РАМН (*Россия*)
В.К. Лепахин, член-корреспондент РАМН (*Россия*)
Michael Orme, профессор (*Великобритания*)
М.А. Пальцев, академик РАН и РАМН (*Россия*)
К.В. Судаков, академик РАМН (*Россия*)
В.Н. Ярыгин, академик РАМН (*Россия*)
Dr. Solemene Umberto, профессор (*Италия*)

Редакционно-издательская группа:

Е.В. Брайцева (научный редактор),
Б.М. Бороденков (технический редактор),
Е.В. Иванова, Г.Д. Капанадзе, Е.Л. Матвеенко,
Ю.С. Макляков, А.М. Малашенко, О.И. Степанова,
В.В. Хоронько, Е.Ф. Шмидт (ответственный секретарь)

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

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
res.c.bmt@mail.ru
Тел.: 561-52-64, 917-32-17

© 2006, Научный центр биомедицинских технологий РАМН

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Н.Н. Каркищенко. Становление и развитие биомедицины 5

В.Г. Кукес, Д.А. Сычев, Р.Е. Казаков, А.В. Семенов, И.В. Игнатьев, Г.В. Раменская, В.Н. Каркищенко. Значение полиморфизмов генов-транспортеров органических анионов для индивидуализации фармакотерапии 18

В.Г. Попов, В.Н. Каркищенко, С.Ю.Пчелинцев, Д.В. Попов, А.А .Старшов. Роль бактериофагов *B.Antracis* в противодействии биотерроризму 24

Н.Ю. Сахарова. Проблемы биотехнологии в свете сравнительно-эмбриологического анализа раннего развития млекопитающих 33

Г.Д. Капанадзе. Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах 40

А.В. Суров, Н.Ю. Феоктистова. Биология мохноногих хомячков и их использование в лабораторной практике 52

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

А.А. Бондарев, И.В. Смирнов, В.В. Удут. Уравнение состояния лекарственного вещества в организме 71

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ПРОТЕКЦИЯ

О.Ю. Соколов, Н.И. Волкова. Значение нефропротекции при выборе антигипертензивной терапии у пациентов с сахарным диабетом второго типа на основе изучения реактивности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы 75

О.Ю. Соколов, А.В. Харахашян. Оценка влияния антигипертензивных средств на показатели ауторегуляции мозгового кровотока как основа оптимального выбора препарата с позиции нейропротекции 89

Г.Н. Близнецова, М.И. Рецкий, Н.Д. Полякова-Семенова, И.М. Коренская. Роль процессов свободнорадикального окисления в механизме гепатопротекторного действия масла из семян амаранта 105

МУТАГЕНЕЗ

Н.А. Пирцхелани, А.Г. Пирцхелани, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Мамаладзе. Цитогенетический анализ антимутагенного действия а-токоферола и глюкозы при индукции мутации героином у лабораторных мышей 113

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Ю.С. Макляков, Е.В. Иванова, С.А. Овчар, А.Л.Батурин. Новые пиримидины — стимуляторы регенерации 117

Е.В. Ших, О.С. Конюхова, Л.М. Моргунова. Лечение гиповитаминозов: выбор оптимальной нагрузочной дозы рибофлавина путем сопоставления фармакокинетических параметров, характеризующих всасывание и выведение 121

Д.В. Байдак, Н.В. Терещук, Д.Н. Цветков. Снижение «изомерического балласта» и безопасность лекарств 126

Х.Х. Семенов. Создание оппозитных линий крыс по чувствительности к острой гипобарической гипоксии 129

Э.Х. Абдрашитова. Морфологическая характеристика спонтанной хронической респираторной болезни крыс 133

ПРАКТИКУМ

О.И. Степанова. Метод взятия крови у мышей из малой подкожной вены голени 137

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Е.В. Брайцева. Фундаментальные основы GLP (Часть 1. Основные положения качественной лабораторной практики) 140

НАШ БЕСТИАРИЙ

Биологи и медики шутят 143

CONTENTS

REVIEWS

N.N. Karkischenko. Foundation and development of biomedicine 5

V.G. Kukes, D.A. Sychev, R.E. Kazakov, A.V. Semenov, I.V. Ignatiev, G.V. Ramenskaya, V.N. Karkischenko. The role of organic anion transporters in individual pharmacotherapy 18

V.G. Popov, V.N. Karkischenko, S.Yu. Pchelintsev, D.V. Popov, A.A. Starshov. The role of bacteriophages *B. antracis* in the counteraction of bioterrorism 24

N.Yu. Sakharova. The problems of biotechnology in the content of comparative embryology analysis of early mammalian development 33

G.J. Kapanadze. Using of minipigs in experiments 40

A.V. Surov, N.Yu. Feoktistova. Biology of dwarf hamsters and using them in laboratory studies 52

MATHEMATICAL MODELING

A.A. Bondarev, I.V. Smirnov, V.V. Udut. The equation of drug state in organism 71

DRUG PROTECTION

O.Yu. Sokolov, N.I. Volkova. Selection of antihypertensive therapy in patients with type 2 diabetes mellitus on the basis of studuing RAAS reactivity 75

O.Yu. Sokolov, N.I. Volkova. The evaluation of antihypertensive drug effects on indexes of cerebral bloodstream autoregulation and optimal combination of drugs in the context of neuroprotection 89

G.N. Bliznetsova, M.I. Retskiy, N.D. Polyakova-Semenova, I.M. Korenskaya. The role of free radical oxidation processes in mechanisms of amaranth oil hepatoprotective action 105

MUTAGENESIS

N.A. Pirtskhelani, A.G. Pirtskhelani, G.J. Kapanadze, N.V. Mamaladze. Cytogenetic analysis of antimutagenic action of α-tocopherol and glucose when inducting mutations in laboratory mice by heroin 113

BRIEF REPORTS

Yu.S. Makljakov, E.I. Ivanova, S.A. Ovchar, A.L. Baturin. New pyrimidines – stimulators of regeneration 117
E.V. Schikh, O.S. Konyukhova, L.M. Morgunova. Treatment of hypovitaminosis: Selection of optimum sating dose of riboflavinum by comparison of pharmacokinetic parameters defining absorption and excretion 121
D.V. Baidak, H.V. Tereschuk, D.N. Tsvetkov, G.N. Gildeeva. Reduction of «isomeric ballast» and improvement of drug safety 126
H.H. Semenov. Development of opposite rat strains with different hypobaric hypoxia sensitivity 129
E.Kh. Abdrashitova. Morphological characteristic of chronic respiratory disease in rats 133

PRACTICE

O.I. Stepanova. Method of blood sampling from mouse's saphenous vein 137

NORMATIVE DOCUMENTS

E.V. Braitseva. The fundamental points of GLP 140

OUR BESTIARY

Humor 143

ОБЗОРЫ

Становление и развитие биомедицины

Н.Н. Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Рассмотрены исторические аспекты развития и становления взглядов на биомедицину как интегрального направления, объединяющего биологические, медицинские, физико-химические науки и обеспечивающего формирования основ клинической медицины.

Ключевые слова: биомедицина, исторические предпосылки, неспецифическая резистентность, перспективы.

Медицина, как комплекс фундаментальных и прикладных аспектов знаний в практической деятельности врача, составляет совокупность мероприятий по укреплению и сохранению здоровья, предупреждению и лечению болезней и продлению жизни людей. Она охватывает все стороны жизни человека в виде системы научных знаний о его здоровье и болезнях, условиях индивидуальной и общественной жизни, в которой биологическое и социальное составляют интеракцию единства и противоречий.

Если история практической медицины – это история человечества, то история биологической составляющей медицины, т.е. биомедицины – это эволюционная история биологических основ жизни в приложении к человеку.

Болезни, недомогания и иные связанные с ними проявления являются таинственными и непонятными для непосвященного человека (думается, что и для любого животного) состояниями, за которыми прячется неумолимый враг – смерть. У животных имеются врожденные механизмы зализывания ран, поиска и использования различных лекарственных растений при отравлении, травме, болезни, причем даже у хищников.

Шеренга Великих: начало биомедицины

Практикующий врач всегда был зеркалом той социальной среды, в которой жил. Лишь жрецы могли вынести «окончательный диагноз», стал ли человек «чистым» после перенесенной болезни и когда его можно допустить к нормальной общественной жизни. Поскольку в египетских папирусах, библии, талмуде, китайских и священных индийских писаниях давались канонические описания болезней, лекарств и процедур лечения, то отступление от них являлось святотатством.

Древние выдающиеся врачи не только переходили в ранг жрецов, но и обожествлялись. Так, в «Астрологии» Гесиода [8] в VI в. до. н. э. описывается противостояние Зевса и Асклепия как конфликт между фантазией и знанием. У Гомера [10] Асклепий еще не бог медицины, а фессалийский князь, но позднее Асклепий обожествляется. Это можно рассматривать как возрастание авторитета науки и попытки низвержения супернатурализма. Мы видим, что противоборство между наукой и мифологией как бы переносится на небо. Асклепий (лат. Эскулап) объявляется сыном Апполона и учеником мудрого Хирона. Бессмертный стрелец-кентавр, полу-

конь-получеловек, сын Кроноса (отца Зевса) и нимфы Филиры, дочери Океана – Хирон творил лишь добрые дела, к числу которых древнегреческая мифология относит обучение Асклепия искусству врачевания. Асклепий внешне похож на Зевса, но в некоторых случаях мудрее и сильнее его: не пасует перед Мойрой, судьбой, сотканной человеку при его рождении суровыми сестрами Лисой и Клото, а также может воскрешать мертвых (чем не предтеча реаниматологии). Уже в эгейской предфилософии виден процесс выделения реальной биологической науки из супранатурализма. Так, в мифе о двух сыновьях Асклепия говорится, что от первого сына Подалирия (Гиппократ считал себя его потомком), пошли настоящие врачи, а от второго – Махаона – жрецы, практиковавшие в храмах Эллады (посвященных, кстати, Асклепию) донаучные методы, но наделенные правом изрекать абсолютные «истины». Античные врачи и тогдашние философы люто враждовали, но при этом врачи стояли на более прочной основе натурфилософии и пробиомедицины [7, 21, 23].

Врачебная наука и искусство врачевания развивались, по-видимому, задолго до вавилонского кодекса царя Хаммурапи (XVIII век до н.э.). В папирусе Эберса (XVI–XVII вв. до н. э.) приведена «Книга о приготовлении лекарств для всех точек тела», в которой указано около 800 приемов лечения. Биомедицинские взгляды Древней Индии наиболее полно представлены в дошедшем до нас обобщенном труде Сушрута «Аюр-Веда» или буквально «Знание жизни», создававшемся на протяжении IX–III веков до н. э. Сушрута критически относился к деятельности храмовой медицины, указывая, что жрецы, основываются на сновидениях и гаданиях, а не на знании истинных причин болезни, т.е. лекарства, приготовляемые жрецами, и их приемы лечения не действенны.

Более строгие основы биологической медицины заложены Гиппократом (460–377 до н. э.). Все его предки, по преданию, были врачами, и в 440 г. до н.э. он, будучи хорошим практикующим врачом, был посвящен в жрецы. Вместе с тем Гиппократ был успешным теоретиком медицины, занимался анатомией, ставил эксперименты. Именно от Гиппократа идет понимание того, что для жизнедеятельности организма человека или животных необходимо врожденное *тепло тела, воздух,* поступающий снаружи и *соки,* получаемые с пищей. Гиппократ назвал *Природой* ту мощную жизненную силу, которая управляет этими процессами, т.е. именно он впервые дал естественно-биологическое определение процессам, ранее приписываемым божественному провидению [9].

Наряду с Гиппократом к когорте Великих медиков можно отнести китайского врача V века до н. э. Пян Чиао (Чжин Юженя), римского врача Галена (130–200), оставивших огромное научное наследие, в том числе по биомедицинским основам акупунктуры, обезболивания, топографической анатомии, физиологии, фармакологии и фармацевтики. Выдающийся врач мусульманского мира Рази Абу-Бекр Мухаммед бен-Закирия (850–923), создавший фундаментальный труд по теории медицины «Рай знаний», был не только прекрасным клиницистом, но и одним из основоположников пробиомедицины. Его учебники и большая энциклопедия «Liber continentis», как и «Canon medicinea» Абу Али Ибн-Сины (980–1037), переведенные на латинский язык, на столетия составили основы теоретической, биологической и клинической медицины врачей Востока и Запада.

Медицина развивалась благодаря усилиям ученых и мыслителей, многие из которых не были врачами. Аристотель (384 – 322 гг. до н. э.) не являлся врачом и не лечил больных, но дал анатомичес-

кое описание животных и с разрешения своего ученика Александра Македонского производил секцию трупов. Аристотель обозначил четыре общности человека и животных: способность к *движению, размножению,* необходимость *питаться, чувствительность* к внешним факторам и умение *мыслить*. Но в отличие от животных человек, по мнению Аристотеля [2], обладает *мыслящей душой,* т.е. и рассудком и разумом.

Выдающимся ученым был епископ Исидор (570–636) из Севильи, написавший 20 томов, посвященных человеческому телу, здоровью и болезням. Величайшим гением эпохи Возрождения является, несомненно, Леонардо да Винчи (1452–1519). Он не только художник, математик, инженер, но и биолог, и анатом, совершивший в жизненно опасные для таких работ годы инквизиторских репрессий множество секций животных и человеческих трупов и давший более 800 анатомических эскизов с подробными объяснениями, а также заложивший основы эргономики.

В период Средневековья основы биомедицины закладывались Арнольдом де Вилланова (1235–1311), Джироламо Фракаторо (1478–1553), Мигелем Серветом (1511–1553), Андреем Везалием (1514–1564), Амбруазом Паре (1516–1590), Ли Ши Чженем (1518–1592), Уильямом Гарвеем (1578–1657) и др. Их трудами показана морфологическая близость и единство биологических процессов различных органов человека и животных. Марчелло Мальпиги (1628–1694) и Альбрехт фон Галлер (1708–1777), не подозревая о биохимических основах кровообращения, дыхания и пищеварения, с исключительной прозорливостью дали их сравнительные описания у человека и животных, а также общебиологические понятия возбудимости, чувствительности и автоматизма. Антони ван Ливенгук (1632–1723), создавший первые микроскопы, и профессор-натуралист из солнечной Калабрии Ладзаро Спалланцани (1729–1799) первыми из людей взглянули на «анимакулы» мира микроорганизмов. Спалланцани доказал их размножение путем деления.

С работ по систематике флоры и фауны, завершившихся созданием в 1735 г. «Системы природы» К. Линнея, началась разработка идеи исторического развития органического мира. Началась критика теорий самозарождения и неизменности видов, появились первые работы по сравнительной анатомии и биомедицине. В XVIII веке Ж. Бюффон предложил понятие «естественная история» и выдвинул идеи о единстве организации живых существ, о существовании «непрерывной иерархии от самого низшего растения до самого высокоорганизованного животного», изменяемости форм под влиянием внешних условий. Немецкий химик Юстус Либих (1802–1873) описал процессы обмена веществ в организме, доказал роль азотного обмена в основе белков, строительного материала всего живого. С этого периода закладываются основы наших взглядов на иерархию биосистем.

Работы Клода Бернара, Шарля Эдуарда Броун-Секара (1817–1894), Рудольфа Вирхова (1821–1902), И.М. Сеченова (1829–1905), Эмиля Дюбуа–Реймона (1818–1896), Нильса Финсена (1860–1904), И.П. Павлова (1849–1936) заложили основы современной биологической медицины. Хотя не все из них были врачами, их имена на устах уже у каждого первокурсника мединститута. К ним следует также причислить биологов Д.И. Ивановского (1864–1920), Мартина Бейеринка (1851–1931), химика Уэнделла Стенли, открывших новый мир вирусов и описавших границу между живой и мертвой материей.

Многие врачи, достигшие величия и вошедшие в историю не на медицинском поприще, тем не менее, внесли свой вклад в биомедицину. Польский астроном и врач

Николай Коперник (1473–1543) создал ряд приемов лечения параличей, инфекционных болезней, а упомянутый нами шведский врач Карл Линней (1707–1778) разработал лучшую систематику растений и животных, в том числе разделив лекарственные растения на 10 групп по их воздействию на человеческий организм. Врач Луиджи Гальвани (1737–1798), автор эпохальных открытий в области электричества, выявил электрические явления в живых тканях организма. Йенс Якоб Берцелиус (1770–1848), величайший химик, установивший атомные веса всех известных в то время элементов, внесший понятия изомерии, катализа, аллометрии, предложивший буквенную символику химических элементов и формулы реакций, был медиком и даже некоторое время занимался врачебной практикой. Со времен Я.Берцелиуса зависимость биологической активности, связанная с оптической изомерией [(d – (+)1 – (-) формы] и цис-транс-измерений веществ, подвергнута детальному анализу в сотнях обзоров и монографий. Прогресс в стереоселективном синтезе ксенобиотиков путем компьютерного моделирования стереоструктуры макромолекулы рецептора стал важным элементом «drug-design». Он строится на параметрах молекулы агента-агониста и данных о стереоструктуре активного центра рецептора. Это одна из ветвей эволюции взглядов Я. Берцелиуса.

Врачами были и многие писатели, публицисты, политики. Врач Франсуа Рабле (1493–1553) беспощадно высмеял в «Гаргантюа и Пантагрюэле» схоласцизм и предрассудки тогдашней медицины. Фридрих Шиллер (1759–1805) — автор не только бессмертных «Разбойников», но и «Философии физиологии». В произведениях А.П. Чехова (1860–1904), В.В. Вересаева (1867–1945), Артура Конан Дойля (1859–1930), Акселя Мунте (1857–1949), Арчибальда Кронина (1896–1979), врачей по образованию, не только прекрасно описана жизнь их коллег в соответствующей социальной среде, но и даны превосходные портреты биологических основ тех или иных поступков. Выдающийся политик, публицист и руководитель французской революции 1789 года Жан Поль Марат (1743–1793) пытался создать эффективное лекарство против чахотки (надеюсь, это была не гильотина). А доктор Геббельс так воплотил свои врачебные знания в социо-антропологии XX века, что потрясенное человечество усвоило его «концепции» на многие десятилетия. Однако абсолютному большинству врачей-естествоиспытателей присущ исторический гуманизм.

Устремление ввысь

Бурное развитие биологической медицины и стремительная дифференциация смежных наук в XX веке возникли не сами по себе. Устремление ввысь предопределено отнюдь не робкими деяниями Великих медиков прошлого. Даже если взять в качестве реперных точек построения биологических основ медицины труды Парацельса, то мы увидим, что они основаны на использовании одних и неприятии других взглядов его предшественников. Эволюция науки сродни эволюции жизни. Как бритва Окама, она отсекает все не сущее. В то же время в трактовке результатов, полученных с помощью суперсовременных компьютеризированных приборов, проглядываются представления великих предшественников науки сегодняшних дней, которых мы с уважением называем шеренгой Великих медиков [21].

В период позднего средневековья обозначилась связь медицины и химии, зародилось ятрохимическое направление, сыгравшее значительную роль в развитии медицины XVII–XVIII веков, которая получила такие лекарственные средства, как опий, кору хинного дерева, камфару и др. Критический дух проникает во все отрасли

естествознания и биомедицины. «Медицина здоровых ввергает в болезнь, а больных в смерть», – клеймил врачей-схоластов в XIII веке итальянский поэт Ф.Петрарка.

Величайшим реформатором медицины и одним из столпов биомедицины является швейцарский врач и алхимик Филипп Ауреол Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм (1493–1541). Талантливый сын высокообразованного врача и алхимика, он с юных лет под псевдонимом Парацельс (буквально *«устремленный ввысь»*) много путешествовал по Европе, жил в Константинополе, посетил Россию, побывал в татарском плену. Став профессором медицины Базельского университета, он публично сжег «Канон» Ибн-Сины, отверг Галена и стал учить студентов не на латыни, а на родном языке у постели больного. Многие считали Парацельса гениальным врачом и тому были основания. Но у гениев много завистников. Спасаясь от травли, он бежал из Базеля, терпя лишения, много путешествовал и умер в Зальцбурге. Лишь через 21 год после смерти вышла его первая работа о болезнях и их причинах. А через три года издаются основные учения Парацельса об *общих принципах медицины*.

Значимость работ и представлений Парацельса заключается в том, что он впервые представил интегративную картину существовавшего в его период уровня научной теории и практики, биологических основ медицины, химии и практической медицины, тем самым предопределил развитие биомедицины. Его революционные взгляды дали несомненный толчок в использовании достижений различных отраслей науки в интересах клинической медицины.

Он с молодости вступил в борьбу против могущественной касты аптекарей, оставляющих неоправданно сложные и очень дорогие лекарства (чем не сегодняшняя ситуация), сам применял простые и высокоэффективные средства. Он старался добыть из всех лечебных средств действующие начала, называя их квинтэссенцией «*quinta essentia*». Парацельс первый в истории медицины стал применять химические вещества, в том числе препараты и соли железа, сурьмы, свинца, меди. Он признанный основоположник ятрохимии – направления, ознаменовавшего привлечение химии к решению медицинских проблем. Его попытки создания гомункулюса (человека в колбе), попытки консервирования спермы можно рассматривать как гениальный взгляд в далекое будущее клонирования, генетики и клеточных технологий. Можно считать, что именно с него стали закладываться научно-экспериментальные основы биомедицины. Парацельсу принадлежат слова, сказанные им в век господства алхимии о том, что «цель химии состоит не в изготовлении золота и серебра, а в изготовлении лекарств».

Именно взглядам и деяниям Парацельса мы обязаны тому, что сначала робкие ручейки знаний, а потом их мощные потоки соединили эмпирическую медицину с фундаментальными биомедицинскими науками и предопределили формирование биомедицины как интегрального научного направления.

Биомедицина теснейшим образом связана с фундаментальной биологией, которая устанавливает общие и частные закономерности, присущие жизни во всех её проявлениях и свойствах (обмен веществ, размножение, наследственность, изменчивость, приспособляемость, рост, подвижность и др.). Несомненна связь биомедицины с б*иологией развития***,** изучающей механизмы и движущие силы индивидуального развития организмов. Это направление сформировалось к середине XX века на основе *эмбриологии*, *цитологии, генетики, физиологии и молекулярной биологии*. Одним из важнейших достижений в этом плане можно считать создание теории рецепторных взаимоотношений. Вещества с жесткой структурой обладают большой избирательностью по принципу комплементарности к определенному типу рецепторов [34, 35, 36, 41]. Взаимодействия по типу «ключ–замок» и «перчатка–рука»

обеспечивают определенный потенциал конформационной подстройки «замка» и «перчатки». Энергия внутренней подвижности молекулы-агониста достаточно велика. Явление торможения вращения вокруг –C-C-,-C-N- или –C-O- связей может поставлять поворотные изомеры, разделенные потенциальным барьером величиной порядка 2000–5000 кал/моль. Измененные конформации или повторные конформеры – это соединения с пространственной деформацией циклических элементов структуры и измененной топографией их «электронного облака» или энергетического поля. Во многих случаях БАВ в виде «ключа» или «руки» упаковываются в кристаллах, создавая конформационный полиморфизм. Энергия разных конформеров может разниться на 20–50 кДж/моль.

Бионеорганическая и биоорганическая химия сформировались в середине XX в. на стыке биохимии, органической и неорганической химии и обогатили биомедицину новыми биополимерами, витаминами, гормонами, пептидными и белковыми биорегуляторами, антибиотиками и другими высокоэффективными лекарственными средствами. Работами нобелевских лауреатов 2001 г. Вильяма С.Новлеса, Риохи Нойори и Барри Шарплесса в области каталитического асимметрического синтеза создан колоссальный прорыв по разработке, созданию и внедрению в медицину эутомеров-лекарств и новых БАВ.

Биомеханика и *бионика* важны для биомедицины. Они изучают механические свойства живых тканей, органов и организма в целом, а также особенности строения и жизнедеятельности организмов для создания новых приборов, механизмов, вычислительной техники, конструирования систем искусственного интеллекта и *биотехнических систем*. На стыке современной физики, химии и корпускулярной механики возникли *нанотехнологии*, а в дальнейшем и бионанотехнологии, которые изменили наши взгляды в вопросах понимания биодоступности веществ и лекарств. Стало понятно, что наночастицы быстро захватываются фагоцитирующими клетками и кумулируются в легких, печени, селезенке, лимфоузлах и других органах с высоким содержанием макрофагальных элементов [24, 26, 31, 32, 40]. При этом инфицированные макрофаги более интенсивно захватывают наночастицы, чем интактные [37]. Это объясняет высокую эффективность наночастиц с химиотерапевтическими средствами при лечении внутриклеточных инфекций.

Возникло понимание того, что транспортными системами направленной доставки лекарств в очаг или к органам мишеням являются макромолекулярные водорастворимые полимеры (полиэтилгликоли, декстран, поли-L-лизины, полиалкилцианоакрилаты и др.), наночастицы, липосомы с включением ферромагнетиков или компонентов, чувствительных к ультразвуку, сдвигам температуры, pH и другим факторам, вызывающим их деструкцию; транспортные системы биологического происхождения: органоспецифические аутоантитела, ассоциированные с лечебным препаратом; эритроциты, нейтрофилы, фибробласты, коньюгаты с белками (α-фетопротеины и другие протеины); комплексные соединения («пролекарства»), активируемые при воздействии сдвигов pH, активности ферментов и других факторов, обнаруживаемых в тканях при очаговой патологии [7, 27, 28, 29, 30, 35, 42].

Важным для биомедицины направлением является *биометрия*, основные задачи которой заключаются в планировании медико-биологических экспериментов и обработке результатов методами математической статистики. Основы биометрии заложены в конце XIX в. работами английских ученых Ф. Гальтона и К. Пирсона. Связь математики с естествознанием приобретает все более сложные формы. Это не случайно, поскольку ещё у древних греков *mathema* означало познание,

науку. Чарльз Дарвин писал: «У людей, усвоивших великие принципы математики, одним органом чувств больше, чем у простых смертных». Не случайно говорят, что степень научности той или иной дисциплины измеряется тем, насколько в ней применяется математика. Математические основы биомедицины формировались на основе достижений фундаментальной математики от Фолеса (640–548 гг. до н.э.) и Пифагора (570–471 гг. до н. э.) до наших современников Д.Гильберта, Н. Бурбаки и А.Н.Колмогорова [5, 6, 16]. Напомним, что первую революцию в математике произвела *позиционная* запись числа:

$$\alpha_n \ldots \alpha_1,\ \alpha_0 = \alpha_0 \times 10^n + \ldots \alpha_1 \times 10 = \alpha_0.$$

Эта строчка, состоящая из простых символов, вызвала переворот в математических процедурах. Действительно, что было бы с фундаментальной и прикладной математикой при записи чисел римским способом? [5].

Многие медики если и не испытывают страх, то не могут преодолеть психологический барьер, столкнувшись с абстрактными или математическими описаниями биологических процессов. Это свойство присуще не только гуманитариям. Величайший математик Георг Кантор (1845–1918), разработавший основы теории множеств и открывший, что отрезок и квадрат имеют одинаковое количество точек, писал: «Я это вижу, но не верю». Лишь через три года он смог преодолеть этот психологический барьер [5]. Мы почему-то не задумываемся над тем, что на градуснике нанесены положительные и отрицательные значения температур, а годы и столетия до рождества Христова мы считаем в обратном порядке. В то же время каждый из нас понимает, что отсчет температуры идет от абсолютного нуля в одну сторону и время не течет вспять. Мы это приняли как должное и к этому привыкли. Так и в математике медикам и биологам что-то нужно принять как парадигмы, постулаты, аксиомы и не впадать в транс при виде формулы в медицинской статье.

Изучением входящих в состав организмов химических веществ, их структуры, распределения, превращения и функции занимается *биохимия*. Парацельса можно было бы считать и предтечей биохимии, которая в XIX в. сформировалась в самостоятельную науку. Первый синтез Ф. Вёллером в 1828 г. мочевины подорвал представления о «жизненной силе», якобы участвующей в синтезе различных веществ организмом. С середины XX в. из биохимии выделились в самостоятельные направления *молекулярная биология, биоэнергетика* и *техническая и медицинская биохимия,* которые теперь, наряду с *биофизикой*, включают в комплекс наук *физико-химической биологии и биомедицины*. Достижения этих наук немыслимо охватить одним взглядом, но выделить одно из направлений, мы считаем своим долгом, поскольку здесь просматриваются и границы сред и единение фундаментальной науки и клинической медицины. Известно, что существуют два основных направления применения эндогенных биорегуляторов и метаболитов в клинической практике. Это, конечно, заместительная терапия, т.е. введение биосубстрата при его дефиците, и регуляция в виде стимуляции или торможения метаболизма при нарушении обмена в условиях патологии.

В мировой науке довольно интенсивно развивается ортомолекулярная медицина, базирующаяся на использовании лечебных свойств субстратов и эндогенных регуляторов метаболизма или «аутакоидов». К ортомолекулярным соединениям следует отнести и ряд специфических эндогенных регуляторов, таких, как оксид азота, эндотелийпродуцируемая вазодилататорная субстанция, модуляторы кальмодулина, кальцитонингенсвязанный пептид, вазоактивный интестинальный полипептид и др., а также средства генной терапии. Это, несомненно, будущее биомедицины.

Идея современной ортомолекулярной медицины, наиболее полно и выразительно сформулирована в ряде работ дважды лауреата Нобелевской премии Лайнуса Полинга. Кондукторные функции метаболитов энергетического обмена, обладающих высоким уровнем утилизации в определенных тканях, могут использоваться для избирательной доставки к органам-мишеням компонентов лекарств, а также для повышения их биобезопасности.

В последние годы благодаря энергии и усилиям академика М.А. Пальцева интенсивно развивается *молекулярная медицина*, которая интегрирует в себе фундаментальность подходов с прикладными аспектами биобезопасности. В свою очередь проблема биобезопасности весьма многогранна. Не касаясь всех её сторон, укажем лишь на вопросы безопасности лекарств и подчеркнём, что, по данным ВОЗ, смертность от лекарств занимает в общей структуре смертности четвертое место – после сердечно-сосудистой, онкологической патологии и травм. В США неправильное употребление лекарств ежегодно приводит к смерти более 100 тыс. человек и к развитию у 2,2 млн. пациентов тяжелых заболеваний. В России этой статистики нет, но нетрудно представить, что столь же внушительные показатели «лекарственной болезни» и у нас. Расходы на борьбу с лекарственными осложнениями составляют от 5 до 17% затрат на здравоохранение в разных странах [3].

Еще одно направление – *биотехнология* – включает в себя совокупность генно-инженерных методов, живых организмов и биологических процессов. В связи с успехами молекулярной биологии и биомедицины все более уверенно выдвигается на первый план направление, связанное с биотехнологическим синтезом метаболитов и эндогенных биорегуляторов обменных процессов. Биотехнологическая революция в конце XX века открыла новую эру в развитии биомедицины[25]. Генотерапевтический и генопрофилактический аспекты биомедицины связаны с достижениями современной гибридомной технологии и генной инженерии. В генной терапии лидируют исследования в области клинической фармакологии, эндокринологии, кардиологии и онкологии. Достигнуты успехи в познании механизмов запуска и торможения превращений нормальной клетки в раковую за счет влияния на активность теломеразы опухолевой клетки и других «мишеней» онкогенеза.

С развитием в последние десятилетия стереомолекулярной биологии объектом исследователей стал анализ возможностей повышения терапевтической эффективности известных лекарств за счет избирательного использования оптически активных эутомеров, а также их предпочтительных конформеров. Избавление больных от «изомерического балласта» рацемических веществ на основе модификации конформационной структуры – путь к излечению от «лекарственной болезни», а в конечном итоге — к улучшению здоровья и сохранению жизни.

Декартовы векторы биомедицины

Главным принципом познания с эпохи Парацельса все чаще становился опытно-экспериментальный метод исследования. Многие исследователи отвергали схоластику и выдвигали программы обновления наук. Английский философ Ф. Бэкон (1561–1626) считал, что в прежней медицине «мы встречаем много повторений, но мало истинно новых открытий». Такие открытия, касающиеся природы самого человека, как считали многие естествоиспытатели, могут быть получены только экспериментально, т.е. в рамках биомедицины.

В ряду великих творцов науки всех времен острыми пиками выделяются истинные гении. Даже в их числе особый историко-научный пик приходится на Рене

Декарта (1596–1650), личности и трудам которого посвящены тысячи работ. Многие ученые подчеркивают, что без Декарта современный мир науки был бы невозможен. В своих «Правилах для руководства ума» [13] он дал начало новой науке и ее аппарату в виде *всеобщей или универсальной математики*, ввел переменные величины в аналитическую геометрию [12]. Он создал и научил человечество пользоваться системой величин в «декартовых координатах», сформулировал принципы моделирования и определил три основных средства познания: *интуицию* (качественную логическую «единицу»), *дедукцию* (процесс движения и последовательности), *полную энумерацию* (количественное завершение обретенного знания) или *индукцию* (гарант *истинности* в непрерывном воспроизведении процесса). Его представления явились предтечей базовых аспектов биомоделирования.

Особое место в его трудах занимают теоретические аспекты биологической медицины. «Вся философия подобна как бы дереву, корни которого – метафизика, ствол – физика, а ветви.... все прочие науки, сводящиеся к трём главным: *медицине*, механике и этике» [12]. Преклоняясь перед Гарвеем, Декарт пытался понять суть автоматизма сердца, собственноручно производя исследования на животных. В свою очередь нобелевский лауреат В. Эйнтховен (1924), в знак преклонения перед идеями Декарта, ввел в символику ЭКГ декартовы обозначения величин ряда P, QRS, T, U и т.д.

Цель познания, по Декарту, – установление взаимосвязи явлений, поскольку «естественный порядок» представляет собой бесконечную цепь причинных связей. *Разум* – основа познания и поведения, источник знания и критерий его истинности. *Организм* – часть телесной природной субстанции, элементы которой взаимодействуют друг с другом под влиянием внешних воздействий. *Жизнь* – процесс, представляющий собой единство постоянных непосредственных реакций тела на эти воздействия. Декарт ввел понятие о рефлексивности и разработал схему рефлекса, полагая, что все процессы жизнедеятельности (кроме мышления) имеют чисто рефлекторную природу. Декарт считал, что тело человека является *автоматом*, его движущей силой является *теплота*, источником которой служат происходящие в теле процессы «сгорания без пламени». Его трактовки процессов кровообращения и пищеварения, теорий боли, голода, жажды, в которых он отличал соматические проявления от сопровождающих их ощущений, оптическая теория зрения и физиологическая теория памяти во многом предвосхитили и направили все последующие исследования в биомедицине, вплоть до наших дней. Работы Декарта оказали основополагающее воздействие на развитие философии и естественных наук в XVII–XVIII вв. и не теряют актуальности для современной науки. Его идеи оформили процессы *моделирования* в биологических системах не только в виде системы методов, но, что самое главное, в методологическом аспекте.

Представления Декарта получили развитие во многих направлениях научных знаний. Остановимся лишь на одном из них. Идеи Декарта о рефлекторной природе процессов жизнедеятельности были фундаментально подтверждены И.М. Сеченовым и обоснованы расшифровкой рефлекторной дуги И.П.Павловым [18] Сложные процессы управления в организме на основе алгоритмической и критериальной обратной связи расшифрованы академиком П.К. Анохиным [1] и представлены в виде концепции *функциональных систем*. Важным положением этой концепции является представление об афферентном синтезе. Прежние взгляды основывались на простой регуляторной цепи условных рефлексов: сигнал → ответ. П.К. Анохин убедительно показал, что любому поступку человека или животно-

го предшествует совокупная взаимооценка условий данного момента, основанная на прошлом опыте [1].

В свете современных представлений концепция П.К.Анохина вскрывает два прежде мало рассматривавшихся направления исследования функций головного мозга как интегративного центра: устойчивости нелинейных регулируемых систем в целом и стабильности вероятностно-детерминированных подсистем целостного организма человека и животных при неограниченных возмущающих воздействиях. Ученик и последователь П.К. Анохина, К.В. Судаков доказал [20], что объединение корково-подкорковых аппаратов в доминирующее возбуждение связано с определенной функциональной системой и направлено на обеспечение результата ее деятельности. Принципы *обратной афферентации* и *акцептора действия*, введенные П.К. Анохиным, придали изящную завершенность рефлекторной дуге, разработанной И.П. Павловым, и гениальному предвидению Р. Декарта.

Неспецифическая резистентность – барьер здоровья и нездоровья

В концепции валеологии или науки о здоровье заслуживает внимания рассмотрение некоторых сторон её специфики. Поддержание здоровья человека в современном сложном мире, является одновременно биомедицинской и социальной проблемой, которая должна быть приоритетной в любом цивилизованном обществе. Становление валеологии в нашей стране базируется на концепции школы И.П.Павлова [18] об адаптационно-трофической функции центральной нервной системы и последующих исследованиях Н.В. Лазарева о коррекции приспособительных реакций организма с помощью адаптогенов. В дальнейшем эти исследования оформились в виде научного направления о неспецифической сопротивляемости [17] или неспецифической резистентности организма [11, 14, 15].

Изучение эффектов феноменов и механизмов биологической составляющей здоровья и нездоровья и являет основу биологической медицины или *биомедицины*.

Исследования в области изучения *неспецифической резистентности* развиваются в направлении поддержания цитогомеостаза и тонуса функциональных систем, ответственных за регуляцию адаптационных процессов и обеспечивающих оптимальный уровень функционирования организма в конкретных условиях. Они включают торможение перекисного окисления липидов, повышение пула эндогенных антиоксидантов; активацию регенераторных процессов; активацию энергетического обмена; повышение фагоцитоза и других иммунных реакций; мобилизацию защитных систем и влияние на стресс-лимитирующие процессы; вовлечение протекторных механизмов пиримидинового, пуринового обмена, нейромедиаторов и их мессенджеров, регуляторных белков и пептидов [4, 7, 14, 15, 17].

Представляется логичным разделение основных состояний организма человека на здоровье (*первый статус*), патологию (*второй статус*) и *третий статус*, как состояние, характеризующее функциональные системы в период экстремальных ситуаций, связанных с высокими физическими и психическими нагрузками, а также воздействием на организм стресса и экологических факторов. К основным экологическим факторам относятся климатические особенности, космическое и электромагнитное излучения, баровоздействие, профессиональные вредности и др. [14, 33, 38, 39]. *Третий статус* некоторыми авторами расценивается как «предболезнь», но этот термин следует рассматривать скорее как сленг, антонимом которому должно было бы соответствовать столь же невразумительное понятие «предздоровья».

Биологические проявления от воздействия внешней среды и от социальных потрясений отражаются состояниями организма. Неблагоприятные действия либо нейтрализуются системами биологической защиты, либо протектируются. В любом случае социальные и экологические потрясения создают условия при имеющейся предрасположенности к болезни и развитию функциональной и структурной неполноценности в деятельности целостного организма.

В прикладном аспекте воздействия на неспецифическую резистентность представляют собой комплекс мероприятий (вакцинация, лекарственная профилактики, использование адаптогенов, стресспротекторов) в отношении здорового человека с целью предупреждения развития у него патологических процессов. Иными словами – это создание барьера между состояниями здоровья и нездоровья. Фундаментальные основы такого барьера обеспечиваются исследованиями в биомедицине, и прежде всего в направлении повышения неспецифической резистентности.

Неспецифическая реактивность организма является отражением общебиологической вариабельности и изменчивости [11]. Индивидуальная резистентность отчетливо проявляется в реакциях организма при воздействии факторов различной природы и отображается, а по-видимому, и закрепляется генетическими процессами. Согласно неодарвинистской концепции, мутации, происходящие в соматических клетках, не наследуются и не оказывают влияния на эволюцию. Известные австралийские ученые [19], анализируя работу иммунной системы, показали возможность переноса ДНК из соматических клеток в половые. Конечно, это дискуссионный вопрос, но в свете исторических реминисценций открывает поле для размышлений. Поистине – рывок вперед смещает нас назад. Еще Жан Батист Ламарк (1744–1829) высказал гипотезу о наследовании приобретенных признаков. Именно он создал учение об эволюции живой природы, разработал основы зоопсихологии, а в 1802 году ввел в научный обиход термин «биология».

На протяжении тысячелетий развития естественных наук доминировал подход «расчленяй и описывай». Если же изучать объект, не ломая, – остается наблюдать реакции. Известно, что наиболее важные процессы протекают на границах раздела сред, где «создаются напряжения между разноименными полюсами, между душой и телом, между содержанием и формой, между частицами и волнами, между числами и ощущениями» [22]. Это исторически предопределило следующую сентенцию: «воздействуй и смотри». Однако не всегда результат такого подхода бывает очевиден.

Мы зачастую сталкиваемся с явлениями инвариантности или нечувствительности, когда полученная информация не классифицируется, хотя она понята и осознана. Но, не попав в нужную «ячейку» научных представлений, она не инициирует размышлений в нужном направлении, не открывает горизонтов. Как будто бы и изюминка, но результат – тишина [5]. Вот почему мы можем говорить, что современная медицина – это не только технологии и мастерство врачевания. Это прежде всего – использование достижений и постоянно пополняемых знаний смежных наук, составляющих интегральное поле биомедицины.

Литература

1. *Анохин П.К.* Теория функциональной системы. *Усп.физиол. наук, 1,1, 19-54, 1970.*
2. *Аристотель.* Метафизика. *В кн.: IV. М.-Л., Соцэкгиз, 1934.*
3. *Астахова А.В., Лепахин В.К.* Неблагоприятные побочные реакции и контроль безопасности лекарств. М., с.199, 2004.
4. *Ашмарин И.П., Каразеева Е.П.* Нейропептиды. *В кн.: Биохимия мозга. СПб., с.232-266, 1999.*

5. *Босс В.* Интуиция и математика. М., Айрис-пресс, с.186, 2003.
6. *Бурбаки Н.* Очерки по истории математики. М., ИЛ, 1963.
7. *Галенко-Ярошевский П.А., Гацура В.В.* Этапы и перспективы развития фармакологии. *Краснодар, с.153, 2003.*
8. *Гесиод.* Теогония. Работы и дни. Т. Х. Эллинские поэты. М., 1929.
9. *Гиппократ.* Избранные книги (Перевод с греч. проф. В.И.Руднева.). М., «Сварог», 1994.
10. *Гомер.* Илиада. Одиссея. *М., ГИХЛ, 1967.*
11. *Даренская Н.Г., Короткевич А.О.* Неспецифическая реактивность организма и принципы формирования индивидуальной резистентности. М., с.240, 2001.
12. *Декарт Р.* Избранные произведения. М., 1950.
13. *Декарт Р.* Рассуждение о методе с приложениями «Диоптрика», «Метеориты», «Геометрия». М., 1953.
14. *Каркищенко Н.Н.* Лекарственная профилактика. М., с. 751, 2001.
15. *Каркищенко Н.Н.* Психоунитропизм лекарственных средств. М.,Медицина, с. 206, 1993.
16. *Колмогоров А.Н.* Основные понятия теории вероятностей. М.-Л., ОНТИ, 1936.
17. *Лазарев Н.В. /ред./* Фармакология патологических процессов. Л., с.299 с, 1951.
18. *Павлов И.П.* Рефлекс цели. Полное собр. трудов, т. 3. М., Изд-во АН СССР, с. 242-247, 1949.
19. *Стил Э., Линдли Р., Бланден Р.* Что, если Ламарк прав? М., Мир, с.2 67, 2002.
20. *Судаков К.В.* Приоритетные фундаментальные исследования интегративной деятельности нервной системы. *Вестник РАМН, с. 3-6, 2003.*
21. *Федоровский Г.* Шеренга великих медиков. Варшава, 1975.
22. *Хоффман Р.* Такой одинаковый и разный мир. М. Мир, с. 294, 2001.
23. *Чанышев А.Н.* Эгейская предфилософия. М., МГУ, 1970.
24. *Azam P., Peiffer J.C., Bonnet P.A. et al.* Qualitative and quantitative evaluation of a local lymph node assay based on *ex vivo* interleukin-2 production. *Toxicology 206, 285-298, 2005.*
25. *Banker G., Rhodes Ch.* A view to future modern Pharmaceutics. 3rd ed., Marcel Dekker Inc., .N.Y., P. 9-18, 1996.
26. *Chiarini A., Petrini P., Bozzini S. et al.* Silk fibroin/poly (carbonate)-urethane as substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells. *Biomaterials, 24, 789-799, 2003.*
27. *Contrera J.F., Matthews E.J., Kruhlak N.L. et al.* Estimating the safe starting dose in phase I clinical trials and no observed effect level based on QSAR modeling of the human maximum recommended daily dose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology 40, 185-206, 2004.*
28. *Davies J., Ward R.S., Hodges G. et al.* Quantitative structure-activity relationship modeling of acute toxicity of quaternary alkylammonium sulfobetaines to Daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry 23, 2111-2115, 2004.*
29. *Dearman R.J., Skinner R.A., Deakin N. et al.* Evaluation of an in vitro method for the measurement of specific IgE antibody responses: the rat basophilic leukemia (RBL) cell assay.
30. *Lazarova M., Slamenova D.* Genotoxic effects of a complex mixture adsorber onto ambient air particles on human cells in vitro: the effects of vitamins E and C. *Mutftion Research, 557, 167-175, 2004.*
31. *Helma C. I*n silico predictive toxicology: the state-of-the-art and strategies to predict human health effects. *Current Opinion in Drug Discovery and Development 8, 27-31, 2005.*
32. *Hosoya K., Hori S., Ohtsuki S. et al.* A new in vitro model for blood-cerebrospinal fluid barrier transport studies: an immortalized choroids plexus epithelial cell line derived from the ts58 SV40 large T-antigen gene transgenic rat. *Advanced Drug Delivery Reviews 56, 1875-1885, 2004.*
33. *Lindon, J.C., Holmes, E. Nicholson, J.K.* Toxicological applications of magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 45,109-143,2004.*
34. *Masungi C., Borremans C., Willems B. et al.* Usefulness of a novel Caco-2 cell perfusion system. *In vitro* prediction of the absorption potential of passively diffused compounds. *J. of Pharmaceutical Sciences 93, 2507-2521, 2004.*

35. *Mekenyan O., Dimitrov S., Serafimova R. et al.* Identification of the structural requirements for mutagenicity by incorporating molecular flexibility and metabolic activation of chemicals. I TA100 model. *Chemical Research in Toxicology 17, 753-766, 2004.*
36. *Mekenyan O., Nikolova N., Schmieder P. et al.* COREPA-M: a multy-dimensional formulation of COREPA. *QSAR and Combinatorial Science 23, 5-18, 2004.*
37. *Schafer V., Briesen.L., Rubsamen-Waigmann H.et al*. Phagocytosis and degradation of human macrophges. *J.Microencapsul. V.67, P. 18-23, 1994.*
38. *Snape J.R., Maund S.J., Pickford D.B. et al.* Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology 67, 143-154, 2004.*
39. *Testa A.,Cordelli E.,Stronati L. et al.* Evaluation of genotoxic effect of low level 50 Hz magnetic fields on human blood cells using different cytogenetic assays. *Bioelectromagnetics 25, 613-619, 2004.*
40. *Van de Bovenkamp M.M., Groothuis G., Draaisma A. et al.* A new human in vitro model to study early fibrogenesis. *Hepatology 40, 538A-538A, 2004.*
41. *Wang Q., Rager J.D., Weinstein K. et al.* Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International J. of Pharmaceutics 288, 349-359, 2005.*
42. *Waters M.D.F.* Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nature Reviews Genetics 5, 936-948, 2004.*

FORMATION AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL MEDICINE

N.N. Karkischenko

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Historical aspects of formation and development of biological medicine are discussed. Biomedicine is understood as an integral complex combining biological, medical and physico-chemical sciences and providing basis for clinical medicine.

Key words: biomedicine, historical premises, non-specific resistance, prospects.

Значение полиморфизмов генов-транспортеров органических анионов для индивидуализации фармакотерапии

В.Г. Кукес, Д.А. Сычев, Р.Е. Казаков, А.В. Семенов, И.В. Игнатьев, Г.В. Раменская, В.Н. Каркищенко

Институт клинической фармакологии ФГУ НЦЭСМП, Москва
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва
Институт новых технологий РАМН, Москва

Данный обзор содержит анализ литературы последних лет, посвященной исследованиям влияния полиморфизма транспортеров органических анионов на эффективность фармакотерапии. Установлено, что некоторые аллели транспортера OATP-C связаны со снижением вывода из организма статинов. Анализ аллельных вариантов других транспортеров органических анионов также может иметь прикладное значение.

Ключевые слова: транспортёры органических анионов, индивидулизация фармакотерапии.

Транспортеры органических анионов принимают участие в метаболизме большого числа соединений, включая широко применяемые лекарственные средства (ЛС). Являясь частью системы, элиминирующей ксенобиотики из организма, транспортеры органических анионов способствуют выведению ряда ЛС через почки в мочу и через печень в желчь.

В последние годы пристальное внимание исследователей привлекает изучение влияния полиморфизмов генов, ответственных за фармакокинетику ЛС, на процессы биотрансформации и выведения ЛС. Полученные данные могут иметь большое значение при разработке индивидуальных режимов дозирования ЛС на основе генотипа пациента, что будет способствовать более эффективной и безопасной фармакотерапии.

Транспортеры органических анионов — OAT и OATP

Транспортеры органических анионов представляют собой трансмембранные белки, ответственные за перенос через мембрану эндогенных веществ и ксенобиотиков с различными химическими свойствами. Они участвуют в абсорбции, распределении и выведении из организма лекарственных препаратов, функционируя в тесной связи с ферментами биотрансформации. Функцию выведения ксенобиотиков выполняют также, наряду с транспортерами органических анионов, и другие транспортные системы, например Р-гликопротеин и транспортеры органических катионов.

В настоящее время установлено, что группа соединений, в транспорте которых участвуют транспортеры органических анионов, не ограничивается исключительно органическими анионами: также возможен транспорт через мембрану катионов, цвиттерионов и даже неионизированных молекул [8]. Субстратами могут служить соединения разной химической природы, главными «опознавательными признаками» для переноса через мембрану являются заряд и степень гидрофобности молекулы.

Транспортеры органических анионов представлены двумя семействами: OAT (organic anion-transporters) и OATP (organic anion-transporting polypeptides).

OATP экспрессируются в печени, почках, головном мозге и кишечнике, играя важную роль в регуляции биодоступности и распределения ЛС в организме [8]. Их субстратами являются многие органические вещества, включая стероидные конъюгаты, тиреоидные гормоны, пептиды и ксенобиотики. OATP отвечают за фармакокинетику ряда ЛС (правастатин, рифампин, фексофеналдин и др.).

OAT-транспортеры структурно отличаются от OATP, многие из них играют важную роль в функционировании почек. Различаются оба семейства субстратами: OATP переносят органические анионы с более крупными и более гидрофобными молекулами, тогда как OAT – более мелкие и гидрофильные. Среди веществ, выводимых из организма транспортерами семейства OAT, ряд важных анионных ЛС, включая β-лактамные антибиотики, диуретики, нестероидные противовоспалительные, противовирусные и противоопухолевые препараты [8].

Представители семейства OATP, участвующие в процессах фармакокинетики и фармакодинамики ЛС

В последние годы согласно новой классификации, отражающей особенности первичной структуры, изменились названия представителей семейства OATP. Но, тем не менее, старые названия, наряду с новыми, до сих пор часто употребляются в научной литературе.

OATP-A (OATP1A2 по новой классификации) экспрессируется в мозге и почках, незначительная экспрессия наблюдается также в печени. Он участвует в выведении через почки многих эндогенных соединений и ксенобиотиков, включая бромосульфофталеин, желчные кислоты, стероидные сульфаты, тиреоидные гормоны, опиоидные пептиды, фексофенадин [5].

В настоящее время описано порядка 20 полиморфизмов гена *SLCO1A2*, кодирующего OATP-A, но из них только одна нуклеотидная замена, A516C, приводит к замещению аминокислоты Glu на Asp в положении 172, что вызывает снижение транспортной активности [6].

Транспортер OATP-C (OATP1B1) экспрессируется исключительно в базолатеральной мембране гепатоцитов. Также как OATP-A, OATP-C обладает широкой субстратной специфичностью и участвует в выведении из организма желчных кислот, сульфатных и глюкуроновых конъюгатов, тиреоидных гормонов, пептидов, ЛС (правастатин, метотрексат, рифампин). Полиморфизм гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP-C, влияет на фармакокинетику препаратов, метаболизируемых в печени. Скринингом кодирующей области гена было идентифицировано более 20 нуклеотидных замен, причем ряд аллельных вариантов сопровождается снижением транспортной активности OATP-C (табл. 1).

OATP8 (OATP1B3) по первичной структуре сходен с OATP-C: также экспрессируется преимущественно в печени [2], но при этом принимает участие в выведении дигоксина и холецистокинина-8. Обнаружены 4 замены в гене, кодирующем OATP8, не влияющие на транспортную активность белка [7]. Также не выявлено влияния на транспортную функцию полиморфизмов генов, кодирующих менее изученные транспортеры OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-H, OATP-I и OATP-J.

Представители семейства OAT, участвующие в процессах фармакокинетики и фармакодинамики

Все представители семейства OAT экспрессируются на мембране клеток почек, но в меньшем количестве их мРНК обнаруживается в других органах: в печени, скелетных мышцах, плаценте, мозге и т.д. OAT2 у человека в большей степени является печеночным транспортером, хотя также экспрессируется в почках [15].

Таблица 1

Полиморфизмы гена *SLCO1B1*, кодирующего транспортер органических анионов OATP1B1 (OATP-C) (по Marzolini et al. [1].)

	Положение замены нуклеотида	Замена аминокислоты	Влияние на транспортную активность OATP-C
1	217 T>C	Phe 73 Leu	Снижение транспортной активности
2	245 T>C	Val 82 Ala	Снижение транспортной активности
3	388 A>G	Asn 130 Asp	Снижение транспорта рифампина, правастатина (OATP-C*1b аллель)
4	411 G>A	Нет замены	Без изменений
5	452 A>G	Asn 151 Ser	Без изменений
6	455 G>A	Arg 152Lys	Без изменений
7	463 C>A	Pro 155 Tre	Без изменений
8	467 A>G	Glu 156 Gly	Снижение транспортной активности
9	521 T>C	Val 174 Ala	Снижение транспорта правастатина (OATP-C*15 аллель)
10	571 T>C	Нет замены	Без изменений
11	578 T>G	Leu 193 Arg	Отсутствие транспортной активности
12	597 C>T	Нет замены	Без изменений
13	721 G>A	Asp 241 Asn	Без изменений
14	1007 C>G	Pro 336 Arg	Снижение транспортной активности
15	1058 T>C	Ile 353 Tre	Снижение транспортной активности
16	1294 A>G	Asn 432 Asp	Снижение транспорта рифампина
17	1385 A>G	Asp 462 Gly	Без изменений
18	1454 G>T	Cys 485 Phe	Без изменений
19	1463 G>C	Gly 488 Ala	Снижение транспортной активности
20	1964 A>G	Asp 655 Gly	Снижение транспортной активности
21	2000 A>G	Glu 667 Gly	Снижение транспортной активности
22	2040 C>A	Нет замены	Без изменений

Идентифицировано 4 переносчика семейства OAT (OAT1-OAT4), встречающиеся у многих организмов. Структурно они представляют собой белки длиной 526-568 аминокислотных остатка, и содержат 12 трансмембранных доменов. Кроме того, транспортеры имеют гликозилированный участок между трансмембранными доменами 1 и 2 (на наружной стороне мембраны), а также сайты фосфорилирования между трансмембранными доменами 6 и 7, а также после 12-го домена (на внутренней стороне мембраны). Фосфорилирование соответствующих сайтов может играть важную роль в регуляции активности OAT [11].

Функциональный механизм OAT состоит в обмене α-кетоглутарата на органические анионы через мембрану, что осуществляется за счет непрямого сцепления с градиентом натрия, поддерживаемым Na-K-АТФазой [14].

OAT1 участвует в выведении через почки в мочу многих ЛС: противовирусных препаратов (ацикловир, ганцикловир, зидовудин, адефовир, цидофовир, тенофовир), нестероидных противовоспалительных средств, β-лактамных антибиотиков, диуретиков, противоопухолевых ЛС [15].

Обнаружено значительное количество замен нуклеотидов в генах транспортеров: 17 у OAT1, 16 у OAT3, но при этом не выявлено изменений общей транспортной активности в опытах *in vitro*. Но не исключено, что такие различия могут иметь ме-

сто избирательно для узкого круга соединений, в том числе лекарственных средств – субстратов ОАТ. Действительно, недавно были получены предварительные данные, что замена у ОАТ1 в положении 50 аргинина на гистидин повышает сродство транспортера к цидофовиру и адефовиру [14], а также по влиянию полиморфизма ОАТ3 на фармакокинетику правастатина [10]. Поэтому необходимы дальнейшие расширенные исследования влияния аллельных вариантов генов, кодирующих ОАТ, на фармакокинетику и фармакодинамику ЛС, являющихся субстратами ОАТ.

ОАТ2 печени и почек выводит небольшие гидрофильные анионы, среди которых индометацин и салицилат. Полиморфизм гена, кодирующего ОАТ2, малоизучен.

ОАТ3 участвует в транспорте сульфата эстрона, эстрадиола, простагландинов, нестероидных противовоспалительных средств, метотрексата, циметидина, многих противовирусных препаратов, желчных кислот и правастатина [12].

ОАТ4 находится в почках, значительный уровень экспрессии поддерживается также в плаценте. Транспортирует сульфаты стероидов, охратоксин А, зидовудин, метотрексат. Полиморфизм гена, кодирующего ОАТ4 малоизучен.

Роль ОАТ и ОАТР в фармакогенетике статинов

Применение статинов, ингибиторов 3-гидрокси 3-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы), занимает важное место в лечении пациентов с ишемической болезнью сердца. В ряде случаев применение лекарства сопряжено с нежелательными лекарственными реакциями (НЛР), либо с отсутствием должного эффекта, что связано с применением несоответствующей дозы препарата. В 50% случаев за НЛР ответственны генетические факторы [1]. Причины отрицательного ответа организма на прием статинов можно выявить методами генетической диагностики и использовать полученные данные для индивидуального подбора режима дозирования и типа ЛС.

Гены, полиморфизм которых может влиять на фармакологический ответ пациента на статины, составляют три группы:

1. Гены белков, ответственных за фармакокинетику статинов (изоформы цитохрома Р-450, Р-гликопротеин, ОАТР-С, ОАТ3).
2. Гены белков, ответственных за механизм действия статинов (ГМГ-КоА-редуктаза, холестерин-этерифицирующий трансферный протеин).
3. Гены белков, участвующих в патогенезе атеросклероза (АТФ-связывающий «кассетный» транспортер G5/G8, изофермент цитохрома Р-450 7А1) [3, 4].

При применении различных статинов, в зависимости от механизмов их действия и путей выведения, участвуют продукты разных генов. Часть статинов уже изначально являются лекарствами и для их активации не нужно протекания химических реакций внутри организма (аторвастатин, правастатин, флувастатин, розувастатин). Другие статины являются пролекарствами и превращаются в активный метаболит под действием карбоксиэстераз печени, образуя β-гидроксикислоты (ловастатин, симвастатин). Помимо метаболизма, осуществляемого различными изоформами цитохрома Р-450, статины активно выводятся из организма. Так, аторвостатин и β-гидроксикислоты ловастатина секретируется в желчь с помощью Р-гликопротеина [2].

Среди полиморфизмов гена *MDR1*, кодирующего Р-гликопротеин, наибольшее клиническое значение имеет С3435Т, связанный с изменением уровня экпрессии. Также клиническое значение имеют некоторые полиморфизмы ОАТР-С. В табл. 1 представлены данные о влиянии известных нуклеотидных замен гена, кодирующего ОАТР-С, на транспортную функцию транспортера.

Было обнаружено, что у носителей аллельного варианта *OATP-C*15* (две замены аминокислоты: Asn130Asp и Val174Ala) наблюдается снижение транспортной активности OATP-C. У таких пациентов замедляется поступление статинов из крови в гепатоциты, что приводит к снижению концентрации статинов в гепатоцитах и к ее повышению в плазме крови. Следствием этого является уменьшение гиполипидемического действия статинов и повышение риска возникновения НЛР со стороны поперечно-полосатой мускулатуры [2].

Было показано, что лица, являющиеся носителями аллельного варианта *OATP-C*15*, имеют достоверные отличия фармакокинетики правастатина по сравнению с гомозиготами по «дикому» типу [7]. У них на фоне терапии статинами (правастатин, аторвастатин, симвастатин) снижение уровня липопротеинов низкой плотности происходило в меньшей степени, чем у лиц, не имеющих данной аллели [12].

Также на фармакокинетику статинов влияет нуклеотидная замена A388G (аллель *OATP-C*1b*): у лиц, несущих данный аллельный вариант, достоверно выше площадь под фармакокинетической кривой (AUC) правастатина [9].

Наряду с процессом поступления статинов из крови в печень, в котором участвуют транспортеры OATP, они также могут выводиться из организма через почки с помощью OAT. В выведении правастатина, как уже было сказано, участвует OAT3.

В скелетной мускулатуре экспрессируются OAT1 и OAT3. Из них только OAT3 ответственен за проникновение правастатина внутрь мышечных клеток у человека, тогда как у крыс в фармакокинетике правастатина участвуют оба транспортера. С другой стороны, флувастатин и симвастатин дозозависимо ингибируют OAT1, снижая транспорт их субстратов в миоциты [13]. Дальнейшее исследование взаимодействия статинов с OAT, возможно, позволит вскрыть механизмы возникновения таких НЛР, как миопатии.

Заключение

Современная фармакогенетика открывает новые возможности определения причин неблагоприятного фармакологического ответа, проявляющегося в отсутствии должного эффекта или появлении НЛР. Выявление аллельных вариантов генов транспортеров органических анионов, наряду с генотипированием нуклеотидных замен в других генах (ферменты биотрансформации I и II фазы), отвечающих за фармакокинетику, механизм действия или патогенез, является персепективным подходом, способствующим индивидуализации фармакотерапии.

Фармакогенетика является сравнительно молодой, бурно развивающейся областью молекулярной медицины. Очевидно, что уже в недалеком будущем генетический анализ аллельных вариантов прочно войдет в число рутинных процедур.

Литература

1. *Кукес В.Г.* Клиническая фармакология. М.: Геотармед, 2004, С. 154-168.
2. *Кукес В.Г.* Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М.: Реафарм, 2004, С. 18-27; 55-65.
3. *Сычев Д.А., Семенов А.В., Пауков С.В., Кукес В.Г.* Фармакогенетика ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы (статинов): возможности индивидуализации терапии на основе генотипа.
4. *Kajinami K., Takekoshi N., Brousseau M.E., Schaefer E.J.* Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management. *Atherosclerosis - 2004, 177(2), P. 219-234.*
5. *Konig J., Cui Y., Nies A.T.* et al. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte mem-

brane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 2000, 278, P. 156-164.*

6. *Lee W., Smith L.H., Gervasini G., Leake B.F., Kim R.B.* Identification of nonsynonomous polymorphisms of human organic anion transporting polypeptide-A (OATP-A) associated with altered transport activity. *105th Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Florida, USA, 2004.*
7. *Lida A., Saito S., Sekine A.* et al. Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion transporting polypeptide, and three NADH: ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *J. Hum. Genet. - 2001, 46, P. 668-683.*
8. *Marzolini C., Tirona R.G., Kim R.B.* Pharmacogenomics of the OATP and OAT families. *Pharmacogenomics. 2004, 5(3), P. 273-282. Review. 15.*
9. *Mvinyi J., Johne A., Bauer S., Roots I., Gerloff T.* Evidence for inverse effects of OATP-C (*SLC21A6*) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther. 2004, 75, 5, P. 415-421.*
10. *Nishizato Y., Ieiri I., Suzuki H.* et al.: Polymorphisms of OATP-C *(SLC21A6)* and OAT3 *(SLC22A8)* genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin. Pharm. Ther. 2003, 73, P. 554-565.*
11. *Sweet D.H., Bush K.T., Nigam S.K.* The organic anion transporter family: from physiology to ontogeny and the clinic. *Am J Physiol Renal Physiol. – 2001, 281(2), P. 197-205. Review.*
12. *Tachibana-Iimori R., Tabara Y., Kusuhara H., et al.* Effect of genetic polymorphism of OATP-C (*SLC01B1*) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug Metab. Pharmacokin. 2004, 19, 5, P. 375-380.*
13. *Takeda M., Noshiro R., Onozato M.L., et al.* Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *European J. of Pharmacology. 2004, 483, P. 133-138.*
14. *Vavricka S.R., Van Montfoort J., Ha H.R., Meier P.J., Fattinger K.* Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology. 2002, 36(1), P. 164-172.*
15. *You G.* The role of organic ion transporters in drug disposition: an update. *Current Drug Metab. 2004, 5, P. 55-62.*

THE ROLE OF ORGANIC ANION TRANSPORTERS IN INDIVIDUAL PHARMACOTHERAPY

V.G. Kukes, D.A. Sychev, R.E. Kazakov, A.V. Semenov, I.V. Ignatiev, G.V. Ramenskaya, V.N.Karkischenko

Institute of Clinical Pharmacology NC ESMP, Moscow,
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow
Institute of New Technologies of RAMS, Moscow

This review contains analysis of recent literature exploring how polymorphisms of organic anion transporters influence on efficacy of pharmacotherapy. It is known that some of single nucleotide polymorphisms of OATP-C have effect on lowering the statines outflow. Allelic analysis of other organic anion transporters genes have clinical aim possibly too.

Key words: organic anion transporters, individual pharmacotherapy.

Роль бактериофагов *B. Antracis* в противодействии биотерроризму

В.Г. Попов, В.Н. Каркищенко, С.Ю. Пчелинцев, Д.В. Попов, А.А. Старшов

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва
Институт новых технологий РАМН, Москва

Открытие антибиотиков по праву приравнивается к крупнейшим научным достижениям XX века. Тем не менее, появление антибиотико-устойчивых штаммов в последнее время усложняет проблему профилактики и лечения особо опасных инфекций. Поэтому применение препаратов вирулентных бактериофагов и их ферментов рассматривается как стратегическое направление в области диагностики, профилактики и лечения инфекций.

Ключевые слова: антибиотики, бактериофаги, биотерроризм, профилактика, терапия.

Введение

Возможность применения биотеррористами штаммов особо опасных инфекций (ООИ) представляет серьёзную угрозу в связи с доступностью биотехнологий и активным внедрением генно-инженерных разработок. Поэтому исследования, касающиеся профилактики, своевременной диагностики и лечения сибирской язвы, возбудитель которой может быть использован в качестве биологического оружия, приобретают чрезвычайную актуальность.

Международный и государственный контроль не может быть эффективным в связи с появлением значительного числа специалистов высоко уровня на рынке рабочей силы. Как это не удивительно, но самые благоприятные возможности для биотерроризма создает постоянно развивающаяся международная экономическая интеграция.

Очевидно, что в создавшихся условиях разработка средств противодействия биотерроризму, в частности новых лечебно-профилактических препаратов, может быть частью мероприятий, гарантирующих защиту от ООИ.

Всесторонний обзор проблем, связанных с биотерроризмом, опубликован в целом ряде работ. В данном сообщении представлены литературные данные, касающиеся сибирской язвы.

Цель работы: определить наиболее актуальные направления исследований по разработке лечебно-профилактических препаратов.

Сибирская язва (Anthrax)

Сибирская язва (*Anthrax*) – острая инфекционная болезнь, протекающая в виде кожной, ингаляционной и гастроинтестинальной формах.

Ежегодно в мире регистрируется более 20 000 случаев заболеваний сибирской язвой. Болезнь широко распространена во многих странах Африки, Азии, Южной и Центральной Америки, Среднего Востока и Карибского бассейна; в США и странах Европы наблюдаются единичные случаи. Вместе с тем сообщения о вспышках сибирской язвы появляются регулярно во всех частях мира, в том числе и в европейских странах [15].

Bacillus anthracis является одним из наиболее вероятных патогенов, используемых биотеррористами. Особое внимание эта инфекция привлекла после появления в США осенью 2001 г. сообщений о применении спор этого микроорганизма в качестве бактериологического оружия. По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), по состоянию на 5 декабря 2001 г. в США зарегистрированы 22 случая сибирской язвы. У 18 пациентов диагноз был подтвержден, у 4 установлен предва-

рительный диагноз. Были зарегистрированы 11 случаев легочной и 11 случаев кожной формы болезни; из них 5 пациентов с ингаляционной формой сибирской язвы умерли.

Научный и практический интерес к проблемам, связанным с сибирской язвой, достаточно высок. Возбудитель сибирской язвы впервые был обнаружен в 1849-1850 гг. одновременно в России, Франции и Германии, а чистую культуру впервые выделил Р. Кох в 1876 г. Возбудитель сибирской язвы – *Bacillus anthracis* – принадлежит к семейству Bacillaceae и представляет собой аэробную грамположительную палочку длиной 6-10 мкм и шириной 1-2 мкм, неподвижную, образующую споры и капсулу. Образование капсулы кодируется плазмидой 60 kDa. *B.anthracis* хорошо растет на простых питательных средах и кровяном агаре, не требует использования специальных культуральных методик и образует характерные колонии в виде «головы медузы». На агаре Мак-Конки и других селективных питательных средах, содержащих соли желчных кислот, микроорганизм не растет. Культуры возбудителя не обладают гемолитическими свойствами.

Вегетативные формы *B.anthracis* быстро погибают в анаэробных условиях, при нагревании и действии дезинфицирующих средств. Споры *B.anthracis* имеют центральное расположение в клетке и являются термостабильными. Как и у многих других представителей рода *Bacillus*, они обладают высокой устойчивостью к действию факторов внешней среды и могут сохраняться в почве многие десятки лет.

B.anthracis продуцирует 3 термолабильных белка: *отечный фактор* (EF), *летальный фактор* (LF) и *протективный антиген* (PA), каждый из которых в отдельности не обладает патогенными свойствами; токсический эффект возникает лишь в комбинации друг с другом. Капсула *B.anthracis* состоит из поли-D-глутаминовой кислоты и может быть легко обнаружена при соответствующем окрашивании препаратов. К капсуле, отечному и летальному факторам и протективному антигену в организме человека и животных вырабатываются специфические антитела. Однако прямая корреляционная связь отмечается только между титрами антител к протективному антигену и защищенностью животных к сибирской язве.

Для того чтобы штамм *B.anthracis* был достаточно вирулентным, он должен продуцировать оба токсина (летальный и отечный) и обладать способностью к образованию капсулы. Такие штаммы имеют в своем составе две плазмиды патогенности: pXO1 – кодирует синтез токсинов; pXO2 – отвечает за образование капсулы [20]. Выработка этих факторов патогенности зависит от ряда условий: концентрации в окружающей среде гидрокарбонатов, определенного температурного режима и др .

Как указывалось, *B.anthracis* вырабатывает три термолабильных белка: протективный антиген; летальный фактор; отечный фактор. Последние два белка попарно соединяются с протективным антигеном и образуют два экзотоксина, известных как летальный и отечный токсины. Отечный токсин состоит из отечного фактора (89 кД) и протективного антигена (83 кД). Летальный токсин, в свою очередь, также состоит из двух компонентов – летального фактора (90 кД) и протективного антигена. Протективный антиген, выполняя роль молекулы-переносчика, является необходимым компонентом при реализации токсических эффектов, обусловленных обоими токсинами. Основная функция протективного антигена – формирование в мембране клетки каналов, через которые внутрь проникают остальные компоненты токсина – отечный и летальный факторы. На первом этапе протективный антиген связывается со специфическими рецепторами на поверхности мембраны клеток млекопитающих – главным образом макрофагов. Они называются ATX-рецепторами (*anthrax toxin*

receptor) и относятся к мембранным белкам I типа [13]. После закрепления на мембране клетки-мишени под действием мембранной протеазы происходит олигомеризация протективного антигена с образованием гептамера (63 кД), который последовательно связывается с отечным или летальным фактором [11]. Образовавшийся комплекс проникает в цитоплазму клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Летальный фактор является цинкзависимой протеазой, имеет сложную химическую структуру и состоит из 4 доменов, каждый из которых выполняет специфическую функцию [30].

Отечный фактор представляет собой кальций- и кальмодулинзависимую аденилатциклазу [18, 19], при участии которой синтезируется цАМФ в цитоплазме эукариотических клеток.

Компоненты токсинов *B.anthracis* обладают способностью блокировать фагоцитоз опсонизированных бактерий. Наряду с подавлением фагоцитоза оба токсина в комбинации ингибируют кислородозависимые бактерицидные системы полиморфноядерных лейкоцитов (нейтрофилов) [24]. Эффекты летального токсина реализуются через активацию ряда цитокинов, в том числе интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли, выделяемых из поврежденных макрофагов и приводящих к нарушению свертывающей системы крови, а также способствующих развитию септического шока и распространенного отека тканей.

Для профилактики и лечения сибирской язвы применяют живые, аттенуированные, химические вакцины и антибиотики.

Природные штаммы *B.anthracis*, в том числе и штаммы, выделенные в США осенью 2001 г., чувствительны ко многим антибиотикам, включая пенициллин, амоксициллин, доксициклин, тетрациклин, кларитромицин, клиндамицин, рифампицин, ванкомицин, хлорамфеникол и ципрофлоксацин.

По данным *in vitro* исследований, цефазолин и другие цефалоспорины I поколения также активны в отношении *B.anthracis*. Выделенные в США осенью 2001 г. 11 штаммов возбудителя сибирской язвы оказались умеренно резистентными к эритромицину и азитромицину.

Несмотря на то, что долгое время пенициллин был препаратом выбора для лечения сибирской язвы, встречаются, хотя и в редких случаях, природные штаммы *B.anthracis*, резистентные к пенициллину. В связи с этим пенициллин уже не может считаться препаратом выбора для лечения различных форм сибирской язвы. Более того, уже описаны случаи развития резистентности у штаммов *B.anthracis* при культивировании на средах, содержащих субингибирующие концентрации некоторых антибиотиков (доксициклин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, ципрофлоксацин, алатрофлоксацин, гатифлоксацин). Устойчивые к доксициклину штаммы, хотя и редко, но встречаются в естественных условиях [16].

Необходимо отметить, что при исследовании генома была обнаружена способность *B.anthracis* продуцировать b-лактамазы: индуцибельную пенициллиназу класса А и конститутивную цефалоспориназу класса В, обеспечивающую резистентность к цефалоспоринам II-III поколений. Наличие индуцибельной пенициллиназы класса А заставляет задуматься над оправданностью применения пенициллинов, особенно при ингаляционной форме сибирской язвы. Более того, b-лактамные антибиотики плохо проникают в макрофаги – клетки, где споры трансформируются в вегетативные формы. По результатам исследований *in vitro*, возбудитель сибирской язвы также устойчив к сульфаметоксазолу, триметоприму, ко-тримоксазолу, азтреонаму [29]. Одной из проблем, связанных с превентивной антимикробной терапией, является риск развития нежелательных лекарственных реакций, возрас-

тающий с увеличением продолжительности приема антибиотиков.

Так, осенью 2001 г. в США регистрировались нежелательные реакции, возникавшие у почтовых служащих, которым в течение 60 дней проводилась превентивная антибактериальная терапия. Из 3428 пациентов, получавших ципрофлоксацин, тошнота, рвота, диарея и боли в животе отмечались у 19%, обморочные состояния и головокружение – у 14%, изжога и рефлюкс – у 7%, сыпь различного характера, крапивница и зуд кожи – у 6%. Всего у нескольких пациентов были зарегистрированы симптомы, связанные с анафилактическими реакциями (затруднения при дыхании, глотании, чувство сдавления в области шеи, отек губ, языка или лица) и потребовавшие медицинского наблюдения. Тяжелых реакций и летальных исходов, связанных с приемом препарата, не зарегистрировано.

Не менее важно и то, что длительный прием антимикробного препарата может способствовать селекции резистентности к нему других, более распространенных и клинически значимых возбудителей. Наряду с гибелью патогенных микроорганизмов при длительном использовании фторхинолонов, как и других антибиотиков, происходит гибель нормальной микрофлоры организма человека. Поэтому в настоящее время не вызывает сомнений актуальность разработки быстродействующих эффективных средств для лечения сибирской язвы, вызываемой антибиотико-резистентными патогенами *Bacillus anthracis*. Недостаточная надежность антибиотикотерапии побуждает к поиску других методов лечения этого заболевания. Одно из перспективных направлений в решении данной задачи – применение вирулентных бактериофагов.

Идея применения бактериальных вирусов в лечении различных инфекционных заболеваний человека и животных возникла практически одновременно с открытием фагов. Таким образом, фаготерапия известна уже около ста лет. Ее становление сопровождалось активными дискуссиями о целесообразности использования фагов в качестве антимикробных лечебных агентов. В истории постепенного укрепления принципов фаготерапии можно выделить следующие этапы. В 1917 году канадский ученый Ф. Д'Эрелль впервые выдвинул идею фаготерапии болезней бактериальной этиологии [17]. Несколько позже он успешно апробировал фаги в лечении сальмонеллеза птиц, возбудителем которого является патоген Salmonella gallinarum. В другой серии экспериментов исследователь получил положительный эффект после обработки шигеллезными фагами кроликов с инфекционным патогеном Shigella dysenteriae. Следующий крупный успех Д'Эрелля – реализация проекта по фаготерапии больных холерой в Индии.

Работы канадского исследователя послужили стимулом к широкому применению различных фагов в лечебных целях. В США были организованы несколько крупных компаний по производству фаговых препаратов. В период с 1930 по 1940 годы увидели свет около 500 статей, посвященных различным аспектам фаготерапии. С 1940 г. и далее в течение нескольких десятилетий интерес к лечебным фагам несколько снизился. С одной стороны, это было обусловлено широким применением антибиотиков, с другой – далеко не всегда использование фагов сопровождалось положительным терапевтическим эффектом, что констатировалось в соответствующих публикациях. Основная причина таких неудач – недостаточная изученность свойств бактериальных вирусов. Ряд экспериментов сопровождался появлением в микробной популяции фагоустойчивых форм патогенов из-за использования умеренных фагов.

Открытие явления лизогении [25] следует считать важнейшим этапом в развитии идей фаготерапии. В этот период был

сформулирован один из основополагающих принципов конструирования лечебных образцов бактериальных вирусов, согласно которому препараты должны включать только вирулентные фаги. Последующие успехи фаготерапии в значительной степени обусловлены данным обстоятельством. Так, в Афганистане и Пакистане широко использовались вирулентные фаги при лечении и профилактике холеры. Русские эпидемиологи обработали фаговыми препаратами около 300 000 людей, что остановило развитие эпидемии [33]. Прогресс при лечении фурункулеза фагами отмечен в работе [14]. Для лечения и профилактики в нашей стране наряду с вакциной применяли бактериофаги. Большую группу среди них составляли фаги против кишечных инфекций: дизентерийный, брюшнотифозный, сальмонеллезный (группы ABCDE), колипротейный. Развитие резистентных форм бактерий и осложнения, связанные с применением антибиотиков и сульфамидных препаратов, привели к широкому спросу на так называемые раневые бактериофаги – стафилококковый, стрептококковый, коли, протейный, синегнойной палочки. Лечебные препараты против сибирской язвы отсутствуют [2].

Румынские исследователи продемонстрировали успешное сочетанное лечение урологических заболеваний человека вирулентными фагами и антибиотиками [30]. О растущей популярности фаготерапии свидетельствуют начавшиеся в этот период широкие исследования реакции организма человека и животного на бактериофаги. Результаты изучения роли ретикуло-эндотелиальной системы в процессе выведения фагов из организма представлены в работе [22]. Работа [28] открыла большую серию публикаций об иммунном ответе млекопитающих на введение бактериальных вирусов.

В 70-е и 80-е годы в ряде работ были высказаны сомнения относительно эффективности антибиотиков в лечении инфекционных заболеваний. Все чаще констатировалось распространение антибиотикорезистентных патогенных бактерий. Так называемые плазмиды устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) могут передаваться от одной клетки патогена к другой на уровне вида и даже рода [21]. Со временем стала очевидной необходимость поиска антибактериальных средств, альтернативных антибиотикам. Серия новых публикаций – доказательство того, что такой альтернативой могут быть бактериальные фаги.

Примечательны работы, в которых представлены результаты сравнительных исследований эффективности антибиотиков и фагов в лечении экспериментальных инфекций животных. Авторы показали, что бактериофаги эффективнее антибиотиков [35].

С 1981 до 1987 г. широкие исследования различных аспектов фаготерапии (конструирование лечебных препаратов, фармокинетика, иммунология и т.д.) были проведены в Польше группой С. Слоупека. В работах польских ученых обобщен опыт лечения фагами более 500 пациентов с различными гнойно-воспалительными заболеваниями и даны ценные практические рекомендации [34].

В настоящее время вопросами фаготерапии занимаются во многих лабораториях мира, о чем свидетельствуют публикации последних лет. Их анализ позволяет отметить следующее.

Далеко не каждый фаг может быть использован в лечебных целях. Этой точки зрения придерживается большинство специалистов в области фаготерапии. Конструированию лечебного препарата должны предшествовать подробные исследования биологических, иммуно-химических и физико-химических свойств фагов. С учетом этих характеристик производится скрининг наиболее перспективных для лечения бактериальных вирусов [3, 7].

В России проблемы разработки лечебных фаговых препаратов находятся в цен-

тре внимания многих научно-исследовательских институтов. Конструирование лечебных образцов бактериальных вирусов проводится с ориентацией на определенные требования. Препарат должен включать только вирулентные фаги с широкими спектрами по отношению к штаммам конкретного патогена. Фаги должны воспроизводиться в клетке-хозяине с высоким выходом дочерних фаговых частиц. Литическая активность препарата должна быть стабильной при длительном его хранении. Препарат должен включать фаги, существенно отличающиеся друг от друга по механизму взаимодействия с клеткой – хозяином. Применение таких комбинаций при лечении уменьшает вероятность генерации фагоустойчивых форм в популяции патогена.

К настоящему времени описаны несколько видов фагов *B. anthracis*, которые отнесены к трем семействам по классификации [10].

Бактериофаги CP-51 и CP-54 принадлежат семейству *Myoviridae*. Вирион каждого из этих бактериальных вирусов включает изометричную головку диаметром около 120-122 нм и сокращающийся хвостовой отросток длиной 198-200 нм (A1-морфотип). Аппарат адсорбации фагов – базальная пластинка и фибриллы длиной около 40 нм. Литическая активность CP-51 и CP-54 быстро снижается при хранении препаратов. В геноме (ДНК) фага CP-51 тимин полностью замещен на 5-hydroxymethyl-uracil.

Гамма-фаг отнесен к семейству *Siphoviridae* и морфотипу B1. По данным японских исследователей, диаметр икосаэдрической головки равен 52 нм, длина несокращающегося отростка – 185 нм. В работе Акерманна констатируется, что вирион включает головку диаметром 59 нм и хвостовой отросток длиной 217 нм. Содержание ГЦ-пар в геноме фага составляет 36 мол.%. В состав вириона входят десять белков с молекулярной массой от 12 до 140 kd [37].

Бактериофаг AP50 – липидсодержащий бактериальный вирус с гексагональным вирионом без хвостового отростка (семейство *Tectiviridae*). Диаметр вириона составляет 80 нм [27]. В отличие от других известных бациллярных фагов, геном AP50 представлен рибонуклеиновой кислотой (РНК). Показано, что в состав оболочки AP50 входят фосфатидилэтаноламин, фосфатидиловая кислота (phosphatidic acid), кардиолипин и фосфатидилглицерин. Инфекционный процесс в системе фаг-клетка характеризуется продолжительным латентным периодом (55 мин) и высокой урожайностью, составляющей 310 частиц на одну клетку [27].

Следует отметить, что сибиреязвенные бактериальные вирусы были открыты еще в 30-е годы прошлого столетия. Тем не менее, до настоящего времени ни один из фагов не исследован детально в соответствии со всеми рекомендациями Международного комитета по таксономии вирусов [9]. Мы не располагаем опубликованными данными и относительно разработок лечебных препаратов сибиреязвенных бактериальных вирусов.

Как указывалось выше, особенностью микроба *B.anthracis* является наличие факторов патогенности (токсина и капсулы), которые не ингибируются фагами, поэтому использование только фагового препарата не позволит полностью решить проблему профилактики и лечения сибирской язвы.

Ранее нами было показано, что специфические антитела различных классов оказывают разноплановое действие на факторы патогенности. IgG-антитела ингибируют развитие спор в фазе инициации, капсулообразования *B.anthracis*, нейтрализуют сибиреязвенный токсин. Активным началом является F(ab)2 фрагмент иммуноглобулина G. Превентивные свойства сыворотки обусловлены F(ab)2 фрагментом IgG и опсонизирующим эффектом IgM на начальных этапах развития спор.

В настоящее время для лечения различных форм сибирской язвы применяют гетерологичный (лошадиный) иммуноглобулин, который в ряде случаев является мало эффективным, а также обладает выраженными сенсибилизирующими свойствами. Поэтому необходимо применение химически чистых препаратов специфических антител, либо их F(ab)2 фрагментов, не обладающих таким побочным эффектом. Одним из возможных направлений исследований является получение моноклональных антител и их F(ab)2 фрагментов с заданной специфичностью к отдельным антигенам *B.anthracis* на различных стадиях развития микроба [30, 31].

Моноклональные антитела, благодаря их высочайшей специфичности, стандартности и технологичности получения, успешно вытесняют и заменяют иммунную сыворотку и препараты на ее основе.

В проекте предусмотрено проведение экспериментов по сочетанному применению вирулентных фагов и моноклональных антител в моделях с животными, зараженными патогеном *B. anthracis*. Целесообразно подробнее рассмотреть иммунологический аспект будущей работы.

С открытием Koler и Milstein в 1975 году [23] возможности применения гибридизации соматических клеток для получения стационарных гибридных клеток – гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, началась новая эра иммунологических исследований. Методика гибридомы разрешила одну из основных проблем, которую иммунологи пытались разрешить на протяжении многих лет, – проблему длительного производства больших количеств гомогенных антител к разнообразным антигенам.

Значительное увеличение числа лабораторий в мире, производящих моноклональные антитела с помощью гибридомной технологии, является свидетельством преимущества их использования как инструмента для исследований, по сравнению со стандартными препаратами антител человека. В качестве примера можно привести работы по получению клеточных линий и их клонов, которые вырабатывают антитела к столбнячному токсину [5]. В многочисленных публикациях освещены вопросы по применению моноклональных антител (МА) по индикации опасных патогенов, в том числе и *B.anthracis* [12].

Заключение

1. Рекомендации по использованию антибиотиков должны постоянно пересматриваться с учетом антибиотикорезистентности агента и новой информации, полученной в ходе клинических, микробиологических и иммунохимических исследований.

2. Наряду с антибактериальными средствами для профилактики и лечения различных форм сибирской язвы могут использоваться и другие терапевтические препараты: глюкокортикоиды, ингибиторы ангиотензии, ферменты (лизины), факторы некроза опухолей и блокаторы кальциевых каналов, генно-инженерные аналоги протективных антигенов, требующие дальнейшего изучения.

3. Внедрение комплексного препарата на основе фагового препарата и специфических антител, на наш взгляд, является наиболее эффективным направлением как для лечения различных форм заболевания сибирской язвы, так и профилактики.

Литература

1. *Ашмарин И.П., Тарумов В.С., Попов В.Г. и др*. Опсонизирующая активность иммуноглобулинов противосибиреязвенной сыворотки. *Лабораторное дело, 1980, № 5, 257-320.*
2. *Бургасов П.Н*. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. *М., Медицина, 1978, 438 с*.
3. *Жиленков Е.Л., Попов Д.В., Попова В.М., Дарбеева О.С., Майская Л.М*. Совершенствование методов конструирования препаратов

бактериофагов для лечения лор-патологии. *Биопрепараты. 2002. № 2(6), с. 2-6.*

4. *Каркищенко Н.Н.* Лекарственная профилактика. *М., Воентехлит, 2001, 761 с.*
5. *Кеннетф Р.Г., Дж. Мак-Керна, Бехтол К.Б.* Моноклональные антитела. *М., Медицина., 1983. 416 с.*
6. *Крылов В.Н.* Фаготерапия: мифы и реальностью. *Наука в России. 2002, № 4, с.41-46.*
7. *Попов В.Г., Щербаков Г.Я., Маринин Л.И., Старицын Н.А., Степанов А.В.* Профилактика и терапия сибиреязвенной инфекции. 2003. http//bio.su/popr.htm.
8. *Попов Д.В.* Разработка фагового препарата для лечения хронического гнойного среднего отита. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Москва. 2003. 29 с.
9. *Ackermann H.-W., DuBow M.S.* 1987. Viruses of prokaryotes. vol.I. General properties of bacteriophages. *CRC Press. Boca Raton. 2003.*
10. *Ackermann H.-W., Eisenstark A.* The present state of phage taxonomy. *Intervirology. 1974. V. 3. P. 201-219.*
11. *Ahuja N., Kumar P., Bhatnagar R.* Hydrophobic residues Phe552, Phe554, Ile562, Leu566, and Ile574 are required for oligomerization of anthrax protective antigen. *Biochem Biophys Res Commun 2001; 287:542-9.*
12. *Bessler W.G. et al.* Generation of human monoclonal antibodies against Bacillus Snthracis toxin. *Biological Medical Defense Conference, 2004, P. 43.*
13. *Bradley K.A., Mogridge J., Mourez M., Collier R.J., Young J.A.* Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature 2001; 414:225-9.*
14. *Bryant R.E. Saford J.P., Alcoze T.* Treatment of recurrent furunculosis with staphylococcal bacteriophage-lysed vaccine. *JAMA. 1965. V. 194. P. 11-14.*
15. *Caksen H., Arabaci F., Abuhandan M., Tuncer O., Cesur Y.* Cutaneous anthrax in eastern Turkey. *Cutis 2001; 67:488-92.*
16. *Cieslak T.J., Eitzen E.M. Jr.* Clinical and Epidemiologic Principles of Anthrax. *Emerg Infect Dis 1999; 5:552-5.*
17. *D'Herelle F.* Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *Comptes rendus Acad. Sci. Paris. 1917. 165: 373-375.*
18. *Farrar W.E.* Anthrax: virulence and vaccines. *Ann Intern Med 1994; 121:379.*
19. *Fox J.* Bioterrorism: microbiology key to dealing with threats letter. *ASM News 1998; 64:225-7.*
20. *Green B.D., Battisti L., Koehler T.M., Thorne C.B., Ivins B.E.* Demonstration of capsule plasmid in Bacillus anthracis. *Infect Immun 1985; 49:291-7.*
21. *Hahn F.E., Washington D.C.* Acquired resistance of microorganisms to chemotherapeutic drugs. *Basel-Munchen-Paris-London-New-York-Sidney. 1976. 201 pp.*
22. *Inchley C.J.* The activity of mouse Kupffler cells following intravenous infection of T4 bacteriophage. *Clin. Exp. Immunol. 1969. V. 5. P. 173-187.*
23. *Kohler G., Milstein C.* Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined spedificity. *Nature, 1975. V. 256, P. 495.*
24. *Lew D.P.* Bacillus anthracis (Anthrax). *In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 2001. 5th ed. V. 2. p. 2215-20.*
25. *Lwoff A.* Lysogeny. *Bact. Rev. 1953. 17. 269-337.*
26. Monoclonal antibodies. Hibridomas: A New Dimension in Biological Analyses. *Ed. by R.H.Kennett, T.J.McKearn and K.B.Bechgtol. Plenum Press. New York & London. 1981.*
27. *Nagy E., Pragai B., Ivanovics G.* Characterization of phage AP50, an RNA phage containing phospholipids. *J. Gen. Virol., 1976. V. 32. P. 129-132.*
28. *Ochs H.D., Davis S.D., Wedgwood R.J.* Immunologic responses to bacteriophage ΦX174 in immunodeficiency diseases. *J. Clin. Invest. 1971. V. 50. P. 2559-2568.*
29. *Odendaal M.W., Peterson P.M., de Vos V., Botha A.D.* The antibiotic sensitivity patterns of Bacillus anthracis isolated from the Kruger National Park. *Onderstepoort J Vet Res 1991; 58:17-9.*
30. *Pannifer A.D., Wong T.Y., et al.* Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature 2001; 414:229-33.*
31. *Popov V.G.* Therapy and prophylaxis of anrhrax infection with specific bacteriophages and immunoglobulins. *Biological Medical Defense Conference. October 2004., Munchen.*

32. *Popov V.G.* Therapy and prophylaxis of anrhrax infection. *Biological Medical Defense Congress. 2004. Canadian colloquium in Moscow.*

33. *Sayamov R.M.* Treatment and prophylaxis of cholera with bacteriophage. *Bull WHO. 1963. V. 28. P. 361.*

34. *Slopek S., Weber-Dabrowska B., Dabrowski M., Kucharewicz-Krukowska A.* Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987. V. 35. P. 569-583.*

35. *Smith H.W., Huggins M.B.* Effectiveness of phage in treating experimental Escherichia coli diarrhea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol. 1983. V. 129. P. 2659-2675.*

36. *Tchubatova S.A., Zhilenkov E.L., Popova V.M., Zheludeva I.V., Tylskiy V.S., Golubkov A.S., Panushin S.K.* To a problem creation of the phage gel for treatment of inflammatory periodontal diseases. *Parodontology. 2000. No. 4(18). P. 48-52.*

37. *Watanabe T., Morimoto A., Shiomi T.* The fine structure and the protein composition of phage of Bacillus anthracis. *Can. J. Microbiol. 1975. V. 21. P. 1889-1892.*

38. *Zilisteanu C., Ionescu H., Ionescu-Dorohoi T., Mintzer L.* Treatment of urinary infections with bacteriophage-autovaccine-antibiotics. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microb. 1971. V. 30. P. 195-207.*

* Corresponding author V.G. Popov.
E-mail address: popoviie@mail.ru

THE ROLE OF BACTERIOPHAGES *B. ANTRACIS* IN THE COUNTERACTION OF BIOTERRORISM

V.G. Popov, V.N. Karkischenko, S.Yu. Pchelintsev, D.V. Popov, A.A. Starshov
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow
Institute of New Technologies of RAMS, Moscow

The inculcation of complex drug on the base of phage drug and specific antibodies is one of the most effective direction for the treatment of the different forms of *Antrax* and for it's prophylaxis.

Key words: Anthrax, bacteriophages, treatment, prophylaxis.

Проблемы биотехнологии в свете сравнительно-эмбриологического анализа раннего развития млекопитающих

Н.Ю. Сахарова

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Возврат яйцеклеток млекопитающих к олиголецитальности определяет резкие различия между ранним развитием млекопитающих и других амниот. Полное асинхронное дробление, расположение потомков двух первых бластомеров крест-накрест, интерфазные перемещения бластомеров, длительное сохранение ими тотипотентности – все это позволяет сравнивать самый ранний период онтогенеза млекопитающих с дроблением низших позвоночных, а именно гидромедуз (Мечников, 1886). В обеих группах животных дробление приводит к образованию морулы, которая у гидромедуз преобразуется в выходящую из оболочки оплодотворения планулу – свободно живущую личинку, а у млекопитающих – в бластоцисту, которая также выходит из оболочки оплодотворения (*z. pelucida*) и имплантируется в ткани матки, что позволяет считать бластоцисту паразитической личинкой млекопитающих, имеющей высокоспециализированные приспособления к питанию за счет материнского организма. Анализ имеющихся в литературе данных (Mintz,1970; Markert, Petters, 1978 и др.) позволяет считать, что последующее развитие нового эмбриона происходит за счет имеющихся в теле личинки эмбриональных клеток и представляет собой аналог полиэмбрионии и педогенеза, характерных для развития некоторых высших паразитических насекомых. Косвенным подтверждением этой аналогии служит тот факт, что такое явление, как хромосомный (или геномный) импринтинг, характерен только для двух групп животных – млекопитающих и высших насекомых, использующих для размножения педогенез. Сопоставление раннего развития млекопитающих, низших многоклеточных и насекомых позволяет считать, что важной особенностью яйцеклетки млекопитающих является ее потенциальная способность, давать начало не одному, а нескольким организмам, используя принцип полиэмбрионии, как на самых ранних стадиях дробления, так и на стадии бластоцисты.

Ключевые слова: яйцеклетка, бластомеры, асинхронное дробление, сравнительная эмбриология.

Современная биомедицина, одним из направлений которой являются поиски и развитие экспериментальных биомоделей для исследования возможности лечения различных, в том числе и генетических, болезней человека, использует методы биологического и математического моделирования самых разнообразных процессов, идущих в живом организме от субатомных до многосистемных уровней (Каркищенко, 2005). Эта наука должна опираться на фундаментальные биологические исследования. Всё выше сказанное актуально для решения такой важной проблемы, как клонирование млекопитающих и получение эмбриональных стволовых (ЭС) клеток человека. Для успешного решения этих проблем необходимо глубокое понимание особенностей раннего развития млекопитающих (Сахарова, Чайлахян, 2003). За последние годы были получены многочисленные экспериментальные данные, открывающие такие особенности развития млекопитающих, которые поставили перед учеными не только новые научные, но и нравственные вопросы (Clarke, 1986; Davies, 1986; McLaren, 1986, 1987; Andersen, 1987; Курило, 2000; Alexandre, 2001).

Один из таких вопросов, на который и сегодня нет окончательного ответа: что

собою представляет оплодотворенная яйцеклетка млекопитающих до того момента, как она имплантируется в ткани матки? Является ли она таким же эмбрионом, как оплодотворенная яйцеклетка лягушки (Davies, 1986; Anderson, 1987), или пре-эмбрионом (McLaren, 1987), или ооцитом, в котором процессы оогенеза продолжаются и после оплодотворения (O'Farrell et al., 2004)? Сложность интерпретации детально изученных фактов связана с рядом особенностей самых ранних стадий, сопровождающих оплодотворение (Сахарова, 2004). Другой вопрос, который имеет непосредственное отношение к проблемам биотехнологии, можно сформулировать следующим образом: что такое бластоциста – конечная стадия предимплантационного периода, на которой отбираются клетки-предшественники ЭС клеток? Для ответа на эти вопросы, по-видимому, небесполезно провести анализ событий, происходящих в яйцеклетке млекопитающих после её оплодотворения и сравнить их с тем, что происходит в других группах животных.

Яйцеклетки млекопитающих характеризуются почти полным отсутствием желтка, т. е., они вторично алецитальны, и это определяет особенности их эмбрионального развития, резко отличающегося от развития других *Amniota*, обладающих полителолецитальными яйцеклетками. Небольшое количество желтка выталкивается при первых делениях дробления и образующиеся бластомеры полностью его лишены. Яйцеклетки не обладают ясно выраженной полярностью, они претерпевают полное, асинхронное дробление. Деление одного из двух первых бластомеров идет в меридиональной плоскости, а другого – в экваториальной. Бластомеры длительно сохраняют тотипотентность и способны к интерфазным перемещениям (Белоусов, 1980; Гилберт, 1993). Эти характеристики не позволяют сопоставлять раннее развитие млекопитающих с таковым не только высших, но и низших позвоночных. В то же время раннее развитие млекопитающих в значительной степени напоминает развитие низших многоклеточных, а именно метагенетических гидромедуз, детально изученное еще И.И.Мечниковым в 1886 г. Их яйцеклетки не проявляют строгой полярности, многие из гидромедуз характеризуются анархическим дроблением, которому сопутствуют повороты и переориентировки бластомеров. Бластомеры проявляют высокую тотипотентность и при разделении способны дать начало развитию новых особей (Захваткин А., 1949). Всё это полностью соответствует описанию событий, происходящих в раннем развитии млекопитающих (Иванова-Казас, 1995).

В результате дробления и у гидромедуз и у млекопитающих формируется плотный комок клеток – морула, которая у гидромедуз преобразуется в планулу, выходящую из оболочки и представляющую собой свободно живущую личинку. У млекопитающих морула преобразуется в бластоцисту, имеющую вид полого шарика, стенка которого (трофобласт) состоит из одного слоя крупных вытянутых клеток. Внутри находится небольшое скопление мелких клеток, так называемая внутренняя клеточная масса (ВКМ), которая прикреплена к наружной стенке.

Алецитальность яйцеклеток у абсолютного большинства животных связана с наличием в их последующем развитии личиночной стадии. Логично предположить, что возврат к алецитальности у млекопитающих должен сопровождаться восстановлением в их развитии и личиночной стадии. Действительно, если руководствоваться основным определением эмбриологии как науки, изучающей развитие особи *em bryo*, т.е. в оболочке, то следует признать высказывавшееся ранее мнение (Дабагян, устн. сообщ., 1977) о том, что собственно эмбриональное развитие заканчивается выходом бластоцисты из оболочки оплодотворения, *z. pellucida*.

С учетом ее дальнейшей судьбы, бластоцисту следует рассматривать как ***паразитическую личинку***, обладающую высокоспециализированным приспособлением для развития в теле хозяина, каковым является материнский организм. Трофобласт, участвующий в образовании плаценты, полностью обеспечивает её питанием.

Как хорошо известно, в ВКМ после имплантации бластоцисты в ткани матки наблюдаются типично эмбриологические процессы – происходит образование двух клеточных слоев, гипо- и эпибласта; последний формирует тело эмбриона, развитие которого идет аналогично развитию эмбрионов других *Amniota*, Это дает основание считать, что в бластоцисте (личинке млекопитающих) образовался новый эмбрион. Явление развития в личинке новых эмбрионов хорошо известно в эмбриологии и носит название полиэмбрионии. В этом случае внутри личинки образуются новые организмы, за счет определенных клеток, находящихся среди других соматических клеток. Полиэмбриония присуща некоторым паразитическим насекомым из перепончатокрылых (высшие насекомые). У них в результате дробления олиголецитальной яйцеклетки формируется личинка, которая представляет собой плотный комок клеток, окруженный трофамнионом, с помощью которого из тела хозяина поступает питание. Расположенные среди личиночных клеток, группы эмбриональных клеток размножаются и дают начало новым личинкам. Близко к полиэмбрионии стоит такое явление как педогенез, при котором находящиеся в теле личинки яйцеклетки дают начало новым эмбрионам. В частности такое размножение характерно для галлиц рода Miastor (Захваткин Ю., 1975; Бей-Биенко, 1980).

В случае млекопитающих, если считать бластоцисту аналогом паразитической личинки насекомых, можно предположить, что клеточный состав ВКМ неоднороден: среди клеток, составляющих тело личинки, т. е. ВКМ, должна быть группа клеток, способная дать начало новому эмбриону. С этим предположением полностью согласуются результаты опытов по исследованию развития химерных зародышей, созданных из генетически различающихся бластомеров (Mintz, 1970; Markert, Petters, 1978). Согласно этим исследованиям, большая часть клеток ВКМ бластоцисты никогда не участвует в формировании взрослого организма, и в образовании зародыша участвуют всего три (или несколько больше) бластомера бластоцисты (Гилберт, 1993), то есть, говоря другими словами, начало рождающемуся организму могут дать лишь 3-4 клетки из всего состава ВКМ. По-видимому, в бластоцисте может быть несколько групп таких эмбриональных клеток, что, как один из вариантов, приводит к образованию однояйцовых близнецов. Хорошо известен факт постоянного рождения у одного из видов броненосца четырех детенышей одного пола. Дальнейшее изучение этого феномена показало, что это происходит благодаря тому, что все 4 зародыша развиваются из одной бластоцисты, следовательно, в бластоцисте броненосцев существует 4 группы клеток, дающие начало 4 эмбрионам (Пэттен, 1959).

Таким образом, дробление млекопитающих несет признаки, сближающие его с дроблением низших беспозвоночных, а формирование паразитической личинки, дающей начало новым эмбрионам с помощью процесса, сочетающего в себе черты полиэмбрионии (наличие в теле личинки эмбриональных клеток) и педогенеза (развитие в теле личинки новых эмбрионов), показывает удивительное сходство с развитием некоторых паразитических насекомых. Выявленные аналогии развития могут быть иллюстрацией параллелизма в неродственных группах животных (Светлов, 1965). В то же время обнаруженные единые молекулярно-генетические механизмы формирования аналогичных орга-

нов у неродственных групп животных (Гилберт и др., 1997) позволяют предположить, что это сходство носит более глубокий характер.

В связи с этим следует обратить внимание на тот факт, что такое явление как геномный (или хромосомный) импринтинг обнаружен лишь в двух группах животных – у некоторых высших насекомых и у млекопитающих (Lyon, Rastan, 1984). У последних он определяет не только биологические, например, невозможность партеногенеза (Surani, Barton, 1983, McGrath, Solter, 1984 и др.), но и социальные (такие как умственные и характерологические) признаки (Pagel, 1999). Можно предположить, что возникновение геномного импринтинга у млекопитающих, отсутствующего у их прямых предков, связано с появлением личиночной формы развития.

Сходство некоторых фаз раннего онтогенеза млекопитающих и других, совершенно неродственных им животных согласуется с представлением об эволюции как комбинации некиих «блоков». По этой гипотезе, имеющей исторические корни, в эволюции неоднократно используются различные сочетания ограниченного количества структурных и функциональных блоков, и по-видимому, именно блочность эволюции типов оказывается их основным свойством (Чайковский, 2003).

По-видимому, раннее развитие млекопитающих носит «блочный» характер, соединив в себе механизмы и стадии, сходные с таковыми у животных самых разных таксономических групп, не всегда связанных непосредственным родством с млекопитающими. Получив вторично алецитальность, яйцеклетка млекопитающих повторяет особенности дробления, характерные для самых низших многоклеточных. В этот процесс включаются новые элементы, присущие только развитию млекопитающих. Замедленное деление в период дробления послужило одной из предпосылок гипотезы о том, что оплодотворенная яйцеклетка продолжает оогенез и формирует клетки-кормилки, аналогично тому, что происходит в оогенезе насекомых. Аналогом клеток-кормилок рассматривается трофобласт бластоцисты (O'Farrell et al., 2004). Однако можно дать другое объяснение этому загадочному явлению, связав его с такой особенностью раннего развития млекопитающих, как перемещения ранних бластомеров относительно друг друга.

Оказалось, что первое определение того, какие бластомеры дадут начало клеткам ВКМ бластоцисты, сформирующим будущий взрослый организм, происходит на стадии 4 бластомеров (Tarkowski et al., 2001). Так как на этой стадии каждый из 4 бластомеров, будучи изолированным, способен развиться в полноценный организм, можно предположить, что определение судьбы каждого из бластомеров, составляющих единый зародыш, зависит от его положения в целом и от взаимодействия с другими бластомерами в ходе их перемещений. По-видимому, длительные клеточные циклы и дают возможность для тех сложных межклеточных взаимодействий, которые определяют дальнейшее развитие и конкретную судьбу бластомеров.

Бластоциста, наряду со сходством с паразитической личинкой насекомых, несет черты, присущие только млекопитающим, и прежде всего то, что в качестве хозяина ею используется не животное другого вида а материнский организм. Эмбриональные клетки, находящиеся в теле личинки млекопитающих, дают начало не личинке следующего поколения, а новому эмбриону. Развитие его идет аналогично развитию эмбрионов других Amniota, в частности птиц, используя сходный механизм гаструляции, образования осевых органов и т.д.

Представление о существовании личиночной стадии в онтогенезе млекопитающих позволяет объединить в единую схе-

му все, как казалось, противоречивые данные, полученные в ходе экспериментальных исследований и наблюдений за ранним развитием млекопитающих. Дискуссия по поводу классификации ранних стадий развития млекопитающих привела к тому, что в настоящее время большинство исследователей поддерживают точку зрения, по которой в ***раннем пренатальном онтогенезе млекопитающих, в том числе и человека, существует два эмбриона*** (Johnson and Selwood, 1996). Первый – conceptus – образуется при дроблении оплодотворенной яйцеклетки, второй – embryo proper – формируется из внутренних клеток бластоцисты. Многие исследователи пытаются установить связь между этими различными эмбрионами, занимаясь поисками половых детерминантов, закономерностей билатеральной симметрии обоих зародышей и т.д. (Zernicka-Goetz, 1998; Piotrowska, Zernicka-Goetz, 2002; Gardner, Davies, 2003). Однако во всех этих исследованиях не дается определения того, что же такое бластоциста - промежуточное специализированное образование, являющееся результатом развития одного эмбриона и дающее начало другому. Если это «продукт оплодотворенной яйцеклетки, большая часть которого дифференцируется в ткани, защищающие и питающие» (McLaren, 1986), то по всем своим характеристикам ***бластоциста соответствует личинке, в которой из соматических клеток путем полиэмбрионии развивается новый эмбрион.*** Такое представление переводит поиски механизмов его формирования из эмбриологии в биологию бесполого размножения, разновидностью которого и является полиэмбриония (Токин, 1987).

Экспериментальным подтверждением приведенных выше рассуждений могут служить результаты опытов по использованию ЭС клеток, т.е. истинно соматических, для создания зародышей (embryo proper), способных к развитию в полноценных, фертильных взрослых особей. Такие зародыши были образованы из ЭС клеток, полученных как из ВКМ бластоцисты (Nagy et al., 1993), так и из клеток морулы и бластомеров более ранних стадий дробления (Tesar, 2005). Последний автор делает акцент на том, что «эти исследования поднимают интересный вопрос о том, обладают ли ЭС клетки, полученные от эмбрионов разных преимплантационных стадий, одинаковым потенциалом развития». Это еще раз подчеркивает, что понимание особенностей раннего развития млекопитающих помимо теоретического имеет в настоящее время и большое практическое значение в связи с разнообразными биотехнологическими работами, такими, как клонирование, криоконсервация эмбрионов и культивирование ЭС клеток. Особое внимание следует обратить на полиэмбриониию - показателя неустойчивой клеточной организации (Захваткин А., 1949).Она характерна как для самых ранних стадий дробления, когда проявляется как способность отдельных бластомеров дать начало полноценному организму (Гилберт, 1993), так и на стадии бластоцисты, когда лишь определенные клетки личинки способны развиться в новый эмбрион. Следовательно, одним из специфических свойств яйцеклетки млекопитающих следует признать ее потенциальную способность давать начало не одному, а нескольким организмам, но подходы к манипуляциям с эмбриональными клетками должны учитывать особенности каждой стадии развития.

Литература

Бей-Биенко Г.Я. Общая энтомология. М.: Высшая школа. 1980.

Белоусов Л.В. Введение в общую эмбриологию. Изд. МГУ. 1980.

Гилберт С. Биология развития. Т.1. М.: Мир. 1993

Гилберт С.Ф., Опиц Д.М., Рэф Р.А. Новый синтез эволюционной биологии и биологии развития//Онтогенез. Т. 28. С.325-343. 1997.

Дабагян Н.В. Занятия малого практикума по эмбриологии на биофаке. Изд. МГУ. 1977.

Захваткин А.А. Сравнительная эмбриология низших беспозвоночных. М.: Сов. наука. 1949.

Захваткин Ю.А. Эмбриология насекомых. М.: Высшая школа. 1975.

Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб., 1995

Пэттен Б.М. Эмбриология человека. М.: Медгиз. 1959.

Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины. Биомедицина.2005. № 1. С. 5-16

Курило Л.Ф. Некоторые этические вопросы технологии эмбриональных стволовых клеток // Проблемы репродукции. 2000. № 3. С. 1-6.

*Манк М.*В Биология млекопитающих / Пер. с англ. 1990. Эмбрионы, гены и их эволюция. М.: Мир". 1986.

Сахарова Н.Ю. Млекопитающие: эмбрион в личинке // Природа. № 5. 2004. С.28–38.

Сахарова Н.Ю., Чайлахян Л.М. Некоторые теоретические вопросы клонирования в свете сравнительного анализа раннего развития млекопитающих // Докл. Акад. наук РФ. 2003. Т.393. № 3. С.426-429.

Токин Б.П. Общая эмбриология. М.: Высшая школа.1987.

Светлов П.Г. Факты и теория параллелизма. Конф., посв. пам. проф. В.Н.Беклемишева. Москва, 1965.

Чайковский Ю.В. Эволюция. М.: Центр систематических исследований , 2003

Alexandre H. A history of mammalian embryological research // Int. J. Dev. Biol. 2001. V. 45. P. 457-467.

Gardner R.L., Davies T.J. The basis and significance of pre-pattering in mammals // Phylos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2003. V. 358. P. 1331-8.

Lyon M.F., Rastan S. Parental source of chromosomal imprinting and its relevance for Xchromosoma inactivation // Differentiation. V. 26. P. 63-67.1984.

Markert S.L., Petters R.M. Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells // Science. V. 202. P. 56-58. 1978.

McGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both maternal and parental genomes // Cell. V. 37. P. 179-183. 1984.

Mintz B. Gene expression in allophenic mice// Control mechanisms in the expression of cellular phenotypes. P.15-43./ Ed. Padykula H.A. Acad.Press. N-Y.,L. 1970.

Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder R. Derivation of completely cell culture derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P.8424-8428.

Pagel M. Mother and father in surprise genetic agreement// Nature. V.397. P.19-20. 1999.

Piotrowska K., Zernicka-Goetz M. Early patternimg of the mouse embryo - contributions of sperm and egg// Development. 2002. V.129.№24. P.5803-13.

Surani M.A.H., Barton S.M. Development of gynogenetic eggs in the mouse:Implications for parthenogenetic embryos // Science. V. 222. P. 1034-1036. 1983.

Tarkowski A.K., Ozdenski W. Czolowska R. How many blastomeres of the 4-cell embryo contribute cells to the mouse body // Int. J. Dev. Biol. 2001 V. 45. P. 811-816.

Tesar P.J. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cells lines from preblastocyst mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005. V. 105.P. 8239-8244.

Zernicka-Goetz M. Fertile offspring derived from mammalian eggs lacking either animal or vegetal poles // Development. 1998. V. 125. No. 23. P. 4803-8.

THE PROBLEMS OF BIOTECHNOLOGY IN THE CONTENT OF COMPARATIVE EMBRYOLOGY ANALYSIS OF EARLY MAMMALIAN DEVELOPMENT

N.Yu. Sakharova

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Mammalian oocyte reversion to oligolethitality defines differences between the early development of mammals and other Amniota. The absense of definite egg polarization, full asynchronic cleavage, cross-position of two first blastomere descendants, interphase movement of blastomeres and their prolonged totipotency – all those allow us to compare the earliest period of mammalian development with the cleavage period of lower Metazoa, Hydrozoa (Mechnikov, 1886). In both groups of animals the cleavage results in formation of morula, which in Hydrozoa transforms into planula.It leaves fertilisation envelope and becomes the free-living larva. In mammals the morula turns into blastocyst, which also leaves the envelope (z. pellucida) and is implanted into uterus. It allows us to consider the blastocyst as a “parasite” larva of mammals, whose very specialized mechanisms are perfectly adopted to receive nourishment from mother’s organism. The analysis of published date (Mintz, 1970, Markert, Petters, 1978 and others) enables us to think that the subsequent development of a new embryo is provided by embryonic cells that are in larva body and that is obviously analogous to polyembryony and pedogenesis being very characteristic for the development of some high insects. Indirect support for this analogy is the existence of chromosomal or genetic imprinting only in two groups of animals – mammals and some of high insects, particularly for Miastor. In the living cycle of this insect there is the phase of larva using the process of pedogenesis for reproduction.

Comparison of early development of mammals, lower Metazoa and high insect permit us to focus attention on high potential ability of mammalian egg cells to form not one but several organisms using polyembryonal principle both on early stages of cleavage and on the blastocyst stage.

Key words: oocyte, asynchronic cleavage, blastomeres

Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах

Г.Д. Капанадзе

Научный центр биомедициеских технологий РАМН, Москва

Рассмотрены различные аспекты использования лабораторных мини-свиней отечественных и зарубежных популяций в биомедицинских экспериментах и возможности экстраполяции на человека данных, полученных на этих животных. Лабораторные мини-свиньи похожи на человека по многим морфофизиологическим показателям и являются прекрасными объектами для моделирования на них различных заболевании. Мини-свиньи используются для изучения сердечно-сосудистых заболевании, атеросклероза сосудов головного мозга, индуцированного расстройства сердца, инфарктов, язвы желудка, алкоголизма, физиологии стресса, ожирения, последствий радиоактивного облучения, порфирии, кожных и других заболевании.

Ключевые слова: лабораторная мини-свинья, эксперимент.

Свиньи во многих развитых странах уже давно привлекают внимание в качестве биологической модели [19]. В мировой практике используют специально выведенные лабораторные породы мини-свиней (в США – хормельские, хенфордские, питманмурские, небрасские, белтсвиллские белые, в ФРГ – геттингенские, мини-Леве, в Японии – омини, в России – светлогорские и минисибс). Выводить лабораторных мини-свиней начали в институте Хормеля университета штата Миннесота в 1949 г. Эти работы продолжаются и по сей день. Недавно стало известно о создании томпсоновских миниатюрных инбредных свиней (штат Иллинойс), которые используются в исследованиях специального центра по атеросклерозу при Чикагском университете [20]. Широко применяются в экспериментах и аборигенные породы мини-свиней - в США - юкатанские и американо-эссекские, во Франции -корсиканские, в странах Юго-Восточной Азии - кангарусские, китайские Ли санг и ассамские. В Европе самая крупная ферма мини-свиней находится в Германии, где разводится геттингенская порода со средней живой массой 37,16 кг в годовалом возрасте.

В Российской Федерации имеются две популяции миниатюрных свиней. Сотрудниками Института цитологии и генетики СО АН СССР (Новосибирск) с 1969 по 1980 годы под руководством профессора В.Н.Тихонова путем отдаленной гибридизации и сложным воспроизводительным скрещиванием домашних и диких свиней европейского и азиатского происхождения создана оригинальная форма мини-свиней «Минисибс». К 1974 году в Научно-исследовательской лаборатории экспериментальной биомоделей АМН СССР (ныне ГУ Научный центр биомедицинских технологии РАМН – далее НЦБМТ РАМН) в результате скрещивания минисибсов с геттингнской породой свиней была создана светлогорская популяция миниатюрных свиней – MSY. Символ Y означает принадлежность их к НЦБМТ РАМН. Минисвиньи светлогорской популяции характеризуются хорошими материнскими качествами, мирным нравом. Многоплодие в среднем составляет 7 поросят на опорос. Преобладающая масть – белая. Свиньи хорошо приспособлены к безвыгульному содержанию н а ограниченном рационе в условиях виварием. На мини-свиньях светлогорской популяции проводилось и про-

водится множество биологических, медицинских и ветеринарных экспериментов. В настоящее время продолжаются работы по стандартизации существующей популяции, по выведению животных с меньшей живой массой. Более подробную информацию о биологических особенностях уникальных светлогорских миниатюрных свиней и их использованию в исследованиях постараемся предоставить в последующих номерах журнала «Биомедицина», а сейчас более подробно остановимся на различных аспектах использования миниатюрных свиней в медицинских и биологических экспериментах.

Свиньи в экспериментах использовались еще со времен Гиппократа [3]. Первые исследователи считали, что «свинья является идеальным объектом для изучения приспособительного поведения». С другой стороны, в условиях отсутствия наркоза трудно было проводить эксперимент на объекте массой 200-380 кг. И.П. Павлов (как процитировано Маркузе и Муром) после месяца бесполезных попыток получить желудочный сок у громкоголосой свиньи заявил: «Я долго буду держаться твердого убеждения, что свинья – самое нервное из животных. Все свиньи истеричны». Действительно, Маркузе и Мур описали нервное поведение у свиноматки живой массой 180 кг, однако они смогли успокоить ее посредством почесывания. Интересная особенность вспышек раздражения у свиньи состоит в том, что, несмотря на громкий визг и повышенную активность, частота сердцебиений не повышается.

Свинья сходна с человеком по особенностям зубной системы, морфологии и физиологии почек, строения глаза и остроте зрения, морфологии и физиологии кожи, анатомии и физиологии сердечно-сосудистой системы, анатомии и физиологии пищеварения. Свинья также является идеальным модельным животным для иммунологических исследований. Плацента свиньи практически не допускает переноса антител из кровотока матери к развивающемуся плоду, поэтому новорожденный поросенок лишен иммунных антител до получения первой дозы молозива. Это явление использовали для изучения всасывания антител, получения активных антител, а также для исследования этапов развития физиологии пищеварения. Они использовались для физиологических экспериментов (в том числе для изучения кормления при дефиците в рационе белка) и в радиобиологии [35].

Применение мини-свиней для изучения некоторых распространенных заболеваний человека

Сердечно-сосудистые заболевания. Система кровообращения и сердце свиньи сходны с таковыми у человека. Свинья является наиболее подходящей моделью для экспериментального изучения атеросклероза человека, так как она восприимчива к нему в обычных условиях содержания, имеет наиболее подходящие для лабораторных манипуляции параметры.

Исследования на свиньях в условиях длительных экспериментов [4] показали, что у свиньи в сердце и в кровеносных сосудах образуются атеросклеротические бляшки, сходные с таковыми у человека. В опытах у свиней трех возрастных групп наблюдали атеросклеротические поражения, морфологически идентичные соответствующим стадиям атеросклероза у людей, при этом было сделано заключение о том, что свинья может заменить низших приматов, используемых для изучения этого заболевания. Гибель 34% свиней в контрольной группе при постановке опыта по изучению долгожительства исследователи объясняли острой сердечной и респираторной недостаточностью. Полученные данные явились стимулом к использованию свиньи в качестве модели в биологических и медицинских исследованиях в целях профилактики атеросклероза у человека. Гистологические исследо-

вания показали, что атеросклеротические нарушения у двух данных видов не идентичны, но существующее сходство достаточно для того, чтобы в подобных исследованиях предпочесть проведение длительных экспериментов на свинье, а не на других видах млекопитающих. Частота атеросклеротические нарушений у миниатюрных свиней непостоянна и зависит, как и тяжесть заболевания, от их породы.

В исследовании на свиньях холестерин сыворотки крови не увеличивался при скармливании в течение 3-9 мес. рациона с добавкой масла или маргарина по сравнению с группой животных на рационе с низким содержанием жиров. Однако свиньи, получавшие масло, имели в три с половиной раза больше поражений аорты, чем в контрольной группе. У свиней, получавших маргарин, как и в контрольной группе, картина заболевания была одинаковой. Объяснение таких различий между животными опытных и контрольных групп усложняется к тому же тем, что последние в различных лабораториях были обеспечены неодинаковым кормлением.

В непродолжительных опытах на поросятах-отъемышах неодинакового генетического фона было показано, что поросята, которые содержались на рационе с высоким уровнем насыщенных жиров, были больше подвержены атеросклерозу вследствие избыточного потребления холестерина. В опытах наблюдали более быстрое развитие коронарного атеросклероза у свиней, помещенных в клетки поодиночке после их содержания в группах, что предполагает психологическую реакцию на нарушение сложившихся взаимоотношении в период совместного содержания.

Роуселл с соавторами дали описание гемостатических факторов при атерогенезе у свиней. Совпадающая топография и картина атеросклеретических нарушений у человека и животных, включая атерому, главным образом вокруг разветвлений и устьев сосудов наводит на мысль о том, что значение имеет гидравлика кровотока. Препараты из эндотелиальных вытяжек кровеносных сосудов 2-недельных поросят вызывали отложение кровяных пластинок около сосудистых устьев и разветвлений. Наличие на этих участках кровяных пластинок предшествовало атерогенным поражениям и, как предполагают, является причинным фактором, обусловливающим выделение веществ, влияющих на проницаемость сосудов и образование тромбов.

Исследования на мини-свиньях MSY, содержащихся в лаборатории биомедицины НЦБМТ РАМН, показали, что у этих животных атеросклероз моделировался в течение 6-12 месяцев при сочетании в рационе сливочного масла или маргарина с холестерином на фоне регулярного стресса. У подопытных свиней в аорте и коронарных сосудах обнаруживались атеросклеротические бляшки, а электрофизиологические исследования выявили реакции на различные раздражители и введение лекарственных веществ, сходные с таковыми у человека.

На мини-свиньях отечественной селекции были изучены возрастные особенности биохимических показателей липидного обмена сыворотки крови с целью выявления оптимальных сроков для постановки эксперимента по моделированию атеросклероза.

Наиболее благоприятным сроком для постановки опытов по моделированию экспериментального атеросклероза можно считать 2-месячный возраст, а также возраст 12-18 месяцев [16].

Атеросклероз сосудов мозга. Артериосклероз головного мозга наблюдался у свиней старше 8 лет. В группе, состоявшей из 50 старых свиней, обнаружены стенозные нарушения экстрацеребральных участков внутричерепных артерий. У этих свиней внутричерепные артерии не имели атеросклеротических изменений, но в них наиболее часто обнаруживали волокнистые

артериосклеротические утолщения, затрагивающие один или все слои стенки артерии. В связи с тем, что у свиней в возрасте до 8 лет ишемический некроз не наблюдался, высказано предположение о наличии тесной связи инфаркта мозга с артериосклерозом мозга.

У свиней светлогорской популяции, наркотизированных внутрибрюшным введением тропентала натрия, изучали чувствительность острой ишемии головного мозга, вызывая ее рассечением кожи, выделением с последующей перевязкой правой и левой сонной артерией. Полученные данные позволяют характеризовать миниатюрных свиней как животных, легко переносящих выключение обеих общих сонных артерий, в отличие от лабораторных грызунов. При этом у них, как и у людей при острых нарушениях мозгового кровообращения, возникают проявления висцеральной патологии – нарушается функциональное состояние печени. Для изучения патологии мозгового кровообращения и нейродистрофических изменении во внутренних органах мини-свиньи являются перспективными лабораторными животными [4].

Индуцированные расстройства сердца и инфаркты. Несколько групп исследователей изучали физиологические последствия частичной или полной закупорки различных артерий у свиньи. Частичная закупорка главной легочной артерии ведет к прогрессирующему застойному расстройству сердца, сопровождающемуся клиническими симптомами. Постепенная закупорка основных коронарных артерий в другом случае усиливала кровообращение в параллельно проходящих сосудах у нормальных свиней. Такие вспомогательные пути, повидимому, открываются селективно в тех основных сосудах, в которых затрудняется проходимость. Инфаркты, связанные с частичной закупоркой левой огибающей артерии, явились причиной падежа многих свиней в таких опытах. Для определения локализации инфарктов в стенке сердца проводили радиоизотопное исследование, которое оказалось в значительной мере успешным и согласовывалось с гистологической оценкой [37]. На лабораторных мини-свиньях изучали микроциркуляцию крови в разных отделах сердца до и после трансплантации сердца в эксперименте [5].

Язва желудка. Исследования показали необычайно высокую частоту язвы пищевода и желудка у свиней. Имеется обзор по проблеме возникновения язвенных заболеваний желудка у свиней, обобщенный по данным из 12 стран; в этих 12 обследованиях частота варьировала от 5 до 53%. Сообщалось о сходных результатах, полученных в США. Изучаемый симптомокомплекс привлекает внимание исследователей отчасти как результат существования связи между частотой заболевания и типом рациона, а также в связи с тем, что этиология и патогенез, по-видимому, сходны с этой болезнью у человека. Язвы желудка, сходные с теми, которые бывают при несоответствующем питании, вызывали введением гистамина. Такое состояние также вызывали экспериментально при скармливании соответствующего рациона. На частоту влияют тип скармливаемых гранул и способ обработки корма. Например, овес, очевидно, не вызывает язвенных поражений желудка, тогда как желатинированная кукуруза обусловливает более высокую частоту заболевания, чем кукуруза, не подвергавшаяся тепловой обработке.

У мини-свиней объем секреции желудочной кислоты и концентрация гастрина в сыворотке крови сравнимы с таковыми у человека. Высокая корреляция между максимальной продукцией желудочной кислоты и массой слизистой оболочки дна желудка наблюдалась при увеличении максимального объема секрета в ходе» роста животного, что, вероятно, было обусловлено нарастанием массы обкладочных

клеток. Выработка желудочной кислоты у миниатюрных свиней в ответ на введение гистамина достигала 1,25 мкг/кг массы тела в час при 1 мкг гистамина на килограмм массы, который вводился посредством постоянного внутривенного катетера. Изменение секреции кислоты явилось функцией увеличения концентрации кислоты и объема секреции.

Алкоголизм. На человеческий и свиной организмы одинаково воздействуют многие биологические и медицинские препараты, в том числе наркотические, антиалкогольные и радиоактивные вещества. Было показано, что молодняк миниатюрных свиней пригоден для изучения алкоголизма, так как поросята проявляют предпочтение к алкоголю и без принуждения потребляют большое количество этанола. У свиней, получавших нормированный рацион с 16%-ным содержанием белка, свободное потребление этанола достигало 40% от всей энергетической потребности. Обмен углеводов у полновозрастных миниатюрных свиней изменялся при введении этанола путем внутрижелудочных вливаний. Эти изменения отражались на соотношении лактата к пирувату в плазме, а в сыворотке крови — на содержании триглицеридов и глюкозы крови. Пируват плазмы снижался на 20%, а лактат увеличивался на 30% через 1 ч после вливания этанола. Вливание этанола в дозе 1 г/кг массы тела приводило к его содержанию в плазме до 160 мг этанол а/100 мл плазмы через 2,5 ч после введения.

Исследования, проведенные в НЦБМТ РАМН, показали, что мини-свиньи являются прекрасными объектами для моделирования алкоголизма. Уже через 1,5-2 часа после потребления свиньями 25% этанола средняя его концентрация в плазме крови составила 100,7-111,6 мг/%. У контрольных животных, не потреблявших этанол, она составляет 1,9-2,1 мг/%. Морфологическая оценка внутренних органов подопытных животных показала, что через 2-3 года после потребления этанола как у взрослых животных, так и у их потомства обнаруживаются патологические изменения различной степени, характеризующиеся изменением мембранных систем клеток с преимущественным поражением митохондрии, накоплением в клетках липидных гранул, развитием тотального или парциального некроза клеток. Эти исследования были проведены на животных светлогорской популяции. На мини-свиньях моделируются главные черты этого заболевания, свойственные человеку – добровольное потребление значительных количеств алкоголя и четкое разделение отдельных стадии заболевания [10].

Физиология стресса. Аналог наблюдаемой у стрессчувствительных свиней злокачественной гипотермии, очевидно, существует и у человека. Пораженные животные проявляют беспокойство, у них наблюдаются чрезмерное развитие мышечной ткани, более крупные мышечные волокна и большая доля красных волокон, хвостовой тремор, высокое содержание киназы, больше сукцинатдегидрогеназы, повышенный уровень адренокортикотропного гормона в крови или пониженное отношение этого гормона к кортизону, высокое содержание в мышцах глюкозо-6-фосфата и пониженное поглощение кислорода митохондриями. Было установлено, что тепловой стресс связан с большим повышением температуры тела у стрессчувствительных свиней по сравнению с резистентными.

Сведения, полученные в опытах на свиньях, могут иметь большое значение для характеристики и правильного лечения этого синдрома у человека.

Физическая нагрузка при стрессе вызывает у человека анаболическое воздействие на белок, влияет на выделение кальция и метаболизм в костных тканях. Данные, полученные на экспериментальных животных, показывают, что физическая нагрузка усиливает, тогда, как ограниче-

ние подвижности в обменной камере снижает ретенцию кальция. Отрицательный баланс кальция у астронавтов на орбите, как и у больных, прикованных к постели, поднимает важные проблемы минерального обмена при ограниченной подвижности. Тренинг половозрелых свиней на механически передвигаемой дорожке способствует сохранению постоянства состава неорганической части костяка и коалогеновых компонентов. Пригодность свиньи для моделирования стресса, вызванного физической нагрузкой у человека, является очевидной.

Ожирение. Свиньи являются идеальной моделью при изучении ожирения у человека. Склонность к ожирению у свиней объясняется значительно большей эффективностью превращения энергии корма в жир организма, чем у всех остальных домашних животных. Выяснилось, что в организме свиней, селекционируемых по толщине сала на спине, освобождение неэстерифицированных жирных кислот из жировых депо, индуцированное адреналином и гипофизарным липотропином было меньшим, чем у более тощих свиней. Имеется сообщение [31] о метаболических нарушениях, связанных с наследственностью у сальных свиней. Содержание липогенетических ферментов в жировой ткани было увеличено в несколько раз, хотя активность тех же самых ферментов в печени не отличалась от обычной. В состав этих ферментов жировой ткани входила глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа и малик-фермент. Липогенез и активность ферментов у свиней детально изучали многие исследователи. Высказано предположение, что скорость липогенеза более тесно коррелирует с активностью ацетил-Ко-А-карбоксилазы, чем с любыми другими проверенными ферментами. При этом отмечено, что изменения в составе тела, являющиеся результатом отбора, связаны в большей мере с возрастными изменениями, влияющими на жирообразующую способность, чем с различиями в жирообразующей активности. Установлено, что максимум освобождения жирных кислот и глицерина, индуцированного с помощью адреналина, возрастает в четыре раза между 12 часами после родов и вторыми сутками, остается повышенным в течение нескольких недель, а затем падает. У потомства свиней, не подвергавшихся селекции, способность к синтезу жирных кислот была низкой, но быстро возрастала после отъема поросят и дальнейшего выращивания на рационе с высоким содержанием углеводов. Скорость синтеза увеличивалась до 67-дневного возраста, а затем постепенно снижалась до окончания 6-месячного периода наблюдения. Изменение активности фермента, расщепляющего лимонную кислоту и малик-фермент, проходило параллельно изменениям синтеза жирных кислот, однако данных по индивидуальным различиям в возрастных изменениях способности к синтезу жирных кислот получено не было.

Ответные реакции жирных кислот в жировом депо свиней на скармливание смеси жирных кислот в рационе хорошо изучены. Полученные данные согласуются с результатами исследований на грудных детях. Доказано, что состав жирных кислот жировой ткани отражает состав жирных кислот потребленных питательных веществ. Было установлено, что триглицериды, включающие жирные кислоты со средней длиной углеводородной цепи, приводили к более низкой скорости синтеза жирных кислот, чем в жировой ткани контрольных свиней, которые не получали в своем рационе смесы жирных кислот. Такие триглицериды в сыворотке крови повышали содержание кетонов и незначительно понижали уровень глюкозы, что, вероятно, обусловлено усиленным высвобождением инсулина в ответ на возрастание уровня кетонов в крови. У ребенка при рождении больше жира, чем у

поросенка. Полагают, что жир, накопленный в утробный период, образовался путем липогенеза из углеводов [17]. Отмечено, что новорожденный поросенок имеет сходство с младенцем малой массы по минимальному (1%) содержанию жира. На этом основании предложено использовать поросенка в качестве модели при изучении питания преждевременно родившихся детей.

Реакция жировой ткани свиньи на инсулин изучалась во многих опытах. Исследователи пришли к выводу, что у свиней с признаками диабета, вызванного аллоксаном, использование глюкозы жировой тканью лишь слегка замедляется, и предположили, что соотношение инсулин – углеводы у свиньи иное, чем у других видов. Увеличение скорости исчезновения введенной глюкозы в течение первого дня жизни у поросенка зависело больше от всасывания потребленного корма, чем от возраста; инсулиновый ответ на глюкозную нагрузку с возрастом улучшается, но остается зависимым от потребляемого корма.

Питание. В медицинских исследованиях больше всего поросят используют при изучении вопросов питания. Физиология пищеварения, потребность в питательных веществах у новорожденных поросят и детей имеют значительное сходство, поэтому рационы, полноценные для новорожденных поросят, являются полноценными и для новорожденных детей. Поросята используются для составления и проверки рецептов для питания детей. Новорожденные поросята хорошо приспосабливаются к жидкому кормлению, которое получают из бутылки или чашки, начиная с первого дня постнатальной жизни; их можно также приучить к выживанию на сухом рационе в возрасте нескольких дней. Разработаны автоматические приспособления для кормления поросят жидким кормом. Опубликованы рационы и методики успешного выращивания новорожденных поросят на сухом корме после того, как они 48 ч получали молозиво и в течение суток – коровье молоко. Кормление вволю сухим кормом вызывало менее частые поносы с более легким поражением, чем кормление жидкими рационами. Особенно ценен поросенок как модель для изучения протеино-углеводного голодания, так как у него образуются биохимические и морфологические изменения, схожие с квашиоркором и общим истощением у детей, в рационе которых имелся протеиновый или протеиново-углеводный дефицит.

Исследование на гнотобиотах. Свиней-гнотобиотов можно применять в целях приготовления тканевых культур, изучения патогенеза микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей или кишечного тракта, изучения некоторых аспектов респираторных болезней у человека, приготовления стандартных моноспецифических сывороток, а так же для изучения эффекта изменения кишечной флоры. Методы получения поросят-гнотобиотов основаны на факте непроницаемости здоровой интактной плаценты для большинства микроорганизмов. Методы гистерэктомии и содержания поросят в безмикробной среде опубликованы [2].

Сотрудниками НИЛ экспериментально-биологических моделей АМН СССР (ныне НЦМБТ РАМН) впервые в нашей стране были отработаны методические приемы получения и выращивания безантигенных поросят.

Для обеспечения безмикробных условий при получении и выращивании безантигенных поросят были использованы гнотобиологические изоляторы. Для операции отбирались свиноматки на 113 день беременности. Операции делали методом гистеротомии в условиях внутривенного наркоза [12].

Гистологическими и гистохимическими методами изучались печень, сердце, кишечник, селезенку. Было выявлено содержание рибонуклепротеидов и активность

ферментов: сукцинатдегидрогеназы, кислой фосфотазы и неспецифической эстеразы. Было обнаружено подавление функций желудочно-кишечного тракта, уменьшение массы мезентериальных лимфатических узлов, пейеровых бляшек и снижение абсолютного веса селезенки, увеличение в 3-4 раза объема желчного пузыря у мини поросят и истончение его стенки. Безмикробные мини-поросята быстро росли и превышали в весе обычных животных, что, возможно, обусловлено повышенной активностью окислительных процессов в тканях.

Дерматология. Кожа свиньи во многих отношениях сходна с кожей человека. Использование свиньи как модели применительно к хирургии включает пересадку кожи. Реакция эпидермиса на облучение частицами низкой энергии изучалась с целью количественного определения зависимости «доза-эффект». В опытах *in vitro* [18] кожу свиньи использовали для изучения биосинтеза белка. Было подтверждено предположение о независимом действии простагландинов и эпинефрина на аденилнил-циклазную систему эпидермиса свиньи и человека в норме и при псориазе [4].

У черных миниатюрных свиней линии Синклер спонтанно и с очень высокой частотой (50%) возникали меланомы. Эти опухоли похожи на некоторые типы пигментных опухолей человека – от доброкачественной синаптической зернистости до причудливой метастатической меланомы. Может происходить регрессия опухоли (возвращение в прежнее состояние), что связано с общей депигментацией.

Аналогичность строения кожи свиньи и человека позволяет использовать эту модель не только для изучения действия лечебных или косметических мазей, но и важнейших проблем радиационной токсикологии и биологической защиты от радиации.

Порфирия. Свинья служит наиболее приемлемой моделью для изучения порфирии [23]. Для проявления порфирии у поросят-отъемышей применяли производное коллидина, даваемое через рот. Такая экспериментально индуцированная порфирия была сходна с врожденной эритропоэтической протопорфирией человека в некоторых отношениях, включая типы светочувствительности и печеночно-желчные изменения у человека и свиньи.

Тератология. Высказано мнение, что при изучении токсичности лекарственных средств следует в дальнейшем использовать свинью [25]. Свинью, как модель, также использовали при изучении веществ, загрязняющих воздух, веществ, воздействующих на здоровье животных и человека. Во многих опытах на свиньях изучали токсичность целого ряда соединений, содержащих каменноугольные смолы, арсаниловую кислоту ртуть, свинец, диэлдрин и афлатоксин [38].

Радиоизотопы и облучение. Известны эксперименты по изучению закономерности развития лучевого поражения у поросят при тотальном гамма-облучении. Проведены различные эксперименты с использованием разных видов излучения [7].

Действие радиоизотопов на обмен веществ изучали, используя в качестве модели свинью. Проанализированы причины падежа и клинических симптомов у свиней, подвергавшихся общему гамма-облучению при распаде кобальта-60. Наиболее часто падеж наблюдался через две недели после облучения и был обусловлен главным образом геморрагией. В исследовании более точно установлена зависимость между дозой ^{60}Co и падежом в течение месяца. Имеется сообщение [21], что реакция свиньи на облучение аналогична таковой у обезьяны. При дозах от 2400 до 5000 рад большая часть свиней поражалась сразу, но стрессовое состояние продолжалось не более 5 мин. При более высоких дозах облучения большинство животных впадало в коматозное состояние на 15-20 мин. Многие из облученных животных сразу

после воздействия радиации надолго впадали в состояние тяжелого стресса при дозах 13 200 рад или больше.

Сообщалось о возможном влиянии отравления стронцием-90 на размножение, а также на распределение в костяке. Миниатюрных свиней также использовали в целях обнаружения и определения сравнительной степени нейтрализации ряда радиоизотопов в живых организмах [22]. Исследования биологического действия облучения на свиньях в качестве моделей расширяются.

Обучаемость. Свиней можно легко дрессировать, используя в качестве подкрепления наиболее предпочитаемый корм. Их легко приучить к выбору надлежащей двери из множества дверей (например, вторую дверь слева), но, по-видимому, трудно обучить выбирать среднюю дверь в ряду, состоящем более чем из трех дверей.

У свиней оказалось возможным выработать классические условные рефлексы посредством сочетания условного раздражителя с вызывающим отрицательную реакцию безусловным раздражителем, подобно электрическому шоку или с положительным, например, поощряя действие предпочитаемым кормом. Имеется сообщение [28], что свиньи более терпимы к неблагоприятным условиям окружающей среды, чем кролики или мелкие жвачные. Наиболее быстро условный рефлекс закрепляется в том случае, если интервал между условным и безусловным раздражителями будет 2,8 с. Свиней можно обучить не допускать шокового воздействия, а не просто ускользать от него. Интервалы между опытами способствуют улучшению обучаемости свиней. У свиней имеются генетические различия по способности уклоняться от возможного воздействия и ориентации в лабиринте [29]. Корреляция между обучаемостью в водном лабиринте и уклонением от шока является низкой [24]. Способность к уклонению от шока снижалась с возрастом при приучении в период от 21 до 150-го дня. Недостаточное питание в раннем возрасте сказывалось на способности обучения к уклонению даже после того, как свиней некоторое время до выработки условного рефлекса содержали на полноценном рационе. Попытки связывать измененное поведение при обучении с биохимией мозга был сравнительно безуспешными, хотя у сильно истощенных поросят и свиней при последующем восстановлении упитанности изменялась активность холинэстеразы мозга. У свиней легко вырабатывается условный рефлекс нажимать рылом кнопку или клавишу для получения корма или тепла под нагревателем, но не на повышение сенсорной стимуляции с помощью света или имитации визга свиней.

Другие исследования. В эксперименте на свиньях в определенных условиях была подтверждена принципиальная возможность лапароскопии в невесомости. Свиньи часто применяются в экспериментах при оценке различных фармакологических средств [26].

Существует заболевание, поражающее в основном недоношенных и ослабленных детей – пневмоцистоз. Поросята светлогорской популяции были использованы для изучения данного заболевания в качестве биомоделей. Заболевали поросята в возрасте от 2 недель до 8 месяцев. Болезнь протекала с явлениями пневмонии. Исследования были направлены на изучение характера поражения и отработку ускоренных методов диагностики этого заболевания. Культивирование *Pn. Carinii* в культуре клеток позволило выявить локализацию возбудителя в цитоплазме клеток.

При определении смертельной дозы местных анестетиков были использованы свиньи [34]. Нехелес и Хаас в экспериментах на гвинейских свиньях с лигированными мочеточниками продемонстрировали, что однократное или повторное (после эффективного дренирования) введение физиологического раствора NaCl уменьша-

ет симптомы уремии и снижает уровень азота мочевины крови [36].

Гипертермическая изолированная перфузия печени проводилась в эксперименте на свиньях через печеночную артерию и портальную вену [33]. Мини-свиньи использовались при решении проблем диссекции паренхимы печени [1].

На мини-свиньях отработаны многие методики в области медицины, фармакологии, вирусологии, бактериологии, иммунологии, иммуногенетики и т.д. Но свиньи оказались идеальным объектом и при решении проблем трансплантации органов, о чем есть убедительные сообщения в зарубежной и отечественной печати. Например, в Израиле стали применять сердечные клапаны свиньи при кардиохирургических операциях еще в начале 80-х годов.

Особый интерес с позиций практики представляет ксенотрансплантация органов «животное-человек». И здесь главным претендентом в качестве донора органов является свинья. Судя по литературным данным, потребность в органах очень велика, и удовлетворить ее только за счет людей-доноров удается далеко не всегда. Например, в такой относительно маленькой стране, как Англия, проводится самое большое число трансплантаций сердца – до 12 тысяч в год.

Ксенотрансплантация является актуальнейшей проблемой, и во многих странах мира усиленно проводятся исследования по преодолению порога несовместимости пересаживаемых органов и реакции иммунной системы. Исследователи считают мини-свиней потенциальным поставщиком альтернативных органов, так как внутренние органы свиньи и человека очень похожи. Главной проблемой при пересадке является то, что человеческая иммунная система отторгает чужеродные органы. Главную роль в процессе отторжения играет ген альфа-1,3-галактосилтрансферасе или GGTA1, производящий молекулы сахара. При пересадке чужеродного органа в организм человеческие антитела прикрепляются к молекулам сахара, расположенным на поверхности свиных клеток и убивают этот орган. Если устранить этот ген, процесс отторжения не начнется. Другое препятствие для ксенотрансплантаций создают безвредные для самых свиней ретровирусы.

Судя по последним сообщениям, в ближайшее время эта проблема будет все же решена. Первые опыты по пересадке почек трансгенных свиней обезьянам показали обнадеживающие результаты - почки нормально функционировали в организме обезьяны более двух месяцев. Это указывает на реальную возможность пересадки почек, сердец и других органов от свиней человеку. В связи с этим британское и израильское правительства вскоре намерены разрешить пересадку сердец и почек от трансгенных свиней человеку. Ксенотрансплантация, которая до недавнего времени рассматривалась как нереальная альтернатива донорству человеческих органов, сейчас провозглашается реальной возможностью.

В заключение следует отметить, что это далеко не полный перечень возможностей использования в медико-биологических исследованиях такого не совсем традиционного объекта, как миниатюрная свинья. Этот вид лабораторного животного может быть прекрасной моделью для решения большого спектра важных исследовательских задач в самых различных областях медицины и биологии.

В России в постперестроечный период мини-свинья практически не была задействована в решении научных проблем отечественной биологии и медицины. Причины этого явления понятны. В ближайшем будущем мини-свиньи, как биомодели, несомненно, займут достойное место в экспериментах, и тому есть подтверждение – повышенный в последнее время интерес ученых к этому виду лабораторных животных.

Литература

1. *Ашрафов А.А., Байрамов Н.Ю., Меликова М.Д.* Современные методы рассечения паренхимы печени. *Анналы хир. гепатологии. 2000, Т. 5, № 2. С. 54-60.*
2. *Болотских Л.А.* Опыт получения и выращивания безантигенных миниатюрных поросят для медико-биологических исследований. *Вестник АМН СССР, 1981, 5, с. 42-43.*
3. *Гиппократ*. Избранные книги (Перевод с греческого проф. В. И. Руднева.) М., Сварог, 1994.
4. *Западнюк Б.В., Познахирев П.Р.* Проявление острой циркулярной гипоксии головного мозга у миниатюрных свиней и лабораторных грызунов. *Материалы Всесоюзной конференции. Москва. 1980. С 81-82.*
5. *Караськов А.М. и др.* Опыт применения метода лазер-допплер флоуметрии для интраоперационного измерения миокардиального кровотока при трансплантации сердца в эксперименте. *Методология флоуметрии, Выпуск 5, 2001. С. 121-130.*
6. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. Изд-во ВПК, 2005.
7. *Кознова Л.Б. и др.* Некоторые закономерности развития лучевого поражения у поросят при тотальном гамма-облучении. *Материалы Всесоюзной конференции. Москва. 1980. С. 48-49.*
8. *Марданова Г. В.* Ультраструктурные особенности некоторых внутренних органов миниатюрных поросят в норме и при альтернативном воздействии этанола. *Сб. трудов научной конференции «Вопросы экспериментальной и клинической медицины». Куйбышев, 18-222, 1990.*
9. *Марданова Г.В.* Миниатюрная свинья в экспериментальной биологии и в медицине. М. 2004.
10. *Марданова Г.В., Шахламов В.А.* Некоторые ультраструктурные особенности яичников миниатюрных поросят при хронической алкоголизации родительской пары. *Сб. науч. трудов НИИ морфологии человека АМН СССР. «Актуальные вопросы современной гистопатологии», М. 1990. С. 101-102.*
11. *Марданова Г.В.. Осипов В.В., Кострюков Г.Н.* Ультраструктурные особенности миокарда новорожденных мини-свиней при длительной алкоголизации родительской пары. *Бюлл. экспер. биол. и мед., 4, 398-400, 1990.*
12. *Подопригора Г. И. и др.* Гнотобиология на рубеже двух столетии. *Бюлл. экспер. биол. 1978, 2, 1996. № 14, с. 211-248.*
13. *Тихонов Н.Н.* Возрастные особенности липидного обмена у мини-свиней. Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. *Материалы Всесоюзной конференции. Москва. 1980. С. 21-22.*
14. *Adachi K., Yoshikawa K., Halprin K., Levine V.* Prostaglandins and cyclic AMP in epidermis: evidence for the independent action of prostaglandins and adrenaline on the adenyl cyclase system of pig and human epidermis, normal and psoriatic. *Brit. J. Dermatol. 92:381. 1975.*
15. Adipose tissue development in the pig. *In A. Howard, ed., Proceedings of the 1st International Congress on Obesity. London. Newman Publishers Ltd., London, England, p. 109.*
16. *Anderson J. J. B., Milin L., Crackel W. C.* Effect of exercise on mineral and organic bone turnover in swine. *J. Appl. Physiol. 30:810. 1971.*
17. *Baedade J.D., Hirsch J.* Gestational dietary influence on the lipid content of the infant buccal fat pad. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966.*
18. *Brotherton J.* Uptake of amino acids into pig skin in organ culture and the effect of inhibitors of respiration, protein biosynthesis and tyrosinase. *Invest. Dermatol. 52:78. 1969.*
19. *Bustad L.K., McClellan R.O., Burns M.P., eds.* Swine in Biomedical Research. *Pacific Northwest Laboratory, Richland, Wash. 1966.*
20. *Chan K.T., Hsien D.P. H., Lung M.L.* In vitro flatoxin Bl-induced 53 mutations. *Cancer Letters, 199, 1-7, 2003.*
21. *Chaput R.L., Wise D.* Miniature pig incapacitation and performance decrement after mixed gamma—neutron irradiation. *Armed Forces, Radiobiol. Res. Inst. SR69— 12, Bethesda, Md. 1969.*
22. *Chertok R.J., Lake S.* Biological availability of radionuclide produced by the Plowshare Event Schooner I. Body distribution in domestic pigs expoded in the field. II. Retention and excre-

tion rates in peccaries after a single oral dose of debris. III. Accumulation, excretion rates and body distribution in peccaries after daily ingestion of debris. *Health Phus 20:317, 225, 577. 1971.*

23. *Clare N.T., Stephens E.H.* Congenital porphyria in pigs. *Nature 153:252. 1944.*
24. *Davey R.J., Morgan D.P., Kincaid C.M.* The response of swine selected for high and low backfat thickness to a difference in dietary emergy intake. *Anim. Sci. 28:197. 1969.*
25. *Earl F.L., Tegeris A.S., Whitmore G.E., Morison R., Fitzhugh O.G.* The use of swine in drug toxicity studies. *Ann. N. V. Acad. Sci. 111:671. 1964.*
26. *Gillard M, Christophe B., Wels B., Chatelain P., Peck M., Massingham R.* Second generation HI antagonists: potency versus selectivity. *31st Annual Meeting of The European Histamine Research Society. 22-May-2002. Eger. Hungary. 2002.*
27. *Gillard M., Christophe B., Wels B., Peck M., Massingham R., Chatelain P.* HI Antagonists: receptor affinity versus selectivity. *Inflammation Res. 2003. 52. Suppl.l:S49-S50.*
28. *Gregory D.W.* Inguinal hernias in females (hermaphrodite) pigs. *Am. Vet. Med. Ass. 135:624. 1959.*
29. *Lamoreaux W.F., Hutt F.B.* Breed differences in resistance to a deficiency of vitamin Bi in the fowl. *J. Ag. Res. 58:307. 1939.*
30. *Lang H., Nadalin S. et al.* A porcine model for investigation of hyperthermic isolated liver perfusion. *J. Invest. Surg. Nov-Dec; l, l (6): 401-408. 1998.*
31. *Martin R.J., Gobble J.L., Hartsock T.H., Graves H.B., Ziegler J.H.* Characterization of an obese syndrome in the pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143:198. 284. 1973.
32. *McClellan R.O., Kerr M.S., Bustad L.K.* Reproductive performance of female miniature swine ingesting strontium-90 daily. *Nature 197:670. 1963.*
33. *Stuart G. Morrison, Javier J. Dominguez, Philippe Frascarolo, Sebastian Reiz.* A Comparison of the Electrocardiographic Cardiotoxic Effects of Racemic Bupivacaine, Levobupivacaine, and Ropivacaine in Anesthetized Swine. *Anesth. Analg. 2000; 90:1308-1314.*
34. *Swenson M.J. ed.* Dukes Physiology of Domestic Animals. *Cornell University Press, Inhaca, N.Y. 1977.*
35. *Teschner M., Heidland A., Klassen A., Sebekova K., Bahner U.* Georg Ganter – a pioneer of peritoneal dialysis and his tragic academic demise at the hand of the Nazi regime. *J. Nephrol. 2004, May-June;17(3):457-60.*
36. Transgenic Animals. Generation and use. *Harwood Academic Publishers, 1997, ed. L.M. Houdebine.*
37. *Uzoukwu M., Sleight S.D.* Effects of dieldrin in pregnant sows. *Am. Vet. Med. Ass. 160:1641. 1972.*
38. *Vorheis M.W., Sleight S.D., Whitehair C.K.* Toxicity of arsanilic acid in swine as influenced by water intake. *Cornell Vet. 59:3. 1969.*

USING MINIPIGS IN BIOMEDICAL EXPERIMENTS

G.J. Kapanadze

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Some aspects of using domestic and foreign breeds of laboratory minipigs in medical and biological experiments, and possibility of extrapolating experimental data obtained on human beings were investigated in our research. Laboratory minipigs and humans are similar in their morphological and physiological features, so minipigs are appropriate species for studying heart and cardiovascular diseases, stress physiology, alcoholism and so on.

Key words: minipig, experiment.

Биология мохноногих хомячков и их использование в лабораторной практике

А.В. Суров, Н.Ю. Феоктистова

Институт проблем экологии и эволюции им А.Н.Северцова РАН, Москва



Рис. 1. Джунгарский хомячок в зимнем меху

Изложена история описания трех видов мохноногих хомячков – Кэмпбелла (Phodopus campbelli), джунгарского (Ph. sungorus) и Роборовского (Ph. roborovskii), происхождение лабораторных колоний, распространение, биология, в том числе по данным наблюдений в природе, условия содержания и разведения, использование в качестве модельных объектов в научных исследованиях.

Ключевые слова: мохноногие хомячки, Phodopus campbelli, Phodopus sungorus, Phodopus roborovskii.

История открытия мохноногих хомячков

Хомяки вместе с полевками, песчанками, цокорами образуют семейство Cricetidae и представляют собой довольно разношерстную группу (см. статью «*Тайны семейства Cricetidae*» в журнале «Биомедицина» № 1, 2005), хотя у большинства из нас представления о хомяке построены, главным образом, на внешнем виде хомяка обыкновенного, ну может быть еще и сирийского, о которых подробно говорилось в указанной выше статье. Это достаточно крупные для грызуна размеры (с крысу или чуть меньше), большие защечные мешки, в которых переносится корм для запасания, разлапистая небыстрая походка, довольно злобный характер и т.д. Но мало кто знает о колючих, косматых, рыбоядных, хлопковых, лазающих, лесных, кузнечиковых, соневидных, большено-

гих... хомяках. Большая часть из них обитает в Новом Свете, но и среди хомяков Палеарктики большинство видов не укладывается в стандартные рамки «хомякового облика». После сирийского хомяка, одного из самых популярных объектов медицинских исследований, следует отметить группу мохноногих хомячков рода Phodopus, история разведения которых не столь интригующая как сирийского хомяка, но также заслуживает отдельного рассказа. В настоящее время выделяют 3 вида – джунгарский хомячок, хомячок Кэмпбелла и хомячок Роборовского. Это очень симпатичные зверьки похожие на маленькие заводные шарики, снабженные крохотными опушенными лапками и аккуратной головкой с большими блестящими черными глазами (рис 1). В зарубежной литературе их называют *dwarf hamster* – карликовый хомячок из-за небольших размеров (по сравнению с сирийским или обыкновенным хомяком). Хотя научный перевод *p. Phodopus* означает «мохноногий», поскольку отличительной чертой всех представителей рода являются опушенные стопы – приспособление к перемещению по песчаному грунту.

Первым из представителей рода в руки исследователей попал собственно джунгарский хомячок. Его, под названием *Mus sungorus*, описал в 1770 г. знаменитый путешественник, академик Петр Симон Паллас (рис. 2) во время своего путешествия по районам современного Казахстана.

Отметим, что книга «Путешествие по разным местам Российского государства по повелению Санкт-Петербургской Императорской академии наук» вышла в свет, пока сам Паллас еще был в экспедиции (она проходила с 1768 по 1774 гг.). Ученый обрабатывал собранные материалы в зимние месяцы, когда путешествовать было невозможно, и отправлял путевые записи частями в Петербург, где две книги его дневников на немецком языке, снабженные замечательными гравюрами,



Рис. 2. Пётр Симон Паллас

вышли в свет уже в 1770 и 1773 г. [14]. Таким образом, описания многих животных попадали к читателю, можно сказать, «горяченькими», прямо из работающей экспедиции.

Описание джунгарского хомячка, данное Палласом звучит столь красиво, самобытно и верно, что мы решили привести его целиком. Итак, «Мышь Зюнгорская» (*Mus Sungorus*) (как П.С. Паллас именовал ее) видом совсем похожа на хомяка, но величиною меньше земляной мыши. Голова коротенькая, щекастая, усы густые; зубы передние желтые, мешки за щеками превеликие, кои простираются даже до самых плеч. Ушки кругленькие, голенькие. Передние лапки четырехпалые, большой палец маленькой без ногтя. Туловище и ноги коротенькие. Хвост прекороткий, кругловатый. Цвет на спине и голове серый, с черной по спине полосой, бока разноцветные; по ним имеются белые пятна, меж коими проседают к спине темные полоски, из коих первая выходит от ушей и простирается изгибом к лопаткам, вторая треугольная перед ледвями, третья спускается по заду, между ею и проседающей темной полоской находятся также белые пятна. С изподи (с брюшка) весь зверек, равно как и ноги и кончик хвоста белый. Находится любопытное сие животное на холмистых сухих полях в полуденной стране около Иртыша. Нора со многими отнорками, к коим проход длинный простирается под самою земли поверхно-



Рис. 3. Джунгарский хомячок с выводком (Phodopus. sungorus)

стью; но у самечиков оная проще. Рожает в июне по шести и по семи, и молодые выростают скоро. Из норы выходят днем (рис. 3).

Надо заметить, что о джунгарском хомячке Паллас упоминает еще в двух своих трудах: в книге Novae species quadrupedum e glirum ordin (1778) и в главном своем зоологическом произведении Zoographia Rosso-Asiatica, вышедшем в свет в 1811 г. уже после смерти П.С. Палласа. Причем в Zoographia Rosso-Asiatica Паллас относит джунгарского хомячка уже не к мышам, а к хомячкам и называет его *Cricetus songarus*. К уже известному Вам описанию, изложенному куда более кратко, Паллас добавляет, что хомячок «...животное неповоротливое, кусачее». Однако почему Петр Симон Паллас присвоил хомячку такое «имя» *sungorus* (*Mus sungorus*), а затем *Cricetus songarus*? Этот термин является дословным переводом латинского названия вида, происходящего от географического термина Sungoria (в различной, в том числе более поздней, транслитерации *Sungoria, Zungaria, Dzungaria, Djungaria*, в русском варианте *Сунгария, Зунгария, Чжунгария* или *Джунгария*), употреблявшегося, как название территории Ойратского (или Джунгарского) ханства в XVII и первой половине XVIII века. Именно там, на территории Восточного Казахстана, входившей в состав Джунгарии в ее историческом понимании (Энциклопедический словар», 1903), джунгарский хомячок был встречен Палласом и обитает и поныне. Надо отметить, что на территории Джунгарии в ее современном понимании (область на северо-западе, Китая (Географический словарь, 1989; International Geographic Encycl.,1979) джунгарский хомячок не встречается.

Следующим, после джунгарского хомячка был описан хомячок Роборовского (рис. 4).

Описание этого очаровательного зверька было дано К.А. Сатуниным в ежегоднике зоологического музея Академии наук [17]. Сатунин описал этот вид по двум экземплярам, отловленным в июле 1894 и 1895 гг. участниками экспедиции, возглавляемой Всеволодом Ивановичем Роборовским (рис. 5), проходившей с 1893 по 1895 гг. по малоисследованным областям Центральной Азии. Именно К.А. Сатунин дал



Рис. 4. Хомячок Роборовского (Ph. roborovskii)

хомячку видовое название *Cricetulus* («хомячок») *roborovskii*, в честь руководителя экспедиции, в которой был отловлен типовой экземпляр. Надо сказать, что шкурки этих зверьков хранятся в коллекции Зоологического музея в Санкт-Петербурге и доступны специалистам.

Однако на этом история описания хомячка Роборовского не завершилась. Ее продолжил хранитель коллекций млекопитающих Британского музея естественной истории Михаэль Рогерс Олдфилд Томас, зоолог, описавший более 2000 новых видов и подвидов животных. Он просил своих соотечественников, живущих в Китае или путешествующих по этой стране, присылать ему образцы крупных и мелких животных. В результате, много лет подряд он получал млекопитающих из Китая и таким путем создал прекрасную коллекцию китайских видов в музее Естественной истории в Лондоне. Но Томасу всегда хотелось организовать более систематические сборы в такие интересные с зоологической точки зрения странах как Япония, Китай, Монголия и Корея. И вот, в 1904 году Хербранд Артур Рассел, XI герцог Бедфорд, дал Томасу денег на организацию экспедиции в эти страны. Дело в том, что герцог очень сочувственно относился к изучению зоологии и в 1899 году даже возглавлял Британское зоологическое общество. Руководство экспедиции было поручено Малькольму Андерсону. В мае 1908 г., Андерсоном был пойман неизвестный ему вид хомячка. Артур Карл Соверби, один из биологов, участвующих в экспедиции, писал, что Андерсон обнаружил хомячков в песчаных дюнах в пустыне Ордос, и что это были «очаровательные зверушки, которых очень легко держать,



Рис. 5. В.И. Роборовский

так как они от природы практически ручные. У них много забавных привычек и особенностей. Они набивают до отказа свои защечные мешки просом или семенами трав, так что голова увеличивается и пропорции тела становятся очень смешными. Затем, когда к хомячку пристают или беспокоят его, он опорожняет свои мешки с помощью передних лапок. Он очень тщательно умывается, выполняя тщательно продуманные действия с регулярными интервалами, и, будучи пойманным, ведет себя очень послушно, никогда не пытается ни укусить ни вырваться и убежать прочь».

В составе коллекций пойманные зверьки в этом же году был доставлены в Британский музей, где их описал Томас, а типовым экземпляром был выбран взрослый самец, пойманный 8 мая 1908 г. Томас назвал вновь описанный вид очаровательных зверушек в честь жены герцога Бедфлорда – Марии Бедфорд – *Cricetulus betfordiae* [18] * (рис. 6).



Рис. 6. Парадный портрет герцогини Бедфордской

* О герцогине Марии Бедфорд можно написать целую книгу (не исключено, что такая книга уже есть). Это была уникальная женщина – пилот, орнитолог, таксономист. Она начала пилотировать в возрасте 65 лет. Самостоятельно совершила перелеты в Индию, Европу, Южную Африку и погибла в возрасте 71 года во время очередного перелета. Была удостоена ордена British Empire за работы в области радиографии.

История изучение хомячка Кэмпбелла началась с уже упомянутого выше Михаэля Рогерса Олдфилда Томаса. В 1905 году Олдфильд Томас, работая с коллекциями грызунов, присланных из Северо-восточной Монголии, пришел к выводу об отличиях представленных там мохноногих хомячков от экземпляров, принадлежащих к виду *sungorus*. Описывая новый вид, О.Томас присвоил ему название *campbelli* (*Cricetiscus campbelli*) в честь К.У. Кэмпбелла, поймавшего типовой экземпляр на караванном пути из Калгана в Табол на северо-востоке Монголии примерно в 500 км к востоку от Урги (столицы Монголии) [19]. Заспиртованный взрослый самец вновь описанного вида хранится в музее Естественной истории в Лондоне.

Интересно, что в коллекции Зоологического музея Санкт-Петербуга хранятся хомячки Кэмпбелла, добытые гораздо раньше, чем экземпляр, описанный Томасом. Эти зверьки были привезены из экспедиций, возглавляемых русскими исследователями – Радде, Пржевальским и Козловым (рис. 7), Березовским. Однако русские ученые, работавшие с добытым материалом, посчитали этих хомячков подвидом, описанного Палласом *Cr. songarus*, и отдельное описание не было сделано.

В 1910 г. американец Дж. Миллер, также работая с коллекциями, предложил присвоить всем известным мохноногим хомячкам статус самостоятельного рода –



Рис. 7. Козлов

Phodopus. Два года спустя другой американский исследователь, Н. Холлистер, уже на основании собственных сборов в Чуйской степи на южном Алтае описал еще один экземпляр, подходящий под критерий нового рода, дав ему имя *Phodopus crepidatus*.

Более поздние ревизии коллекционного материала позволили с одной стороны, отнести и ряд описанных ранее форм к роду *Phodopus*, а с другой – сократить число официально признанных видов, относящихся к данному роду. Хомячки Роборовского и герцогини Бедфорд – зверьки с палевой или желтовато-серой окраской спины без темной полоски по хребту были объединены в один вид, за которым было оставлено первое из предложенных названий – *Phodopus robirovskii* (Satunin, 1903). Распространены эти хомячки в пустынях и полупустынях Монголии и Северного Китая, на юге Восточного Казахстана (в районе озера Зайсан), а на территории России – в Южной Туве. В отличие от других представителей рода хомячки Роборовского обитают только в слабо закрепленных или барханных песках. Это настоящие обитатели пустынь, которых можно встретить в самых засушливых районах Гоби (рис 8).

Всех остальных мохноногих хомячков, с темной полоской по спине, сначала также объединяли в один вид – *Ph. sungorus*. Однако после того как была доказана видовая самостоятельность джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла, это название было оставлено только за зверьками, обитающими в восточном Казахстане и прилегающих районах России – на юге Новосибирской, Омской и Томской областей, а также в Минусинской степи Хакассии. Хомячков из Китая, Монголии и прилегающих степных районов России - Чуйской степи, Тувы, «диких степей Забайкалья» выделили в другой вид, который сохранил имя Кэмпбелла (рис. 9).

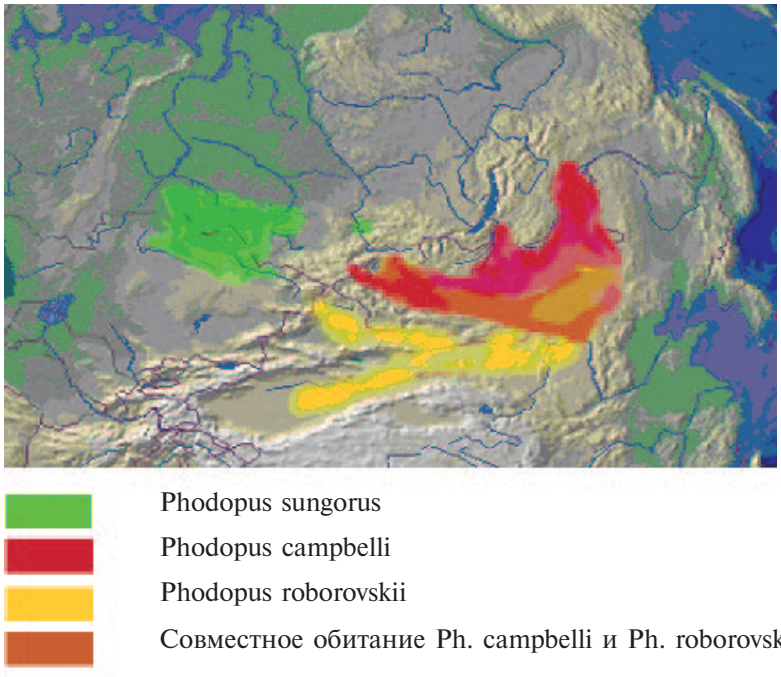


Рис. 8. Ареалы трёх видов мохноногих хомячков



Рис. 9. Хомячок Кэмпбелла *(Ph. campbelli)*

Происхождение лабораторных колоний хомячков Кэмпбелла, джунгарского и Роборовского

У истоков лабораторного разведения мохноногих хомячков в России, а, может быть, и в мире, и их использования в биологических и медицинских исследованиях стояли профессора М.Н.Мейер (Зоологический институт АН (Санкт-Петербург) и Е.Е.Погосянц (Институт экспериментальной и клинической онкологии АМН (Москва). Уже в этом следует искать единение биологических и медицинских наук. Начиная с 1960 г. М.Н. Мейер отлавливала в природе и привозила в лабораторию хомячков Кэмпбелла и джунгарского из трех районов СССР. Первый вид попал в лабораторию из Забайкалья (Борзинский р-н) и Тувы (Эрзинский р-н), второй – из Хакассии (Минусинский р-н). Животные прекрасно размножались в лаборатории, и за четыре года было получено несколько десятков пометов.

Основу колонии Погосянц составила 1 самка и 2 самца хомячка Кэмпбелла, полученные от Мейер в 1965 г. и принадлежавшие к F_3 тувинской популяции. За два года родилось 744 детеныша, 76,6% из них дожили до окончания молочного вскармливания [15]. Позже Погосянц вывела особую цветовую морфу хомячков Кэмпбелла желтоватого окраса с красными глазами, которая стала одним из основных лабораторных объектов онкологических исследований. К сожалению, в настоящее время эта колония, по-видимому, полностью утрачена. Потомков этих колоний можно встретить в зоомагазинах разных городов России и на Западе, но гарантировать чистоту линий вряд ли возможно.

В 1981 году немецкий физиолог Хельдмайер вывез несколько экземпляров джунгарского хомячка из Карасукского района Новосибирской области и использовал их в исследованиях фотопериодизма в Германии. В 1984 году из этого же места джунгарские хомячки были вывезены в Принстонский университет США канадской исследовательницей К. Вин-Эдвардс, известной своими работами по материнскому поведению и гормональной

регуляции размножения хомячков. Она же вывозила в США хомячков Кэмпбелла из Эрзинского района Тувы в 1988-1990 гг. В Москве чистые формы хомячков из Тувы, Алтая, Хакассии и Монголии поддерживаются в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова. Исследования, которые проводятся на них здесь, касаются в основном проблем химической коммуникации, полового, агрессивного поведения, видообразования, водного обмена, но мы не располагаем сведениями относительно использования этих видов в качестве объектов медицинских исследований в настоящее время.

Что касается хомячка Роборовского, то в неволе его не пытались содержать до 1970 г., пока хомячков не привезли в Московский зоопарк участники Среднеазиатской экспедиции. Здесь популяция хомячка Роборовского просуществовала некоторое время, но постепенно вымерла и сейчас в Московском зоопарке их нет.

В лаборатории Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова, хомячки Роборовского попали не из зоопарка, а из природы, из Эрзинского района Тувы. С 1986 г. в Институте поддерживается небольшая колония этих зверьков. Также как и на джунгарском и хомячке Кэмпбелла на них исследуются особенности водного обмена, химическая коммуникация, и в том числе особенности гормонального ответа зверьков на различные естественные обонятельные сигналы от особей своего и близких видов. В Европу (в частности в Зоологическое общество а Лондоне) первые хомячки Роборовского были доставлены в конце 1970-х гг., из Московского зоопарка. Правда, в Англии развести зверьков не удалось, и вскоре они вымерли. В 1990 г. их вновь завезли в Англию из Голландии, но размножить попрежнему не смогли.

Из Московского зоопарка хомячки Роборовского были доставлены и в зоопарки и научно исследовательские институты США и Канады. В частности, их содержали в лаборатории зоологического факультета Университета Торонто (Канада), где ученые изучали рост и развитие детенышей этого вида в сравнении с хомячком Кэмпбелла, отмечая при этом, что разведение хомячков Роборовского дело крайне трудное и хлопотное. В лабораторию хомячки были доставлены из зоопарка города Торонто, где по-видимому, неплохо себя чувствовали и давали потомство [16]. Что стало с этой колонией в настоящее время нам не известно.

Особенности биологии мохноногих хомячков

У трех видов мохноногих хомячков можно отметить как ряд сходных черт, так и довольно большие различия. Кариотип джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла включает небольшое ($2n = 28$) число хорошо дифференцированных хромосом, при этом между видами наблюдаются различия в строении половых хромосом. В кариотипе хомячка Роборовского 34 хромосомы. Джунгарские хомячки в летнее время имеют темно-пепельную, почти черную шерстку на спине, ярко контрастирующую со снежно-белой шерстью на брюшке. А зимой эти зверьки становятся белыми целиком, даже черная полоска по спине, как правило, исчезает [11]. В таком виде, как «белые мыши», они лучше всего известны местным жителям. Необычный вид пушистых белых зверьков с черными глазками, бегающих по поверхности снега заставляет обратить на них внимание. В зимние месяцы джунгарские хомячки активны, они перемещаются по поверхности снега, собирая главным образом семена культурных и дикорастущих растений. Однако сильные сибирские морозы требуют больших энергетических затрат на теплопродукцию, поэтому сохранение активности в течение всей ночи становится невыгодным. Вероятно поэтому именно ***у этого вида описано явление***

торпора – кратковременное впадение в состояние оцепенения с сильным падением температуры (на 20^{0}C) на несколько часов. Явление было описано в лаборатории при содержании животных в искусственных условиях при низкой температуре воздуха, а потом подтверждено и в природе, благодаря применению терморадиопередатчиков. Интересно, что торпор возникает у этих животных не только при низких температурах, но и при стрессе или уменьшении концентрации кислорода. Например, при раскапывании норы человеком у джунгарского хомячка также может наступить состояние торпора и, если зверька взять в руки, то внешне он будет выглядеть как неживой, но, уже через несколько минут, начнет шевелиться, открывает глаза и пытается убежать. Возможно, этот механизм позволяет не только сэкономить энергию, но и служит защитой от хищника. Ничего подобного не наблюдалось у хомячка Кэмпбелла. При выливании водой или раскапывании его нор зверек очень быстро выскакивает из норы. Возможно, что эти различия связаны с природно-экологическими факторами, которые, безусловно, отличаются в местах обитания этих двух видов.

Летняя окраска хомячков Кэмпбелла никогда не бывает такой темной, как у джунгарских хомячков, хотя может варьировать от светло-серого до бурого цвета. Сезонной смены окраски меха у хомячков Кэмпбелла, так же как и у хомячков Роборовского, не происходит. Их зимняя экология не изучена. Иногда зверьков отмечали на поверхности в самые сильные морозы, но большая часть их ареала практически недоступна для исследователей в зимнее время. Безлюдная на десятки и сотни километров равнина, отсутствие дорог, сильные морозы и ураганные ветры, – кто захочет рисковать жизнью, для того чтобы попробовать разыскать хомячков, численность которых и летом низка? При содержании в условиях естественного светового и температурного режимов в Подмосковье в спячку они не впадают и остаются активными. Возможно, в отличие от джунгарского хомячка большую часть времени зимой они все-таки проводят в глубоких норах.

Помимо сезонной смены окраски между *Ph. sungorus* и *Ph. campbelli* существуют и другие отличия, а самцы, родившиеся в результате скрещивания этих видов, оказываются стерильными, хотя самки от этих «браков» потомство приносят, хотя и менее плодовиты. Оба вида хорошо размножаются в неволе (как мы уже отмечали выше) и получили широкую известность во всем мире, и как декоративные, и как лабораторные животные.

Использование в лабораторной практике

Ниже приведены данные, полученные в разных областях биологии и медицины, показывающие перспективность этой группы животных как объекта экспериментальных биологических и медицинских исследований.

Онкология:

Было показано, что ***хомячок Кэмпбелла*** спонтанно заболевает опухолями разных типов и локализаций. Чаще всего наблюдаются ***плоскоклеточные раки кожи*** морды, ***молочной железы, легких.*** У животных проживших в неволе более двух лет, ***частота опухолей достигает 30%,*** при этом продолжительность жизни отдельных особей в колонии Е.Е. Погосянц достигала 40 месяцев. К введению таких ***канцерогенов*** как ***уретан*** и ***метилхолантрен*** животные оказались менее восприимчивы, чем другие виды лабораторных грызунов [2].

Физиология:

Было замечено, что ***у джунгарского хомячка*** [13] и ***у хомячка Кэмпбелла*** [3]. ***в углах рта находятся крупные железистые комплексы*** (ЖК), в состав которых входят мешочки, заполненные секретом с резким характерным запахом и окружающее их

секреторное поле. Ученые из Института им. А.Н. Северцова Российской Академии Наук в Москве установили, что ***секрет ЖК образуется в результате жизнедеятельности симбиотических бактерий мешочка*** на субстрате из активно слущивающегося эпидермального слоя внутренней стенки мешочка и секрета сальных желез, поступающего в мешочек по волоскам с железистого поля. ***Бактериальная композиция секрета состоит в основном из двух форм: кокков Streptococcus faecium и тонких неподвижных палочек Microbacterium oxydans,*** (ранее представители данного вида выделялись только из госпитального материала и места обитания этих бактерий в природе до сих пор неизвестны). Указанные доминирующие формы в среднем составляют 82-96% общего количества бактерий в мешочке. В незначительных количествах в секрете также присутствуют ***Streptococcus salivarius, Brevibacterium, Bacillus*** [6]. В основном, благодаря деятельности бактериальной флоры, секрет ЖК хомячков обладает ***высоким уровнем амилолитической (0,18+0,01 а.е.) и протеолитической (1,5+0,4 р.е.) активности,*** сопоставимой с таковой в желудке хомячков [4], а кроме того ***секрет является источником витамина B_{12}***. Эксперименты проведенные на взрослых особях хомячка Кэмпбелла однозначно показали ***важную роль бактериального секрета ЖК в нормализации процесса пищеварения у взрослых животных, поддержании их иммунного статуса*** и, в конечном итоге, в выживании взрослых хомячков [5]. Однако активное формирования ЖК и их флоры, которое происходит с 6-и дневного возраста детенышей за 2-3 дня до начала перехода хомячков на питание твердыми кормами, и окончательное формирование – к 20-дневному возрасту (задолго до полового созревания малышей) заставили предположить ***важную роль секрета ЖК для обеспечения нормального роста и развития детенышей хомячков.*** Это подтвердили эксперименты, проведенные на детенышах хомячка Кэмпбелла [7]. До сих пор, ни для каких других видов млекопитающих (даже для хомячка Роборовского, у которого в углах рта есть только большое секреторное поле) не известно наличие подобных анатомических структур с аналогичными функциями.

Хронобиология и фотопериодизм:

Джунгарских хомячков используют также для изучения ***соотношения влияния внешних факторов и "внутренних часов" на гормональный фон в организме***, отвечающий, в частности, и за начало сезонной линьки и за многие другие изменения в организме животных, связанные с сезонностью. Во многом, благодаря этим животным были раскрыты механизмы, вызывающие сезонные изменения в организме животных. На сегодняшний день известно, что ***эпифиз млекопитающих как нейрохимический трансдуктор превращает нервные сигналы восприятия света*** в эндокринный сигнал, в роли которого выступает ***мелатонин***. Было показано, что у джунгарских хомячков, содержавшихся в темноте, ***циркадный ритм*** локомоторной активности может синхронизироваться двумя 10-минутными включениями света. Когда два световых периода предъявлялись в суточном цикле с интервалами в 8 и 16 ч, ритм активности некоторых животных настраивался на 8-часовой интервал между включениями света (т.е. ритм активности соответствовал длинному световому дню), а у других особей – на 16-часовой интервал (т. е. ритм активности соответствовал короткому дню). Данный каркасный ***фотопериод индуцировал развитие семенников*** у всех особей, имевших 8-часовой период активности в суточном цикле (длинный световой день). У особей же с 16-часовой активностью (короткий день), установившейся при экспозиции в том же самом каркасном фотопериоде, было отмечено ***подавление развития семенников***. Другие исследователи, изучали состояние гонад, ритмы ***эпифизарного мелатонина*** и ***локомо-***

торной активности у джунгарских хомячков, которых содержали не в 24-часовом цикле, а в так называемых Т-циклах. Хомячки, подвергнутые часовой экспозиции на свету каждые 24 и 33 ч, демонстрировали длиннодневный тип активности и имели инактивированные гонады. Наоборот, хомячки, которые получали то же количество света каждые 24 и 78 ч, демонстрировали длиннодневный тип активности и имели семенники в 10 раз больше. Соответственно, у хомячков, содержавшихся при $T = 24$, 33 ч, ночной пик мелатонина был на 4 часа длиннее, чем у животных, содержавшихся при $T = 24$, 78 ч. Очевидно, что отличия в развитии гонад, наблюдавшиеся в этих случаях, были обусловлены различиями в контроле активности эпифиза, а не подавлением светом биосинтеза мелатонина.

Следует подчеркнуть, что фотопериодические ***эффекты затрагивают не только гонады, но и все физиологические системы мелких млекопитающих.*** Например, у джунгарских хомячков ***фотопериодический контроль распространяется на массу тела, окраску шерстного покрова, частоту впадения в торпор, потребление пищи, а так же на несократительный термогенез и общую способность к повышению теплопродукции*** [12]. Все физиологические, морфологические и поведенческие особенности хомячков в большей или меньшей степени подвержены сезонным изменениям. Этот «адаптивный синдром» гарантирует животным своевременную подготовку к наступлению каждого сезона, предъявляющего организму специфические энергетические требования.

Таким образом, экспериментальные факты убедительно свидетельствуют о том, что мелатонин является гормоном, который передает сообщения о фотопериоде в центры нейроэндокринной регуляции, ответственные за сезонные перемены. ***Мелатонин информирует организм о времени года и индуцирует механизмы, обеспечивающие морфофизиологические перестройки*** согласно специфическим требованиям различных времен года. Однако сама по себе информация о фотопериоде недостаточна для адекватных сезонных изменений, так как животные попадают в одинаковые фотопериодические условия дважды в год – до и после летнего солнцестояния. ***Приспособительные реакции к фотопериоду в большей степени зависят от направления изменений продолжительности выброса мелатонина, чем от его абсолютного значения.*** В этой связи была предложена гипотеза, согласно которой в организме существует ***внутренний календарь,*** хранящий информацию о направлении изменений продолжительности светового дня.

Реакции организма на изменения фотопериода могут быть ускорены или модифицированы другими факторами среды, такими как температура, качество пищи или наличие в ней определенных химических компонентов. В исследованиях на джунгарских хомячках установлено, что температура среды оказывает существенное влияние на критическую продолжительность светового дня. Смена морфофизиологических эффектов с длинного дня на короткий происходит тогда, когда длина светового дня составляет 13 часов. У животных, содержавшихся при температуре +22 °С, имеет место такой же 13-часовой критический фотопериод для развития семенников. Но если хомячков содержать при +5 °С, то критический фотопериод возрастает до 15 ч. Оказывается, что на фотопериодические реакции хомячков влияют как температура, так и длина светового дня.

С эколого-физиологической точки зрения, температурная зависимость, наблюдается у строго фотопериодических видов, таких как джунгарский хомячок, создает предпосылки для гибкого реагирования на сезонные изменения окружающей среды. В годы с ранней, холодной осенью сокращается время, пригодное для выращивания потомства. То же относится и к высо-

ким широтам, где весна и лето значительно короче. Поэтому температурная модификация критического фотопериода позволяет регулировать продолжительность репродуктивного сезона, не изменяя при этом ни сам механизм изменения фотопериода, ни его чувствительность.

Но в популяциях даже у таких, казалось бы, строго фотопериодических видов, как джунгарские хомячки ***встречаются особи игнорирующие естественные или экспериментальные изменения фотопериода. Таких особей называют фоторефрактерными***. И надо заметить, что среди *Phodopus sungorus* ученые обнаружили по крайней мере два фенотипа, не реагирующих на изменение длины светового дня. Одна ***линия не реагирующих на фотопериод хомячков находится в Университете Коннектикут***, в лаборатории исследователя Голдмена (линия UCT), а ***другая – в Вислианском университете*** в лаборатории исследователя Линча (линия Weasleyan).У обоих линий пока неизвестны конкретные генетические изменения, ответственные за утрату видоспецефической реакции на фотопериод, но у хомячков обеих линий обнаружено нарушение в суточной динамике секреции мелатонина, который является сигналом продолжительности темного времени суток. Было показано, что у обеих не реагирующих на фотопериод линий хомячков нарушается восприятие продолжительности темного времени суток и, следовательно, у зверьков теряется способность к адаптивной перестройке функций организма в ответ на укорочение светового дня.

Однако ***подобная фоторефрактерность*** хомячков может ***быть весьма адаптивной.*** Исследователь М. Горман обнаружил, что процент не реагирующих особей в экспериментальных популяциях зависит от фотопериода, предшествующего укорочению светового дня. При содержании хомячков в условиях предельно длинного дня возрастает доля особей нечувствительных к сокращению светового дня. В естественных условиях этот феномен может участвовать в формировании различных стратегий размножения, зависящих от времени появления зверьков на свет. Так, хомячки, появившиеся на свет весной, в условиях очень длинного светового дня, с большей вероятностью становятся не реагирующими на укорочение фотопериода. Стратегия размножения этих особей направлена на увеличение репродуктивного сезона настолько, насколько позволяют условия осени. В свою очередь, хомячки, появившиеся на свет ближе к сентябрю и не жившие в условиях самых длинных летних дней, с большей вероятностью будут фотореактивными, поскольку они откладывают размножение до следующей весны. Следовательно, две различные стратегии размножения, реализующиеся в популяциях джунгарских хомячков, могут давать определенную выгоду при ежегодно меняющихся условиях окружающей среды. Если фоторефрактерные особи способны выживать в течение зимы, то это может дать репродуктивный успех популяции в те годы, когда условия внешней среды «разрешают» размножение.

С другой стороны, фотореактивные особи, имеют больше шансов на выживание во время суровых осенних и зимних месяцев, что повышает вероятность успешного размножения в следующем сезоне [8]. Исследования, проведенные учеными Института проблем экологии и эволюции в условиях естественного светового и температурного режимов, показали, что аналогичными ***способностями к фоторефрактерности обладают не только джунгарские хомячки, но и родственные им хомячки Роборовского***.

Следовательно, подобная стратегия может иметь более общий характер, чем предполагалось ранее [10].

Поведение (родительская забота)

Физиолог из Канады провела экспериментальное сравнение степени моногамности ***джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла.*** В лаборатории она получила

несколько десятков выводков хомячков Кэмпбелла, часть из которых оставила с обоими родителями, часть - только с матерью, а остальных – с матерью и другой взрослой самкой (сестрой матери). Оказалось, что в первой группе не погиб ни один детеныш, во второй – выжило около 50%, а в третьей – около 75% молодых. Из этого был сделан вывод об облигатной моногамии хомячка Кэмпбелла, то есть ***о более важной роли самца хомячка Кэмпбелла в воспитании детенышей, чем у джунгарского хомячка*** [20]**.** Впоследствии авторы настоящей статьи, работая вместе с Вин-Эдвардс в Туве и Хакассии, обнаружили, что ***самцы джунгарского хомячка на самом деле гораздо чаще посещают и остаются в гнезде с детенышами и самкой, чем хомячки Кэмпбелла,*** а в спариваниях с одной самкой у последнего вообще принимает участие, как правило, несколько самцов. Поэтому говорить о моногамии или о родительской заботе со стороны отца у хомячка Кэмпбелла, по-видимому, не приходится, а полученные данные связаны скорее с условиями эксперимента и не подтверждаются природными наблюдениями.

Содержание в лаборатории и разведение

Для содержания хомячков в неволе подходит любая емкость из недоступного их зубам материала с гладкими высокими стенками. Удобны аквариумы, стеклянные или пластиковые ванночки. Отлично зверьки будут чувствовать себя в клетке, где есть несколько этажей, соединенных между собой. Желательно иметь в клетке «домик» – деревянный ящичек с дыркой-входом или черепок большого глиняного цветочного горшка. Лучший материал для подстилки – сухие крупные стружки. В качестве гнездового материала хомячкам неплохо подходит хлопковая вата или сухой мох-сфагнум. Основной корм для хомячков – зерно. Очень хорошо подходит смесь из овса, проса и подсолнечника или крупы: рис, пшено, гречка, «геркулес», хотя зерносмесь предпочтительнее. Необходимы овощи: капуста, морковь, свекла, яблоки, летом – трава, листья одуванчика, клевера. Эти корма обеспечивают хомячков влагой, витаминами и клетчаткой. В природе хомячки поедают значительное количество насекомых, и их организму необходим животный белок. В небольшом количестве, но регулярно, им дают мясо или рыба (в сыром или вареном виде), творог, вареный яичный желток. Хорошо, если в клетке лежит кусочек мела, как минеральная подкормка, и какая-нибудь деревяшка – для точки зубов. Особый вопрос – вода. В естественных условиях мохноногие хомячки пьют мало, довольствуясь влагой, содержащейся в пище. Не нуждаются они в воде и в неволе, в том случае, если в клетке имеется достаточное количество свежих овощей и травы. Но при кормлении гранулированным кормом поилка необходима.

В общем, ежедневный рацион при кормлении естественным кормом на одно животное составляет (по [*Pogosianz*, *Sokova*, 1967]: овес – 9 г ; семена подсолнечника – 3 г; каша (два раза в неделю) – 2 г; овощи (морковь, капуста или свекла) – 10 г; молоко – 10 г; мясо (1 раз в неделю) – 5-10 г; вода – не ограничено; зеленые проростки – зимой, трава – летом. При кормлении гранулированным готовым кормом для лабораторных животных следует руководствоваться инструкцией к применению.

Размножение хомячка Кэмпбелла и джунгарского не представляет сложностей (по сравнению с хомячком Роборовского). В отличие от многих других видов хомяков, у которых агрессивность проявляется как в отношении своего, так и противоположного пола, мохноногих хомячков можно содержать парами или группами из нескольких взрослых самок и самца. Но парное содержание предпочтительнее, поскольку, когда в группе несколько самок часто размножается только одна из

них. Минимальная продолжительность беременности – 16 дней, но типичный срок – 18 дней, задержки в 1-3 дня часто приводят к гибели самки во время родов. В литературе часто указывается срок беременности 20-22 дня, но это, скорее всего, связано с неправильным определением даты спаривания, в чем легко ошибиться, если самка и самец все время находятся вместе. Первая беременность у самок может наступать уже в возрасте 6 недель, но обычно после 9-недельного возраста. Возможно, что сроки созревания в значительной мере зависят от сезона, когда самка родилась. Самки, рожденные зимой и весной, созревают обычно раньше. У большинства рожденных летом и осенью размножение начинается только в возрасте 6-8 месяцев. Максимальное количество выводков, приходящееся на самку в лаборатории – 12, и продолжительность репродуктивного периода редко превышает 1 год. В норме число выводков, приносимых одной самкой в течение жизни, конечно, меньше – 3-4. Размеры выводков также сильно варьируют, в зависимости от возраста самки, сезона, популяционной принадлежности и др. Мейер, указывает на максимальный средний размер выводка в тувинской популяции в летние месяцы (5,9 детенышей) и минимальный для забайкальской (3,8) [1]. Мохноногие хомячки быстро развиваются. Они рождаются с резцами, голыми, с закрытыми ушными отверстиями и глазами. Ушные раковины отклеиваются на 3-4-й день, темная полоска по спине обозначается на 6-й день, к 9-му дню они покрыты короткой шерстью. После 10 дня детеныши прозревают и начинают выползать из гнезда и самостоятельно пытаются есть твердую пищу. К 16-20 дню они уже полностью самостоятельны и самка перестает их кормить. Нужно отметить, что скорость роста и развития мохноногих хомячков превышает не только мышей, крыс и леммингов, но даже сирийского и китайского хомячков.

Жизнь в природе

Изучать поведение животных в природе, особенно у мелких ночных видов – дело сложное и малопродуктивное. Но эти знания необходимы нам для грамотного планирования и правильной интерпретации лабораторных экспериментов. Авторам статьи совместно с американскими и канадскими коллегами в конце 80-х годов удалось в течение нескольких лет наблюдать за поведением хомячков Кэмпбелла в их естественной среде обитания – в Южной Туве [21].

Численность хомячков Кэмпбелла здесь как, впрочем, и в других частях ареала, обычно невысока, гораздо ниже, чем других видов грызунов - тушканчиков, полевок, песчанок [9]. Много ночей пришлось выставлять ловушки, прежде чем удалось поймать первого зверька. Еще труднее было не упустить из виду бегающего по степи хомячка. Чтобы иметь возможность проследить за каждым шагом зверька, ученые придумали использовать миниатюрные радиопередатчики, которые вживляются в брюшную полость животного. Как показали специальные исследования, такая процедура практически не отражается на поведении зверьков, а к лишним 2 г веса он привыкает довольно быстро. Теперь риск потерять объект наблюдения сведен к минимуму. Приемник всегда подскажет, как близко находится источник радиосигнала, позволит отыскать незаметный выход из норы или куст, где отсиживается зверек. Постоянно наблюдая за одним животным, обычно удается встретить и его собратьев. Самое интересное, конечно, если передатчики установлены не на одном, а на нескольких зверьках сразу. Тогда можно увидеть, как они совместно используют территорию и норы, зафиксировать встречи.

Девять часов вечера – время, когда хомячки обычно покидают свои норки. Маленький фонарик заранее установлен у

входа из норы, а наблюдатель внимательно следит за ними. Вот, наконец, появляется симпатичная мордочка, хомячок обнюхивает выход. Если все в порядке и никакой опасности нет, он осторожно вылезает на поверхность. Конечно, запах человека непривычен, особенно в первое время. Однако через несколько часов наблюдений наши подопечные настолько свыкаются с присутствием человека, что вовсе его не замечают, а иногда так близко подходят к ногам, что начинаешь бояться: как бы не раздавить столь маленькое создание. Приподнявшись на задние лапки, хомячок принюхивается, отходит чуть-чуть в сторону, опять принюхивается. И вдруг стремглав, как будто спустили пружинку, бросается прочь. Наверное, причина такого бегства в том, чтобы не раскрывать местонахождение своей норы. Лучше уйти от нее подальше, а потом уже начинать заниматься делом. А главное – обеспечить себя кормом. Это могут быть и семена, и насекомые, и зеленые части растений. Обычно в середине лета, когда у хомячков Кэмпбелла самый напряженный период жизни (размножение и выкармливание детенышей), семена большинства видов растений еще не созрели. И основным кормом являются зеленая трава и насекомые. Хорошо, если год влажный, тогда и насекомых бывает много, и зелень сочная, вкусная. А в иной сухой год прокормиться ой как трудно! Забавно наблюдать, как хомячки отыскивают личинок жуков, спрятавшихся в песке. Еще за 1–1,5 м до добычи вибриссы зверька начинают дергаться, ощупывают все вокруг. Хомячок часто принимает позы внимания или поднимаясь на задние лапки, или делая стойку на трех с приподнятой передней (наподобие легавых собак, обнаруживших дичь). Но вот местонахождение добычи установлено, и хомячок с усердием начинает разрывать песок. Если личинка обнаружена, она немедленно и с вожделением поедается. Но бывает и иначе: зверек так увлекается раскопкой, что не замечает, как личинка, раскопавшись сама, «удирает» от незадачливого охотника. За ночь зверек, сам-то весом не более 30 г, способен съесть до двух десятков личинок. Поистине завидный аппетит!

Но близится к концу лето, созревают семена многих трав и кустарников. Теперь именно они становятся основной едой для хомячков Кэмпбелла. Крупные, 2-3 мм в диаметре, бобы караганы – легкодоступный и чрезвычайно калорийный корм. Тем более что собирать его можно сидя под кустом, не рискуя попасться в лапы ночного хищника. В это время сокращаются радиусы ночных пробежек, и наблюдать за хомячками становится труднее: ориентируешься только на хруст, доносящийся из глубины куста. Большая часть семян не поедается на месте, а закладывается в защечные мешки – при этом передняя часть туловища так раздувается, что хомячка просто трудно узнать, а сам зверек не может протиснуться в нору. Приходится выпотрошить часть груза прямо в отверстие, и уже потом влезать самому.

Но не только семена переносятся в защечных мешках. Важная роль самки - подготовка теплого гнезда. Лучшим материалом для этого служит овечья шерсть, которой в степи после прогона отар обычно остается довольно много. Обнаружив клочок шерсти, самка отрывает от него зубами кусочек и заталкивает в мешок, потом еще и еще. Набив туго оба защечных мешка, она, никуда не сворачивая, устремляется к норе. А разгрузившись, снова возвращается к остаткам шерсти, даже если для этого нужно пробежать более сотни метров. И так пока весь клок не окажется в норе. Теперь хомячата не замерзнут, подолгу оставаясь в норе без матери, пока та добывает пропитание.

Совершенно удивительно то, как хомячки отыскивают дорогу к норе. Для нас, людей, в отсутствие каких-либо зрительных ориентиров, такая задача практичес-

ки невыполнима. А хомячки, кажется, даже не задумываются над тем, как добраться до дому. Наиболее вероятное объяснение – использование зверьками химических сигналов, или, проще говоря, пахучих меток.

Ученые установили, что любые экскреты животных, будь то слюна, моча или выделения кожных желез, имеют индивидуальную специфику, т.е. обладают уникальным составом или количеством определенных химических веществ. По их запаху зверьки легко узнают не только собственные выделения, но и вид, пол и физиологическое состояние другой особи.

Совершить обратный проход к норе по размеченному таким образом участку для хомячка ничуть не труднее, чем для нас пройти по освещенной аллее к дому. Но вот вопрос: как долго сохраняются такие метки? Не окажется ли так, что, проснувшись вечером и выйдя из норы, зверек не найдет знакомых тропинок? Обычно этого не происходит. После сильного дождя и ветра или после заточения в клетке в течение нескольких дней хомячку приходится чаще метить свою территорию, но уверенность в движениях не пропадает. Следовательно, большинство пахучих меток сохраняется в природе длительное время. Особенно это относится к секрету специфических кожных желез, расположенных на брюшной стороне тела. Помимо средне-брюшной железы у джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла, как уже говорилось выше, есть еще железы, расположенные в углах рта. Роль их в процессах маркировки пока не ясна, но, может быть, их секрет наносится на попадающий в защечные мешки корм, что помогает отыскать запасы, если они сложены не в норе, а где-то еще на территории участка. Такие временные кладовые очень характерны для хомячка Кэмпбелла. Уйдя далеко от норы, он часто оставляет собранный корм в каком-нибудь потаенном месте по пути домой. А затем, например, на следующий день, приходит и подбирает запас. Не раз, следуя за хомячком, мы обнаруживали такие кладовые, сделанные под куртинками злака и лишь слегка присыпанные песком. Для нас доказательством того, что обнаружена кладовая именно этого зверька, а не его собрата, служил яркий флажок соответствующего цвета. Для самого же хомячка, вероятно, – пахучий сигнал.

Существует мнение, что **обонятельные сигналы необходимы зверькам для передачи информации сородичам: о занятости территории, о физиологическом состоянии и т.д.** Разумеется, пахучие метки не могут оставаться незамеченными другими особями, и они как-то реагируют на них. Но вероятным кажется и то, что **животное оставляет метки в основном для самого себя**: «Это место знакомое. Я здесь уже был». Это вселяет уверенность в своих действиях, позволяет быстрее отыскать собственную нору или кладовую и, соответственно, повышает вероятность выживания. Этот факт следует учитывать и при планировании лабораторных экспериментов, так как помещение животного на новую чистую территорию вызывает стресс, ослабить который можно заранее «познакомив» подопытное животное с экспериментальной клеткой, дав ему возможность пометить ее. Но вот в период размножения оставляемые зверьками метки предназначены несомненно и для других особей. И на этом надо остановиться подробнее.

У самки в заранее подготовленной норе с теплой подстилкой родились детеныши. И она вновь готова к встрече с самцом. Такое явление – способность зачать новый выводок сразу после родов (**послеродовая рецептивность**), характерно для обитателей мест с суровым климатом, там, где благоприятный для выращивания потомства период достаточно короток. Самка, родив выводок, выходит на поверхность, выбирает подходящую полянку и начинает активно метить ее вагинальным секре-

том. Самцы, вероятно, заранее знают о наступлении этого периода – часть из них уже накануне перебрались в норы поближе к этой самке. Но некоторые самцы живут очень далеко даже по человеческим меркам: за 1,5-2 км. Каким образом узнают они о приходе самки в охоту? Ничего, кроме запаха, на такое расстояние распространиться не может. И вот, выйдя из своей норы, самец практически по прямой устремляется к вожделенной цели. Через 1,5-2 часа после выхода самки из норы поблизости от нее может собраться сразу несколько самцов. Как это ни парадоксально, но на небольшой территории, обильно помеченной самкой, отыскать ее сложнее, чем с большого расстояния, так как градиент интенсивности запаха выражен в таких условиях плохо. Зрение – вряд ли хороший помощник: трава, кусты, темнота. Предполагают, что при близком контакте более эффективным средством является звуковая сигнализация. Известно, что в процессе спаривания мохноногие хомячки, как и некоторые другие виды грызунов, издают ультразвуковые сигналы, причем сигналы самки и самца, а также самок в разном физиологическом состоянии отличаются. Вполне вероятно, что, приблизившись к месту нахождения самки, самцы ориентируются уже по ее писку, не доступному человеческому уху. Действительно, наблюдая поведение самца с высоты человеческого роста, видно, как сильно он возбужден от обилия пахучих меток, как трудно ему отыскать самку, которая так близка (мы-то видим ее). Он мечется, кидается то в одну, то в другую сторону. Но вот, наконец, самка обнаружена, она не убегает от самца, а замирает на несколько секунд, происходит спаривание. Чуть позже акт повторяется. И так несколько раз. Иногда в это же время рядом оказывается и другой самец. Его предшественник, в зависимости от своего ранга, уступает или прогоняет соперника. Бывают случаи, когда самцы не хотят уступать друг другу и между ними возникают драки. Но до кровопролития обычно не доходит, и один из соперников довольно скоро уходит восвояси.

Рецептивность у самки продолжается несколько часов, после чего она возвращается в свою нору к оставленному выводку. Теперь в течение 18 дней она будет кормить детенышей и ухаживать за ними. А за несколько дней до новых родов приготовит новую нору с шерстяной подстилкой. Почему самка не остается в старой норе? Этому может быть несколько объяснений. Во-первых, детеныши прежнего выводка к 18-дневному возрасту еще не настолько окрепли, чтобы самим разыскать себе новое жилище, но в то же время материнское тепло им уже не необходимо. Во-вторых, при длительном использовании норы в ней накапливается большое количество паразитов (блох, клещей), и новый выводок лучше поместить в чистую нору. Но молодые не остаются совсем беспризорными, после того как мать их покинет. Иногда случается так, что самец (сказать с уверенностью отец он этим детенышам или нет мы, конечно, не можем) заходит в эту нору и остается с молодыми в дневное время. Кроме того, он приносит сюда запасы корма, служащие хорошим подспорьем приступающим к самостоятельной жизни хомячкам. Объяснить, что влечет к ним самца, живущего порой на большом расстоянии от этой норы, очень трудно. Тем более что взрослые хомячки живут поодиночке и совместной заботы о выводке не проявляют.

Воздействие на рост и развитие молодых со стороны взрослых особей не ограничивается только одной заботой. Если детенышей содержать в группах со взрослыми самцами, то молодые самки развиваются быстрее, а самцы – медленнее. Предполагается, что это происходит под воздействием каких-то веществ, выделяемых среднебрюшной железой взрослого самца. Биологический смысл этого поня-

тен. Быстрое созревание самок позволит им скорее приступить к размножению (может быть, уже в этом же году) и, соответственно, увеличить численность популяции. А молодые самцы «с точки зрения» взрослых являются потенциальными конкурентами – им можно и подождать размножаться до будущего года.

Но вот приходит осень, а за ней и зима. А зимы в тувинских степях действительно суровые: снега почти не бывает, ветры обычно сильные и порывистые, температура, как правило, стоит ниже -20 °С. Что происходит с хомячками Кэмпбелла зимой, мы не знаем. Может быть, они собирают запасы корма и используют их в норах в зимнюю стужу?

На многие вопросы мы еще не можем найти ответы. В заключении хотелось бы только отметить, что, несмотря на важность лабораторных исследований и открытие множества интересных феноменов, все же главной задачей биологии остается описание процессов происходящих на уровне популяций и целых сообществ и тут не обойтись без объединенных усилий специалистов разных профессий: зоологов, физиологов, медиков ...

Работа выполнена при поддержке проекта «Научные основы сохранения биоразнообразия России» и гранта РФФИ 04-04-49512а

Литература

1. *Мейер М.Н.*, 1967. Особенности размножения и развития джунгарских хомячков (*Phodopus sungorus* Pallas) разных географических популяций. *Зоол. журнал. Т. 46. 4. С. 604-614.*
2. *Погосянц Е.Е., Сокова О.И., Пригожина Е.Л.* Новое животное для экспериментально-онкологических исследований – джунгарский хомячок. *Вопросы онкологии. 1970. Т. XVI. 3. С. 90-98.*
3. *Соколов В.Е., Васильева Н.Ю., Демина Н.Н., Феоктистова Н.Ю.* Дополнительные мешочки в устье защечных мешков у хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905; Cricetidae, Rodentia). *Доклады РАН. 1991. Т. 316. 6. С. 1486-1490.*
4. *Соколов В.Е., Феоктистова Н.Ю.* Реакция взрослых хомячков Роборовского (*Phodopus roborovskii*) на запаховые сигналы особей своего и противоположного пола в разные сезоны года. *Изв. АН сер. биол. 1996. № 5. С. 578-582.*
5. *Соколов В.Е., Феоктистова Н.Ю., Нестерова Н.Г.* Влияние секрета специфических кожных желез на ферментативную активность ряда отделов пищеварительного тракта у хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli* Thomas, 1905). *Докл. РАН. 1996 Т. 349. 1. С. 138-140.*
6. *Ушакова Н.А., Феоктистова Н.Ю., Колганова Т.В., Турова Т.П.* Microcterium oxydans - симбионт хомячка Кэмпбелла, обладающий пробиотическими свойствами. *Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. N. 6. С. 639-644.*
7. *Феоктистова Н.Ю., Ушакова Н.А., Мещерский, И.Г.* Участие симбиотических бактерий, обитающих в специфических комплексах в углах рта, в процессах регуляции нормальной жизнедеятельности у хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*). *Докл. РАН. 2004. Т. 398. 3. С. 1-4.*
8. *Штайнлехнер С., Пухальский В.* Сезонная регуляция размножения мелких млекопитающих. *Сибирский экологический журнал. 1999. №1. С. 23-29.*
9. *Юдин Б.С., Галкина Н.Ф., Потапкина Н.Ф.* Млекопитающие Алтае-Саянской горной страны. Новосибирск. 1979. 296 с.
10. *Feoktistova N.Yu., Meschersky I.G.* Seasonal changes in desert hamster *Phodopus roborovskii* breeding activity. *Acta Zoologica Sinica. 2005. V. 51. N 1. P. 1-6.*
11. *Flint W.E.* Die zwerghamster der Palaarktischen fauna Verlag, *Wittenberg Lutherstadt, Germany: A. Ziemsen 1966.*
12. *Heldmaier G., Steinlechner S.* Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the Djungariam hamster (*Phodopus sungorus*) living in natural photoperiod. *J. Comp. Physiol. 1981. V.142. N 4. P. 429-437.*
13. *Krischke N.* Die Murndwinkeldriisen des Dshungarisher Zwerghamsters Phodopus sungorus: struktur und funktion. *Saugetier-*

kundliche Muttelungen. 1986. V. 33. N.2+3. P. 195-204.

14. *Pallas P.S.* Reise durch verschiedene Provinzen des Russuschen Reichs. *S.-Ptb K. Acad. Wiss. 1773. T.2. (b2). P. 369-744.*
15. *Pogosianz H.E., Sokova O.I.* Maintaining and breeding of the Djungarian hamster under laboratory conditions. *Zsch. Versuchstierk. 1967. V. 9. N.6. P. 292-297.*
16. *Ross P.D., Cameron D.M.* A comparison of the physical development and ontogeny of behavior in the Djungarian hamster and the Desert hamster. *Acta Theriologica. 1989. V.34. № 18. P. 253-268.*
17. *Satunin K.A.* Neue Nagetiere aus Centralasien. *Ежег. Зоол. Муз. Императорской АН. Изд. Императорской Академии Наук. 1903. Т. VII. С. 39-41.*
18. *Thomas O.* The Duke of Bedfords zoological exploration in eastern Asia, XI. On mammals from the provinces of Shansi and Shen-si, northern China. *Proceedings of the Zoological Society of London. 1908. P. 963-983.*
19. A new *Cricetulus* from Mongolia. *Ann. Mag. Nat. Hist. ser. 7. 1905. V. 15. (8). P. 322-323.*
20. Wynne-Edwards K.E., Lisk R.D. Differential effects of parental presence on pup survival in two species of dwarf hamster (*Phodopus sungorus* and *Phodopus campbelli*). *Physiology and Behavior. 1989. V. 45. P. 465-469.*
21. *Wynne-Edwards K.E., Surov A.V., Telitzina A.Y.* Field studies of chemical signalling: direct obsrvations of dwarf hamsters (Phodopus) in Soviet Asia. *Chemical Signals in Vertebrates VI (R.L.Doty and D. Muller-Schwarze) N-Y.: Plenum Press. 1992. P. 485-491.*

BIOLOGY OF DWARF HAMSTERS AND USING THEM IN LABORATORY STUDIES

A.V. Surov, N.Yu. Feoktistova

Severtsov Institute of Ecology and Evolution of RAS, Moscow

This paper concerns the history of description of dwarf hamsters – Phodopus campbelli, Ph. sungorus and Ph. roborovskii, the origin of laboratory stocks, ranges, the biology including study in nature, maintaining and breeding under laboratory conditions, use as a model for scientific research.

Key words: dwarf hamsters, Phodopus campbelli, Phodopus sungorus, Phodopus roborovskii.

БИОМЕДИЦИНА ● № 2 2006, с. 71–74

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Уравнение состояния лекарственного вещества в организме

А.А. Бондарев, И.В. Смирнов, В.В. Удут

ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН

В работе дается математическое описание распределения лекарственного вещества по различным энергетическим состояниям. В основе модели лежит термодинамическое описание процессов взаимодействия лекарственного вещества с биологическими мишенями. Рассмотрены решения этой системы для некоторых частных случаев, описывающих фармакологические эффекты. В рамках предложенной модели даны количественные определения селективности и активности вещества. Теоретически описано влияние термодинамических характеристик на активность и селективность, которые в свою очередь определяют величину и спектр фармакологического действия вещества.

Ключевые слова: фармакодинамика, лекарственное вещество, математическая модель, термодинамика.

Целью работы явилось математическое описание состояния молекул вещества в организме и, в частности, их распределение по различным энергетическим состояниям. Также проанализировали некоторые математические закономерности и эффекты, которые могут проявляться в экспериментальных фармакологических исследованиях. Математическая модель была построена без учета кинетики и биотрансформации вещества и рассматривалась как термодинамическая.

Материалы и методы

Для определения аналитического вида уравнения нами был использован пакет программ аналитической алгебры MAXIMA, разработанный в Массачусетском технологическом институте [4].

Результаты и обсуждение

Механизм действия, фармакологическая активность и селективность лекарственного вещества (ЛВ) связаны с его химическим, то есть электронным строением. Взаимодействие ЛВ и биологического субстрата можно описать в терминах термодинамики и квантовой химии [3]. Лекарственное вещество в организме взаимодействует со всеми биологическими мишенями (БМ), то есть образует комплексы с этими молекулами. Эти состояния можно охарактеризовать термодинамической величиной ΔG – свободной энергией Гиббса. Одно из этих состояний – молекулы ЛВ в водной среде. В общем, мы имеем набор возможных состояний ЛВ в организме с различной энергией. Энергия взаимодействия зависит от природы ЛВ, БМ и среды.

$$\begin{Bmatrix} N_0 \\ N_1 \\ \vdots \\ N_i \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} \Delta G_0 \\ \Delta G_1 \\ \vdots \\ \Delta G_i \end{Bmatrix} \begin{matrix} K = e^{\frac{-\Delta G}{RT}} \\ \Rightarrow \end{matrix} \begin{Bmatrix} n_0 \\ n_1 \\ \vdots \\ n_i \end{Bmatrix} \begin{matrix} A_i = \frac{n_i}{N_i} \\ \Rightarrow \\ Q_i = \frac{A_i}{\sum A_j} \end{matrix} \begin{Bmatrix} A_0 \\ A_1 \\ \vdots \\ A_i \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} Q_0 \\ Q_1 \\ \vdots \\ Q_i \end{Bmatrix} \quad (1)$$

Активность ЛВ в отношении данной биологической мишени можно определить количественно по степени воздействия на молекулы мишеней

$$A_i = \frac{n_i}{N_i} \quad ,$$

где N_i – общее количество БМ, n_i – число образованных комплексов с этими биологическими мишенями, т.е. число измененных БМ [2].

Селективность можно описать отношением активности препарата по отношению к данной мишени, к общей сумме всех активностей с конкурентными мишенями

$$Q_i = \frac{A_i}{\sum A_j}.$$

Зная энергетику этих состояний и используя термодинамический закон распределения по этим состояниям

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}},$$

можно количественно рассчитать число молекул ЛС в каждом состоянии и вычислить активности и селективности отдельно по отношению ко всем возможным биологическим мишеням.

Процесс образования комплексов можно описать с помощью константы равновесия:

$$\begin{matrix} (L-\Sigma n_j) & (N_i-n_i) & K_i & n_i \\ \mathrm{L} & + \mathrm{B} & = \mathrm{LB} & \end{matrix} \qquad K_i = \frac{n_i}{(L-\Sigma n_j)\cdot(N_i-n_i)} \quad (2)$$

С учетом $A_i = n_i / N_i$; $n_i = A_i \text{Ч} N_i$:

$$K_i = \frac{A_i}{(L-\Sigma A_j n_j)\cdot(1-A_i)} = \frac{A_i}{L_{эф}\cdot(1-A_i)} \quad (3)$$

где L – исходное число молекул вещества; $L_{эф} = L - \Sigma A_j \cdot N_j$ – число молекул, находящихся в исходном сольватированном состоянии.

Тогда нахождение активностей и $L_{эф}$ сводится к решению системы уравнений:

$$\begin{cases} A_i = \dfrac{K_i \cdot L_{эф}}{1 + K_i \cdot L_{эф}} \\ L_{эф} = L - \sum A_j N_j \end{cases} \Rightarrow \begin{Bmatrix} A_i \\ L_{эф} \end{Bmatrix} \quad (4)$$

Нами, с помощью программы аналитической алгебры MAXIMA, было найдено решение этой системы для случая одной, двух и трех конкурентных биологических мишеней. Для большего числа мишеней необходимо решать эту систему в численном виде, так как уже для трех мишеней аналитическое выражение для активности содержит около 10^6 символов, поэтому для систем с большим числом конкурентных мишеней необходимо применять численные методы.

Аналитическое выражение для активности с одной биологической мишенью, без побочных действий, имеет вид:

$$\mathrm{A} = \frac{1 + L\cdot K + K\cdot N - \sqrt{(1 + N\cdot K + K\cdot L)^2 - 4\cdot N\cdot K^2\cdot L}}{2N\cdot K} \quad (5)$$

График этой функции для различных констант равновесия K, при близких мольных соотношениях L/N:

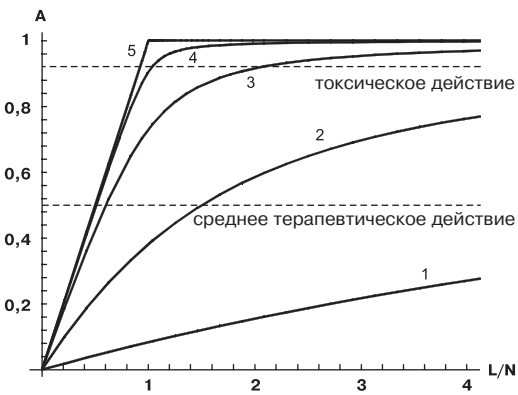


Рис. 1. Зависимость активности от мольного соотношения мишеней и молекул ЛВ при различных константах равновесия:
$K_1=10^{-8}$, $K_2=10^{-7}$, $K_3=10^{-6}$, $K_4=10^{-5}$, $K_5=1$

Константы равновесия для кривых: $K_1=10^{-8}$, $K_2=10^{-7}$, $K_3=10^{-6}$, $K_4=10^{-5}$, $K_5=1$. Рассмотрим более подробно графики этих зависимостей. Кривая 1 соответствует веществу с низким аффинитетом к данной биологической мишени, вещество обладает очень широким терапевтическим интервалом, но средние терапевтические дозы очень велики. Повышение дозы способствует проявлению побочных эффектов. Вторая и третья кривые соответствуют хорошему лекарственному веществу с достаточно широким терапевтическим ин-

тервалом и относительно малой величиной средней терапевтической дозы. Кривая 5 соответствует сильнодействующему веществу с K > 1. Это вещество обладает сильнейшим фармакологическим эффектом, но имеет узкий интервал терапевтических доз, сразу за которым следуют токсические дозы. Многие сильнодействующие яды должны иметь подобную зависимость. Кривая 4 приближается к уравнению 5, этот случай следует рассматривать, как граничный, здесь токсическая доза все еще достаточно близка к средней терапевтической и такой препарат относится к группе сильнодействующих лекарственных средств.

Интересный случай – уравнение (5) имеет следующий физический и химический смысл: при K > 1 веществу термодинамически не выгодно находиться в водной среде. А с учетом того, что количество молекул воды примерно в 1000 раз больше чем количество других молекул, вода перестает выполнять роль сильного буфера, накапливающего молекулы и снижающего токсичность вещества.

Эти графики построены с приближением только одной комплиментарной мишени и действительны только для высокоселективных веществ. Второй по емкости и значимости является белковая буферная система, это транспортные и конструкционные белки, воздействия на которые не выражаются в фармакологических эффектах. Учет таких буферных систем в значительной степени изменяет вид кривых зависимости доза–активность.

Для случая нескольких конкурентных мишеней могут наблюдаться более сложные закономерности, которые влияют на наблюдаемые фармакологические эффекты. Интересным случаем проявления математических эффектов является пример, показанный на рис. 2, где: B_1 – необходимая биологическая подсистема, воздействие на которую мы наблюдаем как основной фармакологический эффект; B_2 – подсистема, воздействие на которую не проявляется в виде фармакологического эффекта (например транспортные, конструкционные белки); B_3 – другие подсистемы.

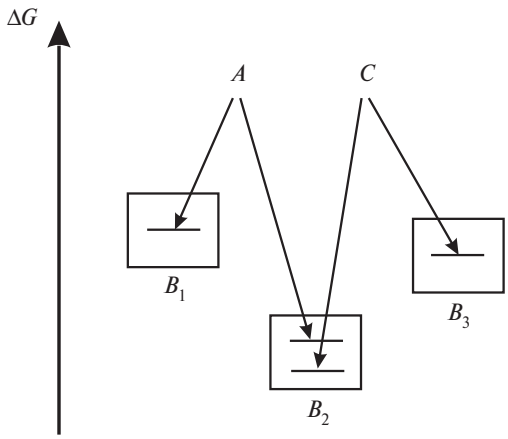


Рис. 2. Диаграмма энергетических состояний веществ А и С с различными биологическими мишенями (B_1, B_2, B_3 – биологические подсистемы, А и С – действующие вещества)

Вещество А воздействует на B_1 и B_2, но аффинитет к B_2 выше (это состояние ниже по энергии), значит большая часть вещества А будет в комплексе с B_2.

Под действием вещества С, имеющего более высокий аффинитет к B_2, оно будет вытеснять вещество А из комплекса AB_2. Высвободившаяся часть вещества А будет образовывать комплекс AB_1 и таким образом вещество С будет усиливать основное фармакологическое действие вещества А. Отсюда следует, что хотя само вещество С не вызывает этого фармакологического эффекта, оно усиливает действие лекарственного вещества А.

В общем виде состояние лекарственного вещества в организме, т.е. распределение его по различным энергетическим состояниям, влияет на функционирование организма следующим образом:

$$\Delta G_i \overset{f_T(\Delta G_i, N_i)}{\Longrightarrow} A_i \overset{f_B(A_i, X_i)}{\Longrightarrow} Ph_i \qquad (6)$$

Термодинамический спектр вещества ΔG_i в отношении биологического субстрата позволяет с помощью полученных уравнений (1) $f_T(\Delta G_i, N_i)$ вычислить активности A_i. Активности вещества в отношении различных биологических субстратов в свою очередь с помощью биологических закономерностей $f_A(A_i, X_i)$ позволяют определить многие наблюдаемые фармакологические эффекты Ph_i, т. е. фармакологический спектр вещества. В общем, обнаруженные теоретически или экспериментально физико-химические (ΔG_i), математические (f_T) и биологические $f_Б$ эффекты и зависимости имеют свое отражение в наблюдаемых фармакологических закономерностях.

Литература

1. *Сергеев П.В.* Биохимическая фармакология. М.: Высшая школа, 1982. – 343 с.
2. *Гусельникова В.И.* Общие и прикладные вопросы хеморецепции. М.: Наука, 1977. – 165 с.
3. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое издательство ВПК, 2004.
4. *Wester W.* Computer Algebra Systems: A Practical Guide,UK, 1999.

THE EQUATION OF DRUG STATE IN ORGANISM

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

Pharmacology Research Institute of Tomsk Research Center (Siberian Department of RAMS)

This paper concerns mathematical description of drug distribution at different energy states. The model is based on thermodynamic description of drugs and biological targets interaction. Some solutions for special cases of pharmacological effects are derived. This model suggests quantitative determination of substrates' selectivity and activity. Theoretical description is given for influence of thermodynamic characteristics on activity and selectivity which in turn determine the magnitude and spectrum of substrate's pharmacological action.

Key words: pharmacodynamic, drug, mathematical model, thermodynamic.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ПРОТЕКЦИЯ

Значение нефропротекции при выборе антигипертензивной терапии у пациентов с сахарным диабетом второго типа на основе изучения реактивности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы

О.Ю. Соколов, Н.И. Волкова

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

На основании оценки реактивности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы у пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2 типа в ходе фармакологической пробы с фуросемидом выявлены группы больных с нормальной реактивностью РААС, гипо- и гиперреактивностью РААС. В соответствии с параметрами реактивности РААС проводили выбор режима антигипертензивной терапии. Оценивали показатели гемодинамики, углеводного обмена и функциональной активности почек до и на фоне патогенетически обоснованной антигипертензивной терапии через 180 дней. Полученные результаты свидетельствуют о высокой антигипертензивной активности, стабилизации гемодинамики, улучшении показателей углеводного обмена и нефропротективной активности при дифференцированном назначении антигипертензивных средств с учетом параметров реактивности РААС.

Ключевые слова: антигипертензивные средства, ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС), сахарный диабет второго типа.

Сложная система взаимосвязей существует между артериальной гипертензией (АГ) и почками. Эта проблема обсуждается учеными уже более 150 лет, и ей посвящены работы ведущих нефрологов и кардиологов мира (R.Bright, F.Volhard, E.M.Тареев, А.Л.Мясников, H.Goldblatt, B.Brenner, G.London и др.). По современным представлениям, связь между почками и АГ представляется в виде порочного круга, в котором почки являются одновременно причиной развития АГ и органом-мишенью ее воздействия [5]. В настоящее время доказано, что АГ не только повреждает почки, но и резко ускоряет развитие почечной недостаточности [8]. Почки являются третьим по частоте поражения (после миокарда и головного мозга) органом-мишенью для артериальной гипертонии.

В начале XX века, когда отсутствовали эффективные антигипертензивные средства, все больные злокачественной и тяжелой гипертонией умирали в течение 5 лет от почечной недостаточности [7].

В последнее десятилетие серьезно изменилось отношение к развитию поражения почек при АГ. Раньше преобладало мнение о том, что изменения почек возникают лишь на поздней, «склеротической» фазе заболевания, и что только тяжелая АГ может приводить к развитию терминальной ХПН. В настоящее время мы имеем ситуацию, при которой число пациентов со злокачественной АГ постоянно снижается, а количество больных АГ с ХПН не только не уменьшилось, а напротив – значительно возросло. По данным эпидемиологических исследований, до 15-25 % случаев терминальной ХПН обусловлены АГ, при этом основное значение в развитии гипертензивной нефропатии имеют мягкая и умеренная формы этого заболевания [10].

Тем не менее, первое место в этиологической структуре терминальной ХПН по-прежнему занимает сахарный диабет (СД), в структуре которого до 90% занимают пациенты с диабетом 2 типа, ранее называемого инсулиннезависимым [2].

На рис. 1 представлена структура причин терминальной ХПН в США. Как видно из диаграммы, именно пациенты с АГ и сахарным диабетом, а не с диффузным гломерулонефритом, сегодня составляют основную группу больных, которым необходима почечнозаместительная терапия.

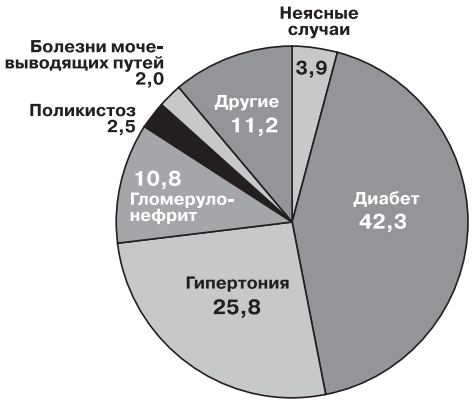


Рис. 1. Структура причин терминальной почечной недостаточности в США [US Renal Data System Am. J. Kidney Dis. 1995, (Suppl.2), 38-50]

Безусловно, терминальная ХПН развивается значительно реже, чем мозговой инсульт, инфаркт миокарда и сердечная недостаточность, являющиеся сегодня основными причинами фатальных исходов у больных с АГ. В то же время высокая затратность методов почечнозаместительной терапии (гемодиализ, трансплантация почек) приводит к тому, что расходы на лечение терминальной ХПН в развитых европейских странах приближаются к 3 % от бюджета, выделяемого на здравоохранение, при увеличении числа пациентов с ХПН за последние 10 лет в 2,5 раза [19]. При этом эффективность этих методов не всегда обеспечивает адекватное улучшение качества жизни и достаточную продолжительность жизни нефрологических пациентов. В этой связи стратегия нефропротекции представляет собой один из ключевых моментов комплексной терапии АГ и сахарного диабета.

Термин «нефропротекция» или «защита почек от повреждения» в настоящее время обобщает несколько направлений в лечебной тактике врача. С одной стороны, данный термин подразумевает первичную профилактику возникновения патологии почек. К группам потенциально высокого риска формирования поражения почек относятся больные с сахарным диабетом и АГ. С другой стороны, под термином «нефропротекция» понимается торможение прогрессирования уже имеющегося заболевания почек [5].

Ведущая роль системной АГ в развитии склеротических и сосудистых изменений в почечной паренхиме признается практически всеми исследователями, поэтому достижению целевого уровня АД принадлежит одно из главных мест в стратегии нефропротекции [12].

Актуальность поиска препаратов с нефропротективными свойствами продиктована тем, что, в отличие от других органов-мишеней, успешное снижение АД не всегда предотвращает ухудшение функции почек больных АГ.

Так, в исследовании по оценке влияния длительной терапии бета-адреноблокаторами и диуретиками на функцию почек у пожилых отмечено статистически значимое нарастание уровня креатинина, несмотря на контроль АД в соответствии с целевыми значениями [13].

Современные рекомендации по лечению АГ в качестве препаратов выбора для пациентов сахарным диабетом и диабетической нефропатией (ДН) предписывают назначение ингибиторов АПФ. Это связано с тем, что ингибиторы АПФ способны контролировать не только системную, но и внутриклубочковую гипертензию, играющую важнейшую роль в прогресси-

ровании диабетического поражения почек. При этом известно, что у большинства пациентов с сахарным диабетом АГ протекает на фоне снижения активности ренина плазмы крови.

Как показали наши исследования, АГ на фоне гипоренинемии часто сопровождается гиперреактивностью системы ренин-ангиотензин-альдостерон. Это обстоятельство может являться существенным фактором в механизмах развития заболевания и мишенью для обеспечения антигипертензивной и органопротективной активности ингибиторов АПФ [4]. С другой стороны, можно предположить, что отсутствие гиперреактивности РААС у пациентов с АГ требует назначения лекарственных препаратов других групп. В последние годы установлено, что нарушение работы медленных кальциевых каналов в клетке может служить основой патогенеза АГ [6]. В такой ситуации особое значение приобретает использование антагонистов кальциевых каналов (АКК) для коррекции АГ и защиты органов-мишеней от повреждения.

Цель настоящего исследования: изучить параметры активности и реактивности РААС у больных АГ в сочетании с сахарным диабетом типа 2 с признаками диабетической нефропатии и на основе их анализа разработать способы оптимизации выбора антигипертензивной терапии, направленной на восстановление нормальной реактивности РААС, а также провести клинико-инструментальную оценку эффективности антигипертензивной терапии, направленной на восстановление параметров реактивности РААС, с изучением влияния выбранного режима антигипертензивной терапии на показатели функциональной активности почек и углеводного обмена в изучаемой группе пациентов.

Материалы и методы

В основу работы положены результаты комплексного обследования 192 больных с АГ, сахарным диабетом типа 2 и сочетанием этих заболеваний. Показатели реактивности РААС использовали в качестве критериев выбора режима антигипертензивной терапии у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2. Среди обследованных больных было 144 пациента, страдающих АГ и сахарным диабетом типа 2 с признакам ДН – основная группа. В качестве контроля обследованы 25 пациентов с АГ, 23 пациента с сахарным диабетом типа 2 без АГ и 17 практически здоровых лиц. Степень тяжести течения сахарного диабета типа 2 выставлялась на основании критериев, предложенных ВОЗ, и у обследованных больных носила среднетяжелый характер. Все больные были сопоставимы по полу, возрасту, длительности и тяжести как АГ, так и сахарного диабета типа 2. У всех пациентов отсутствовали признаки ХПН и серьезные сопутствующие заболевания внутренних органов, способные оказать влияние на динамику изучаемых показателей.

Артериальное давление измерялось по методу Короткова. Параметры центральной гемодинамики оценивали реографическим методом. Функциональное состояние РААС изучали на основании определения базальной активности ренина плазмы, ангиотензина I и концентрации альдостерона в плазме периферической крови радиоиммунным методом, а также на основе исследования показателей реактивности РААС в условиях острой фармакологической пробы с фуросемидом. Для определения концентраций альдостерона плазмы использовали стандартные радиоиммуннологические наборы ALDO–RIACT, а концентраций ангиотензина I и ренина плазмы — REN-CT 2 (CIS bio international, France). Для оценки функционального состояния почек проводили исследование суточной экскреции белка с мочой. При отсутствии протеинурии определяли микроальбуминурию, т. е. выделение альбумина в пределах 20-200 мг/л (30-300 мг/сут). Микроальбуминурию оп-

ределяли иммунохимическим хроматографическим методом. Кроме того, проводили радиоизотопную ангиореносцинтиграфию с расчетом скорости клубочковой фильтрации. У всех больных определяли концентрацию креатинина, мочевины и электролитов сыворотки крови. Оценку углеводного обмена осуществляли на основании измерения гликемии натощак, через 120 мин после стандартной пищевой нагрузки, глюкозурии и концентрации инсулина в плазме крови. Концентрации инсулина в плазме крови исследовали радиоиммунным методом с помощью стандартного набора РИО-ИНС ПГ-J125 (Белоруссия). У всех обследованных пациентов в соответствии с результатами оценки реактивности РААС проводили антигипертензивную терапию ингибитором АПФ – эналаприлом (эднит) в суточной дозе 5-10 мг, антагонистом кальциевых каналов (АКК) — верапамилом (изоптин SR) в суточной дозе 180-240 мг и их комбинациией. Оценивали влияние антигипертензивной терапии на функциональное состояние почек, активность РААС и углеводный метаболизм. В течение первого месяца исследования пациенты проходили лечение в условиях эндокринологического стационара, в дальнейшем наблюдались амбулаторно, с лабораторным контролем биохимических параметров влияния антигипертензивной терапии через 180 дней от начала лечения. Анализ полученных показателей проводили с помощью программ БИОСТАТ 4.03 и STATISTICA 5.0. Достоверность межгрупповых различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Достоверность различий между показателями оценивали по критериям Уилкоксона, Манна-Уитни. Полученные различия считали статистически значимыми при значениях критерия $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке исходного функционального состояние почек у пациентов с АГ и СД типа 2 отмечали, что продолжительность диабета в большей степени, чем длительность АГ, влияет на прогрессивное ухудшение работы почек. В то же время АГ, безусловно, приводит к ускорению развития диабетической нефропатиии. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика функционального состояния почек у пациентов с АГ и СД2 в зависимости от скорости клубочковой фильтрации

Показатели	1 группа	2 группа	3 группа
СКФ, мл/мин	112,27±9,43	62,28±10,04	152,21±13,2
Длительность СД 2, год	2,88±0,54	8,86±0,25	2,95±0,27
Длительность АГ, год	3,22±0,49	6,07±0,48	9,21±0,52
Протеинурия, мг/сут	980,0±170,0	1560±210,0	705,75±136,8
МАУ, мг/сут	171,4±11,3	230,60±24,16	173,6±10,7
Концентрация креатинина в плазме крови, ммоль/л	79,5±6,6	80,1±7,4	79,2±8,1
Концентрация мочевины в плазме крови, ммоль/л	7,4±0,50	7,2±0,54	6,6±0,63
Концентрация Na в плазме крови, ммоль/л	144,1±1,33	143,3±1,29	147,1±1,13
Концентрация K в плазме крови, ммоль/л	4,12±0,07	4,20±0,03	4,13±0,05

Поскольку в группу обследуемых больных включались только пациенты с ненарушенной азотвыделительной функцией почек, при определении концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови обследуемых больных, получили нормальные величины обсуждаемых показателей.

При оценке скорости клубочковой фильтрации выделяли три группы пациентов: первая группа — с нормальной скоростью клубочковой фильтрации, вторая — с гипофильтрацией и третья — с гиперфильтрацией.

В первую группу включили 16 человек, скорость клубочковой фильтрации у которых колебалась в нормальных пределах (100-120 мл/мин) и в среднем составила 112,27 ± 9,43 мл/мин. Вторую группу составили 83 больных с гипофильтрацией со средней величиной скорости клубочковой фильтрации 62,28 ± 10,04 мл/мин. В третью группу вошли 45 пациентов с гиперфильтрацией со средней скоростью клубочковой фильтрации 152,21 ± 13,2 мл/мин.

Помимо изменений показателей клубочковой фильтрации, клиническими проявлениями нефропатии у больных АГ и сахарным диабетом типа 2 являются прогрессирующая протеинурия и микроальбуминурия. Препараты, снижающие АД, но при этом не влияющие на протеинурию, как правило, не имеют самостоятельного нефропротективного эффекта. Исходя из этого, у больных с АГ и сахарным диабетом типа 2 исследовали суточную мочу для определения количества экскретируемого белка. У 79 пациентов была выявлена протеинурия (1760 ± 280 мг/сут), микроальбуминурия (180,9 ± 11,4 мг/сут.) определялась у 56 обследуемых больных.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что определение экскреции белка является необходимым условием оценки функционального состояния почек у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2. Из 16 пациентов с нормальными показателями СКФ у 8 была выявлена протеинурия и у 4 — микроальбуминурия. В этих случаях речь шла, скорее всего, о переходном состоянии от гиперфильтрации к гипофильтрации. При этом изолированная оценка скорости клубочковой фильтрации могла привести к ошибочному заключению о нормальном функциональном состоянии почек у наших пациентов.

В последние годы микроальбуминурия рассматривается не только в качестве предиктора развития ХПН и суррогатной точки в оценке нефропротективного действия антигипертензивных средств, но и как независимый фактор риска развития осложнений АГ [1].

На рис. 2 представлены данные метаанализа частоты развития осложнений у пациентов с АГ в зависимости от наличия микроальбуминурии.

В ходе оценки активности РААС в нашем исследовании удалось выделить две группы больных с АГ и сахарным диабетом типа 2: с низко- и норморенинoвым типом АГ. При этом наибольшее число больных имели низкую активность ренина плазмы и только у 23% пациентов наблюдалась нормальная активность фермента.

В то же время нами был выявлен дисбаланс внутри самой РААС. Так, при низкой активности ренина плазмы отмечались нормальные концентрации альдостерона и ангиотензина I, сопоставимые с таковыми у больных с нормальной активностью ренина плазмы. Результаты оценки активности РААС приведены в табл. 2.

При сравнительном анализе уровня АРП и клинических данных выявлялась отчетливая обратная зависимость между АРП и длительностью сахарного диабета типа 2. В то же время не было выявлено значимых взаимосвязей между АРП и длительностью АГ, полом, возрастом и величиной АД.

Для оценки реактивности РААС у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2 использовали пробу с диуретиком фуро-

семидом, являющимся активатором системы ренин ангиотензин альдостерон.

Исследования показали, что в ответ на прием 40 мг фуросемида в норме выделяется в среднем 1118,4 ± 96,75 мл мочи. В соответствии с этим, в зависимости от величины диуреза в ответ на прием фуросемида, были выделены три группы больных.

Первая группа, с нормальной диуретической реакцией, – диурез за 4 часа после приема фуросемида находился в пределах величин, полученных у здоровых лиц, и составил в среднем 904,5 ± 38,6 мл.

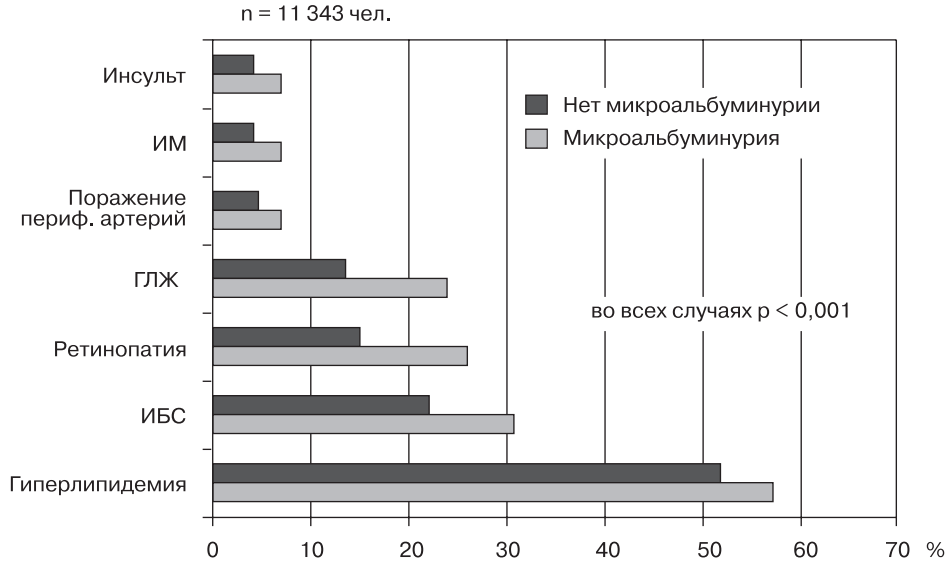


Рис. 2. Частота выявления сопутствующей паталогии при АГ в зависимости от наличия микроальбуминурии [*Luft, Agraval, J. Cardiovasc. Pharmacol., 1999*]

Таблица 2

Базальная активность показателей ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и АД у больных с АГ и СД 2 в зависимости от активности ренина плазмы

Показатели РААС	Все больные	Низкорениновые больные	Нормальные больные
АРП нг/мл/ч	1,17 ± 0,13	0,98 ± 0,06	1,60 ± 0,09*
AI нг/мл	0,54 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,57 ± 0,04
АЛД пг/мл	324,19 ± 23,23	257,70 ± 15,35	409,68 ± 21,13*
САД мм рт.ст.	186,0 ± 3,39	185,6 ± 5,4	186,6 ± 4,6
ДАД мм рт.ст	110,7 ± 1,57	109,3 ± 3,46	112,8 ± 2,7
СДАД мм рт.ст.	134,6 ± 2,11	134,9 ± 5,74	135,4 ± 4,61

Обозначения: АРП – активность ренина плазмы, AI – ангиотензин I, АЛД – альдостерон, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, СДАД – среднединамическое артериальное давление.

Примечание : * – показатели нормальной группы больных достоверно ($p < 0,001$) отличаются от показателей низкоренинового группы больных.

Вторая группа, с повышенной диуретической реакцией, – диурез существенно превышал нормальные величины и составил в среднем 1758,6 ± 92,8 мл. Эти больные были охарактеризованы как больные с гиперреакцией на фуросемид.

И, наконец, в третью группу были включены больные, диурез у которых за 4 часа после назначения фуросемида составил в среднем 483,3 ± 67,4 мл, что отражало снижение диуретической реакции в данной группе.

Дальнейший детальный анализ показал, что реактивность РААС после однократного приема фуросемида отличалась в зависимости от величины диуреза и базального уровня активности ренина плазмы.

Контрольные исследования, проведенные у 25 больных АГ без сахарного диабета, показали, что адекватный прирост активности ренина плазмы в ответ на усиление экскреции натрия под влиянием фуросемида составляет 35-40%. В соответствии с этим все пациенты были разделены на три группы в зависимости от типа реактивности РААС.

В первую группу, названную нами «гиперреакторы», были включены пациенты, у которых уровень прироста активности ренина плазмы превышал 40%. Учитывая значительные колебания прироста активности ренина плазмы в группе «гиперреакторов», мы разделили ее на 2 подгруппы: подгруппа А – 20 больных, прирост активности ренина плазмы у которых в среднем составил 60,1 ± 7,67%, и подгруппа В – 7 больных с приростом активности ренина плазмы в среднем 233,4 ± 72,1%. При наличии невысокого базального уровня активности ренина плазмы отмечали значительную гиперреактивность РААС. Подгруппа В состояла из пациентов с исходной гипоренинемией.

Вторая группа (69 человек) была сформирована из больных, имевших нормальный прирост активности ренина плазмы в ответ на повышенную экскрецию натрия. Данные больные были названы «нормореакторами». В среднем прирост активности ренина плазмы у обсуждаемых больных составил 39,8 ± 8,72%.

И, наконец, в третью группу (48 человек) были включены пациенты, имевшие низкий прирост активности ренина плазмы, составивший в среднем 15,9 ± 4,26%. Больные третьей группы были определены как «гипореакторы».

Динамика основных показателей РААС в зависимости от типа реактивности под влиянием фуросемида представлена в табл. 3.

Исходя из анализа реактивности РААС, выделили три группы больных для прове-

Таблица 3

Динамика показателей РААС в зависимости от типа реактивности на фоне проведения фармакологической пробы с фуросемидом у больных с АГ и СД2

Показатели	1 группа		2 группа	3 группа
	Подгруппа А	Подгруппа В		
АРП исходн.	0,99±0,19	0,81±0,09	1,68±0,13	1,02±0,10
(нг/мл/ч) п/фур.	1,58±0,15*	2,63±0,61*	2,29±0,16*	1,18±0,11
(%) прирост	60,1±7,67	233,4±72,1	39,8±8,72	15,9±4,26
AI исходн.	0,58±0,04	0,62±0,07	0,62±0,09	0,59±0,10
(нг/мл) п/фур.	0,69±0,06	0,74±0,09	0,79±0,06	0,78±0,10
АЛД исходн.	218,8±24,16	230,9±26,58	398,8±22,5	392,7±21,6
(пг/мл) п/фур.	290,0±29,20	319,3±34,21	519,4±29,1*	562,5±26,3*

Примечание: (*) - показатели достоверно ($p<0,05$) отличаются от исходных

дения патогенетически обоснованной антигипертензивной терапии.

Первая группа больных с гиперреактивной РААС требовала терапии, направленной на подавление системы. В такой ситуации мы считали целесообразным назначение ингибиторов АПФ. Данное предположение было подтверждено результатами фармакологической пробы с эналаприлом.

Во второй группе больных, имевших нормальную реактивность РААС, предполагалось проведение комбинированной терапии, включающей ингибиторы АПФ.

И, наконец, мы считали нецелесообразным назначение ингибиторов АПФ пациентам третьей группы, так как в данном случае отмечали пониженную реактивность РААС. В этой группе отмечалась положительная реакция на фармакологическую пробу с верапамилом.

Для подтверждения выдвинутых предположений о значении реактивности РААС в реализации эффектов антигипертензивных средств у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2 проводили патогенетически обоснованное лечение: в первой группе – монотерапия эналаприлом, во второй группе – эналаприлом в комбинации с верапамилом и в третьей группе – монотерапия верапамилом.

Результаты влияния среднесрочной дифференцированной антигипертензивной терапии пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2 на показатели САД/ДАД представлены на рис. 3.

Во всех группах дифференцированное назначение антигипертензивных препара-

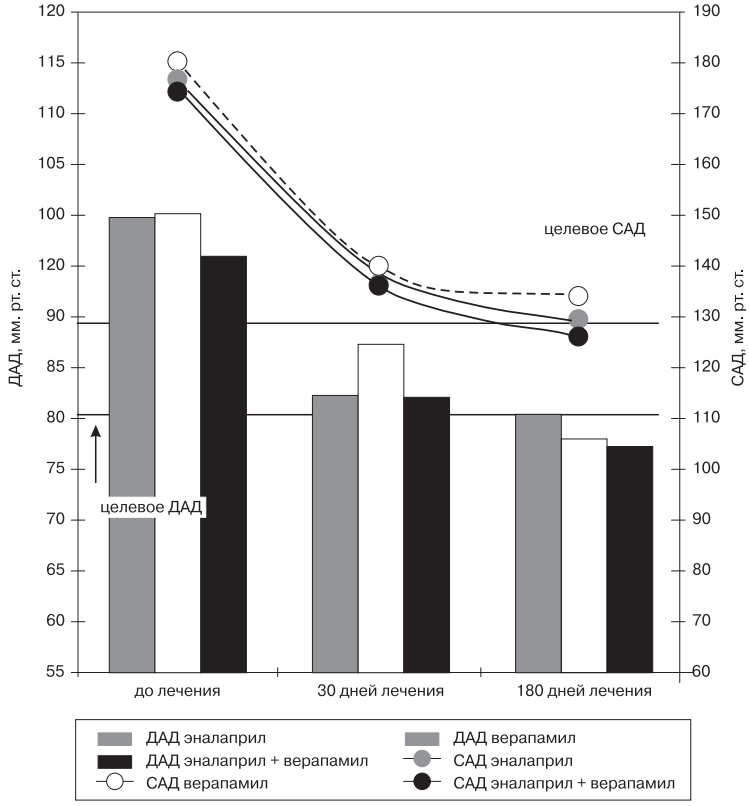


Рис. 3. Динамика показателей САД и ДАД на фоне дифференцированной антигипертензивной терапии пациентов с АГ и СД 2 типа

тов с учетом реактивности РААС сопровождалось достоверным снижением ($p < 0,001$) показателей САД и ДАД уже в течение первого месяца терапии, при этом достигались общепринятые целевые значения САД < 140 мм рт. ст. и ДАД < 90 мм рт. ст.

В дальнейшем на фоне антигипертензивной терапии эналаприлом, верапамилом и их комбинацией, проводимой в течение 6 месяцев, отмечали достижение целевых уровней АД, рекомендуемых для пациентов с АГ и сахарным диабетом. Только при назначении монотерапии верапамилом достигнутые уровни САД недостоверно превышали целевые значения для больных АГ и сахарным диабетом.

Важным аспектом оптимального выбора антигипертензивного препарата у пациентов с АГ и сахарным диабетом является влияние на показатели углеводного обмена. При всех вариантах антигипертензивной терапии на фоне неизмененного режима приема таблетированных сахароснижающих пероральных препаратов в нашем исследовании отмечали улучшение метаболизма глюкозы и снижение уровней инсулина в плазме крови.

При назначении эналаприла отмечали достоверное снижение ($p < 0,001$) концентрации глюкозы натощак (с $7,47 \pm 0,20$ до $5,98 \pm 0,10$ ммоль/л) и достоверное ($p < 0,001$) снижение концентрации инсулина в сыворотке крови до нормальных значений уже через 30 суток терапии (с $37,2 \pm 2,71$ до $18,6 \pm 1,58$ мкЕд/мл)

Применение верапамила сопровождалось уменьшением гликемии в плазме крови натощак с $7,3 \pm 0,122$ ммоль/л до $5,4 \pm 0,105$ ($p < 0,001$), концентрация инсулина в плазме крови снижалась с $35,4 \pm 2,30$ до $19,7 \pm 2,41$ мкЕд/мл ($p < 0,001$).

В группе получавших комбинированную терапию эналаприлом и верапамилом у пациентов отмечалось субкомпенсированное течение сахарного диабета. При этом на фоне проводимой терапии полная компенсация гликемии наступала к 30 суткам терапии, что сопровождалось достоверным снижением ($p < 0,002$) концентрации глюкозы натощак (с $6,09 \pm 0,12$ до $5,37 \pm 0,17$ ммоль/л).

Нормогликемические показатели у всех пациентов сохранялись на протяжении всего срока наблюдения.

Кроме того, проводимая терапия во всех группах сопровождалась устранением глюкозурии и существенным снижением суточного диуреза.

Помимо этого нами выявлено модуляторное влияние патогенетически обоснованной антигипертензивной терапии на РААС, что проявлялось в достоверном увеличении АРП и АЛД у гипоренинновых больных при практически неизменных показателях РААС у норморенинновых пациентов при всех вариантах терапии. Принимая во внимание, что именно гипоренинновые больные обладали наибольшей, патологической реактивностью РААС, становится понятным важное значение модуляторного эффекта антигипертензивной терапии на РААС.

При выборочном проведении фуросемидной пробы у пациентов с исходной гиперреактивностью РААС после 6-месячной терапии эналаприлом и у больных с гипореактивностью при назначении верапамила отмечали восстановление нормальной реактивности РААС при наличии норморенинемии в обеих изучаемых группах.

При анализе влияния дифференцированной антигипертензивной терапии на функциональное состояние почек выявлено отчетливое нефропротективное действие как эналаприла, так и верапамила, что проявилось в модуляторном влиянии на показатели скорости клубочковой фильтрации, достоверном снижении протеинурии и микроальбуминурии уже к 30 суткам терапии.

На рис. 4 представлена динамика изменения скорости клубочковой фильтрации на фоне дифференцированного применения эналаприла, верапамила и их

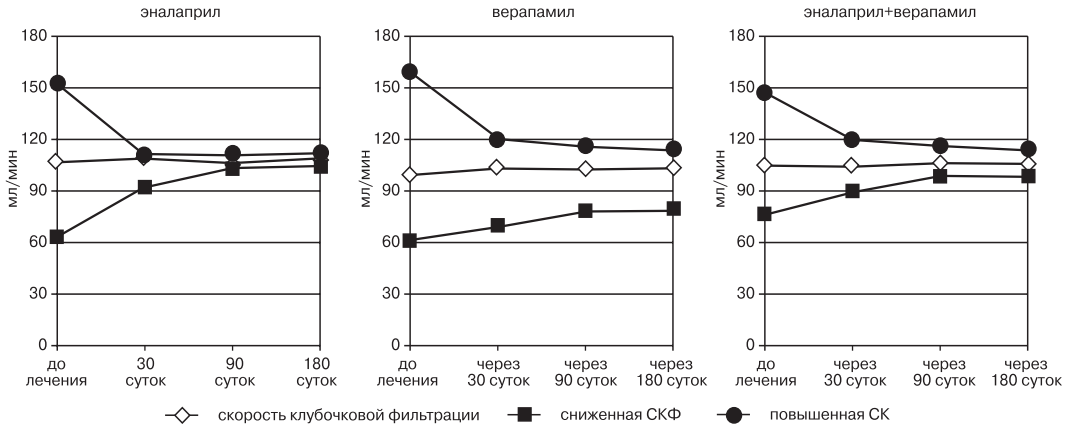


Рис. 4. Динамика СКФ на фоне антигипертензивной терапии у пациентов с АГ и СД 2 типа

комбинации. Назначение препаратов не влияло на скорость клубочковой фильтрации у пациентов с нормофильтрацией ни в одной группе.

Терапия эналаприлом в группе пациентов с АГ и сахарным диабетом с гипофильтрацией приводила к достоверному повышению ($p < 0,001$) скорости клубочковой фильтрации уже в течение первого месяца терапии, в дальнейшем скорость клубочковой фильтрации продолжала увеличиваться и к 180 суткам лечения достигала в среднем нормальных значений ($103,2 \pm 4,5$ мл/мин). Известно, что увеличение скорости клубочковой фильтрации у больных сахарным диабетом типа 2 является прогностически неблагоприятным, так как чем выше и дольше сохраняется гиперфильтрация, тем быстрее наступает истощение фильтрационной способности почек. На фоне назначения эналаприла получено достоверное ($p < 0,001$) снижение скорости клубочковой фильтрации до нормальных значений ($110,7 \pm 6,34$ мл/мин) у больных с гиперфильтрацией уже к 30 суткам терапии.

Назначение верапамила у больных с гипофильтрацией сопровождалось достоверным повышением ($p < 0,01$) скорости клубочковой фильтрации к 90 суткам терапии, в дальнейшем скорость клубочковой фильтрации сохранялась на субнормальном уровне. У пациентов с исходной гиперфильтрацией под влиянием терапии верапамилом наблюдали существенное снижение скорости клубочковой фильтрации ($122,1 \pm 7,60$ мл/мин) уже к 30 суткам терапии ($p < 0,002$).

При комбинированной терапии эналаприлом и верапамилом в группе больных с гипофильтрацией отмечали достоверное повышение ($p < 0,01$) скорости клубочковой фильтрации к 90 суткам терапии, при этом были достигнуты практически нормальные значения скорости клубочковой фильтрации ($101,2 \pm 5,1$ мл/мин). Отмечали и достоверное ($p < 0,002$) снижение скорости клубочковой фильтрации у больных с гиперфильтрацией уже к 30 суткам терапии.

На протяжении всего срока наблюдения достигнутые нормальные уровни скорости клубочковой фильтрации сохранялись во всех группах. Стабилизация показателей скорости клубочковой фильтрации сопровождалась достоверным снижением протеинурии ($p < 0,002$) и микроальбуминурии ($p < 0,01$) во всех группах пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2 на фоне дифференцированной антигипертензивной терапии. При этом антипротеинурический эффект был несколько более

выражен в группах, получавших комбинированную терапию ингибиторами АПФ и АКК (рис. 5). Нефропротективная активность верапамила в нашем исследовании была вполне сопоставима с таковой для эналаприла.

Если нефропротективным эффектам ингибиторов АПФ сегодня посвящено огромное количество публикаций, то значение АКК в защите почек от повреждения при АГ явно недооценивается.

Нефропротективные эффекты АКК в значительной степени связаны с влиянием на ауторегуляцию гломерулярного кровотока, поддерживаемого двумя основными механизмами. Один из них – сокращение афферентной артериолы в ответ на увеличение внутригломерулярного давления за счет активируемой растяжением деполяризации мембран гладкомышечных клеток и входа Ca2+. Другой механизм более сложный и определяется канальцево-клубочковой обратной связью – сигнал об изменении состава канальцевой жидкости на уровне плотного пятна передается на афферентный сосуд и приводит к активации потенциалзависимых Ca2+-каналов [17]. Такая система ауторегуляции почечной гемодинамики позволяет почке поддерживать скорость клубочковой фильтрации в широких пределах колебаний системного АД и регулировать перенос системного АД на капилляры клубочка.

В то же время различные представители АКК по-разному влияют на процессы ауторегуляции почечного кровотока. Так, дигидропиридиновые АКК (дАКК) нарушают естественную способность почек поддерживать этот механизм, приводя к выраженной дилятации афферентной артериолы и, таким образом, к линейной трансмиссии системного АД на капилляры клубочка. Поэтому даже при снижении системного АД гломерулярная гипертензия–гиперфильтрация может сохраняться. В результате, скорость клубочковой фильтрации в начале терапии дАКК остается на достаточном уровне или даже увеличивается, но в дальнейшем снижение функции почек прогрессирует более быстрыми темпами и в экспериментальных, и в клинических условиях [16].

Эти нарушения могут существенно усугубляться при одновременном действии ангиотензина II, в условиях активации системной или почечной РААС, приводя к усугублению гломерулярной гипертензии – важного механизма прогрессирования хронической болезни почек [14]. Именно поэтому дАКК не подходят в качестве монотерапии для решения задач нефропротекции

С другой стороны, недигилропиридиновые АКК (недАКК), так же, как и ИАПФ, в сравнении с дАКК не нарушают ауторегуляцию клубочкового кровотока,

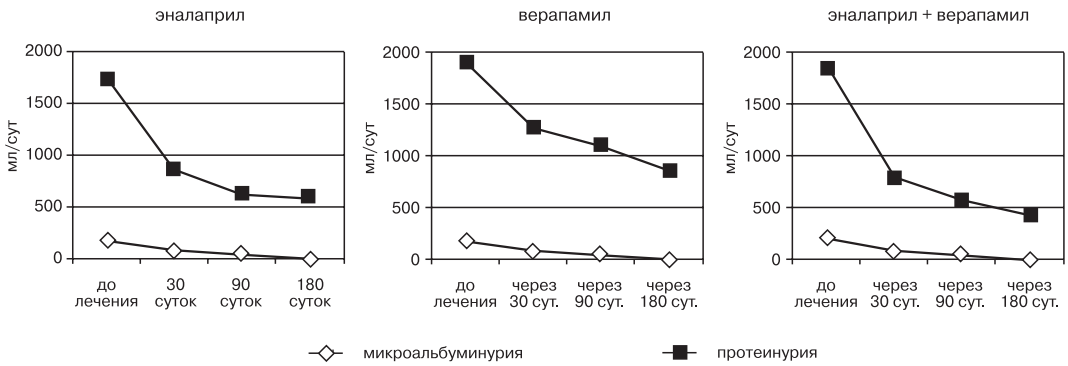


Рис. 5. Динамика СКФ на фоне антигипертензивной терапии у пациентов с АГ и СД 2 типа

поскольку в меньшей степени влияют на тонус приносящей артериолы [16].

Представления о нефропротективной эффективности различных представителей АКК далеко неоднозначны. В этом отношении наиболее показательной можно считать ситуацию с диабетической нефропатией. Именно для этой почечной патологии характерны нарушения ауторегуляции гломерулярного кровотока, опосредованные Ca2+-каналами L-типа, которые занимают одно из центральных мест в ее развитии и прогрессировании [14].

Дж. Бэкрис и др. показали, что недАКК (верапамил и дилтиазем) близки к ингибиторам АПФ (лизиноприлу) и значительно более эффективны, чем бета-блокаторы по антипротеинурическому действию и замедлению темпов снижения СКФ при среднем периоде наблюдения 63 ± 7 месяцев [11]. В то же время, исрадипин приводил к 50%-ному росту протеинурии при ДН на фоне сахарного диабета типа 2 [9]. Несмотря на одинаковую степень снижения АД, снижение протеинурии было более выраженным при применении ингибиторов АПФ (в среднем 45 %) и недАКК, но не нифедипина (в среднем 35 %) [18]. Наконец, в исследовании IDNT (The Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial) было отчетливо продемонстрировано, что амлодипин в сравнении с плацебо не дает никаких преимуществ в снижении риска прогрессирования диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом типа 2.

Восстановление нарушенной реактивности РААС у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2 с диабетической нефропатией, отмечаемое в нашем исследовании на фоне применения верапамила, позволяет рекомендовать применение недАКК на фоне гипореактивности РААС у данной группы больных.

Повышение клинической эффективности данной группы препаратов может быть достигнуто за счет комбинированной терапии АКК и средств, блокирующих РААС

Веским основанием для применения данной комбинации препаратов является существенная роль активации внутрипочечной РААС в прогрессировании хронической болезни почек. В то же время основные биологические эффекты ангиотензина II на клетки нефрона и гладкие мышцы опосредованы изменением концентрации внутриклеточного Ca2+ [15]. Поэтому обсуждаемое сочетание лекарств позволяет одновременно снизить локальную продукцию ангиотензина II (за счет действия ингибиторов АПФ) и уменьшить эффекты этой молекулы на пострецепторном уровне за счет действия АКК.

Комбинированная терапия периндоприлом и верапамилом приводила к более быстрому и достоверному увеличению линейной и объемной скорости кровотока во внутрипочечных сосудах при снижении системного АД, что свидетельствует о более значительном снижении постгломерулярного сопротивления [3]

Кроме того, комбинированная терапия ингибиторами АПФ и недАКК имеет хорошие перспективы и может привести к усилению нефропротективного эффекта за счет потенцирования антипролиферативного эффекта, блокады действия эндотелина, снижения проницаемости гломерулярных базальных мембран и протеинурии. Существенное значение имеет и усиление системного антигипертензивного эффекта, который часто необходим при нефрогенной АГ [4].

В настоящее время мы располагаем результатами только небольшого количества работ по сравнительному анализу эффекта комбинированной терапии АКК/ингибиторы АПФ и монотерапии этими препаратами у больных с диабетической нефропатией. Тем не менее, эти исследования позволяют сделать предварительный вывод о потенцировании эффектов и усилении нефропротективного действия сочетания препаратов, блокирующих вход Ca в клетку и снижающих активность РААС.

Так, сочетание ингибиторы АПФ/АКК эффективно для контроля АД при использовании более низких доз препаратов. В нашем исследовании при комбинации эналаприла и верапамила адекватное антигипертензивное действие наблюдалось при снижении суточной дозы ингибиторов АПФ и АКК на 37 и 25 % соответственно по сравнению с дозами, применяемыми при монотерапии этими препаратами. Последнее обстоятельство имеет особое значение, поскольку позволяет снижать риск побочных эффектов от высоких доз препаратов при монотерапии и уменьшать стоимость лечения, наряду с потенцированием желательных эффектов.

Наши данные также свидетельствуют о достоверно более выраженном снижении протеинурии при совместной терапии верапамилом и эналаприлом в сравнении с монотерапией ингибиторами АПФ у больных с диабетической нефропатией на фонесахарного диабета типа 2.

Выводы

1. Изучение функциональной активности почек у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2 показало, что развитие процессов органодеструкции с формированием диабетической нефропатии возникает в данной группе больных на ранних стадиях заболевания и требует адекватной терапии в целях профилактики развития хронической почечной недостаточности.
2. Изучение параметров реактивности системы ренин-ангиотензин-альдостерон у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2 показало наличие на фоне нормо- или гипоренинемии в данной группе больных подгрупп с гипо-, нормо- и гиперреакцией РААС.
3. Для коррекции АГ у пациентов с гиперреактивностью РААС показано назначение эналаприла, при гипореактивности целесообразно применение пролонгированного верапамила. Комбинированная терапия эналаприлом и верапамилом показана в случае нормальной реактивности РААС у пациентов с АГ и сахарным диабетом типа 2.
4. Дифференцированное назначение эналаприла, верапамила и их комбинации пациентам с АГ и сахарным диабетом типа 2 на основе анализа параметров реактивности системы ренин-ангиотензин-альдостерон сопровождается на фоне восстановления нормальной реактивности РААС достижением целевых значений САД/ДАД, улучшением параметров системной гемодинамики, отчетливым нефропротективным действием и корригирующим влиянием на показатели углеводного обмена.

Литература

1. *Арутюнов Г.П., Чернявская Т.К., Лукичева Т.И. и др*. Микроальбуминурия: клинические аспекты и пути медикаментозной коррекции. *Клин. фарм. и тер. 1999. № 8, с. 23-28.*
2. *Дедов И.И., Шестакова М.В., Миленькая Т.М.* Сахарный диабет: ретинопатия, нефропатия. М.: Медицина. 2001.
3. *Добронравов В.А.* Современные подходы к диагностике и лечению диабетической нефропатии (пособие для врачей). *Нефрология. 2003. №2, с. 93-100.*
4. *Зонис Б.Я., Волкова Н.И., Соколов О.Ю.* Влияние эднита на активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и функцию почек у больных артериальными гипертониями в сочетании с сахарным диабетом. *Терапевтический архив. 2000. № 2, с. 53-55.*
5. *Мухин Н.А.* Современная нефропротективная стратегия лечения хронических прогрессирующих заболеваний почек. *Клин. фармакол. тер. 2001. № 11. С. 58-62.*
6. *Постнов Ю.В.* О роли недостаточности митохондриального энергообразования в развитии первичной гипертензии: нейрогенная составляющая патогенеза гипертензиии. *Кардиология. 2004. №9, с. 18-22.*
7. *Шестакова М.В., Кутырина И.М.* Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермен-

та при заболеваниях почек. *Кардиология. 2002. №9, с. 27-29.*

8. *Шулутко Б.И.* Артериальная гипертензия 2000. СПб., 2001. – 304 с.
9. *Bakris G., Copley J., Vicknair N. et al.* Calcium channel blockers versus other antihypertensive therapies on progression of NIDDM associated nephropathy. *Kidney Int 1996. Vol. 50. P. 1641-1650.*
10. *Bakris G., Williams M., Dworkin L. et al.* Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. *Am J Kid Dis. 2000. Vol.36. P. 646–661.*
11. *Brenner B., Mackenzie H.* Nefron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int. 1997. Vol. 52 (Suppl 63). P. 124-127.*
12. *Brenner B.M.* The history and future of renoprotection. *Kidney Int. 2003. Vol. 64(4). P. 1163-1167.*
13. *Brown M.J., Castaigne A., de Leeuw P.W., et al.* Influence of diabetes and type of hypertension on response to antihypertensive treatment. *Hypertension. 2000. V. 35. P. 1038–1042.*
14. *Carmines P.K., Ohishi K., Ikenaga H.* Functional impairment of renal afferent arteriolar voltage-gated calcium channels in rats with diabetes mellitus. *J Clin Invest. 1996. Vol. 98. P. 2564-2571.*
15. *Kim S., Iwao H.* Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev. 2000. Vol. 52(3). P. 11-34.*
16. *Kvam F., Ofstad J., Iverson B.M.* Effects of antihypertensive drugs on autoregulation of RBF and glomerular capillary pressure in SHR. *Am J Physiol. 1998. Vol. 275. P. 576-584.*
17. *Navar L.G.* Integrating multiple paracrine regulators of renal microvascular dynamics. *Am J Physiol Renal Physiol. 1998. Vol. 274. P.433-444.*
18. *Weidmann P., Schneider M., Bohlen L.* Therapeutic efficacy of different antihypertensive drugs in human diabetic nephropathy: An updated metanalysis. *Nephrol Dial Transplant. 1995. Vol. 10 (Suppl9). P. 39-45.*
19. *Winer N., Sowers J.* Vascular complicance in diabetes. *Curr Diab Rep. 2003. Vol. 3. P. 230-234.*

SELECTION OF ANTIHYPERTENSIVE THERAPY IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS ON THE BASIS OF STUDUING RAAS REACTIVITY

O.Yu. Sokolov, N.I. Volkova

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don

In pharmacological test with furosemide, there has been evaluated reactivity of renin-angiotensin-aldosteron system in patients with type 2 diabetes mellitus. This allowed us to reveal patients with normal reactivity and with hypo- and hyperreactivity of RAAS. Acording to parameters of RAAS reactivity the regimens of antihypertensive therapy were developed. Indices of hemodynamics, carbohydrate metabolism and renal activity were evaluated before and after pathogenetically substantiated 180-day antihypertensive therapy through. The results obtained indicate high antihypertensive activity, hemodynamic stabilization, improvement of carbohydrate metabolism and nephrotective activity under differentiated assignment of antihypertensive drugs based on parameters of RAAS reactivity.

Key words: antihypertensive drugs, renin-angiotensin-aldosteron system, type 2 diabetes mellitus.

Оценка влияния антигипертензивных средств на показатели ауторегуляции мозгового кровотока как основа оптимального выбора препарата с позиции нейропротекции

О.Ю. Соколов, А.В. Харахашян

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

В настоящем исследовании представлены данные сравнительного изучения влияния различных классов антигипертензивных средств на параметры ауторегуляции мозгового кровотока (МК) у пациентов с артериальной гипертензией (АГ) и менопаузальным синдромом с высоким риском развития мозгового инсульта.

Антигипертензивная активность препаратов оценивалась по показателям суточного мониторирования артериального давления (СМАД). Состояние МК изучали методом транскраниальной допплерографии. Оценка состояния ауторегуляции МК проводилась по индексам реактивности, оцениваемым в условиях гипо-гипер капнической проб. Результаты исследования продемонстрировали, что при сопоставимом снижении артериального давления (АД) различные антигипертензивные препараты не одинаково эффективны в плане коррекции показателей МК. Лизиноприл и небиволол восстанавливают нарушенную реактивность сосудов головного мозга, амлодипин и метопролол не изменяют нарушенные параметры ауторегуляции МК у пациентов с АГ.

Ключевые слова: антигипертензивные средства, мозговой кровоток, нейропротекция.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) указала на высокое АД как на одну из наиболее важных предупреждаемых причин преждевременной смерти во всем мире [9].

Известно, что головной мозг является одним из основных органов-мишеней АГ. Взаимосвязь между АГ и фатальными и нефатальными нарушениями мозгового кровообращения сегодня очевидна. По данным Регистра инсульта НИИ неврологии РАМН, АГ была диагностирована у 78,2% больных, перенесших инсульт.

При этом инсульт сегодня занимает третье место среди болезней, приводящих к смертельному исходу, и является наиболее распространённой причиной постоянной нетрудоспособности во всём мире. В России цереброваскулярные заболевания находятся на втором месте в числе основных причин смертности, составляя 37,7% всех фатальных исходов. В 2002 году от инсульта погибли 6,48 млн. жителей планеты [8]. Ежегодно в мире регистрируется около 20 млн. инсультов. Кроме того, на сегодняшний день насчитывается более 50 млн. в больных, перенесших инсульт. В 2004 г. прямые и косвенные затраты на лечение инсультов только в США составили 53,6 миллиардов долларов. И хотя 75% инсультов не заканчиваются летальным исходом, эта болезнь оказывает значительное влияние на всё общество, поскольку более трети больных являются нетрудоспособными – они постоянно требуют постороннего ухода. В зависимости от локализации поражения мозга, у больных могут сохраняться выраженные нарушения речи, чувствительности, когнитивных функций, параличи.

Антигипертензивная терапия рассматривается сегодня как один из главных методов предупреждения развития инсультов.

В последние годы в нашей стране в рамках программ, проводимых на крупнейших металлургических комбинатах России (НИИ неврологии РАМН), а также по проекту MONICA (кардиоцентр МЗ РФ), за 3-4 года было достигнуто 45-50%-ное сниже-

ние заболеваемости инсультом у обследованных групп преимущественно за счет контроля артериальной гипертонии [2].

В этой связи становится понятным интерес к проблеме оптимального выбора антигипертензивных средств с позиции нейропротекции у пациентов с АГ и нарушениями церебрального кровотока.

При этом следует помнить о том, что у пациента с АГ функционируют механизмы природной органопротекции. Одним из важных защитных факторов в условиях АГ являются механизмы ауторегуляции сосудистого тонуса, обеспечивающие гибкую адаптацию систем органного кровообращения к патологически измененным гемодинамическим параметрам.

Благодаря наличию феномена ауторегуляции, изменение системного АД сопровождается колебанием церебрального кровотока, но в оптимальных для мозга пределах, получивших название «церебральный гемодинамический резерв». Церебральный гемодинамический резерв отражает состояние компенсаторных вазодилатирующих возможностей сосудистой системы мозга. Для его оценки обычно используются показатели реактивности, которые определяются по изменению МК или линейной скорости кровотока при проведении функциональных проб (гипогиперкапнических или фармакологических – с диакарбом, нитроглицерином, нитрендипином, и т.д.), вызывающих вазодилатацию или вазоконстрикцию.

На сегодняшний день известно несколько уровней регуляции мозгового кровообращения — это системное АД, нервно-рефлекторные воздействия, метаболизм в сосудистой стенке и периваскулярных тканях. Они отражают соответственно миогенный, нейрогенный и метаболический механизмы регуляции постоянства церебрального кровотока. При этом ведущая роль принадлежит миогенному звену, как наиболее «быстрому» сосудистому механизму. В результате его включения при повышении АД происходит сужение церебральных сосудов мышечного типа, а при снижении — их расширение [6].

Нижняя граница ауторегуляции — это уровень среднего АД, меньше которого скорость мозгового кровотока оказывается недостаточной, чтобы поддерживать метаболические потребности мозга. Как показали исследования, у здорового человека это происходит при снижении среднего АД ниже 50-70 мм рт. ст. При этом, несмотря на уменьшение мозгового кровотока, доставка кислорода к головному мозгу может до определенного момента поддерживаться на достаточном уровне благодаря увеличению экстракции кислорода из крови тканью мозга. Но если среднее АД снижается ниже 30-40 мм рт. ст., повышение экстракции кислорода из крови тканью головного мозга перестает компенсировать снижение мозгового кровотока. В результате развиваются симптомы церебральной ишемии.

Верхний предел ауторегуляции мозгового кровотока определяется как уровень среднего АД, при превышении которого скорость мозгового кровотока начинает возрастать. У лиц с нормальным АД это происходит при повышении среднего АД выше 130-150 мм рт. ст. В этом случае высокое перфузионное давление преодолевает сопротивление резистивных мозговых артерий и развивается «силовая» дилатация мозговых артерий, которая сопровождается резким возрастанием мозгового кровотока, отеком головного мозга и нарушением гематоэнцефалического барьера. При дальнейшем повышении АД происходит срыв реакций ауторегуляции с развитием феномена гиперперфузии мозга. Сосуды расширяются, происходит избыточный выход жидкой части крови в межклеточное пространство, развивается периваскулярный отек, а затем отек и набухание вещества мозга.

При длительно существующей АГ возникает не только функциональная, но и

структурная адаптация сосудистого русла, заключающаяся первоначально в тоническом сужении, а затем в ремоделировании сосудов в виде утолщения стенок артериол за счет гипертрофии медии, уменьшении отношения просвет/ толщина стенки, потере эластичности и уменьшении проницаемости сосудов, В результате происходит одновременное смещение верхней и нижней границ АР к более высоким цифрам и сужение «церебрального гемодинамического резерва». На этом фоне даже незначительные колебания АД могут привести к дискоординации механизмов ауторегуляции, при которой МК начинает изменяться пассивно вслед за изменением АД. Это, в свою очередь, увеличивает риск развития острых нарушений МК [7].

Оценка влияния антигипертензивных препаратов на параметры ауторегуляции сосудистого тонуса — органов мишеней у пациентов с АГ становится важной задачей исследований клинической фармакологии антигипертензивных средств. Антигипертензивные препараты, которые пациент вынужден применять в течение длительного времени должны как минимум не ухудшать работу ауторегуляторных адаптивных систем. Именно такой подход в оптимизации выбора режима антигипертензивной терапии представляется сегодня наиболее целесообразным с позиции органопротекции.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка влияния антигипертензивных препаратов на показатели ауторегуляции мозгового кровообращения у пациентов с высоким риском развития мозгового инсульта. Учитывая высокий риск развития цереброваскулярных осложнений АГ у женщин в период пери и постменопауы, нами было проведено изучение влияния антигипертензивных препаратов на состояние МК и параметров его ауторегуляции у данной категории больных.

Материалы и методы

В исследование были включены 132 женщины с АГ и менопаузальным синдромом. Основная группа больных с АГ в перименопаузе состояла из 112 женщин. Контрольную группу составили 20 женщин с менопаузальным синдромом без АГ.

После предварительного обследования больные основной группы случайным образом были распределены на 4 подгруппы по 28 человек. Первая группа получала лизиноприл (диротон) в дозе 10-20 мг/сут., вторая – небиволол (небилет) 5-10 мг/сут., третья – амлодипин (нормодипин) в дозе 5-10 мг/сут., четвертая – метопролол (эгилок) 50-100 мг/сут.

Для оценки антигипертензивной активности препаратов проводилось суточное мониторирование АД с помощью прибора АВРМ-04 (Meditech, Венгрия) по стандартным методикам [5]. Рассчитывались стандартные показатели СМАД: минимальное, максимальное, среднее систолическое (САД) и среднее диастолическое (ДАД) АД, средняя ЧСС в течение суток, периода бодрствования и ночного сна.

«Нагрузка давлением» оценивалась по индексу времени (ИВ) и индексу площади (ИП). Вариабельность АД в период бодрствования и ночного сна определяли как стандартное отклонение от среднего значения. Выраженность двухфазного циркадного ритма оценивали по суточному индексу (СИ).

Состояние церебрального кровотока изучалось с помощью ультразвуковой допплерографии (УЗДГ) экстракраниальных артерий и транскраниальной допплерографии (ТКДГ) интракраниальных артерий. Исследования проводились на УЗ-сканере ASPEN (Acuson, США).

Для оценки мозгового кровотока с помощью транскраниальной допплерографии определялись:

1. Пиковая систолическая скорость (*Vps*).
2. Конечная диастолическая скорость (*Ved*).

3. Усредненная по времени максимальная скорость кровотока (TAMX).
4. Расчетные индексы, отражающие сопротивление сосудов:

– пульсаторный индекс Гослинга (*PI*): $PI = Vps - Ved/TAMX$,

– резистивный индекс Пурселло (*RI*); $RI = Vps - Ved/Vps$,

– систолодиастолический индекс(*S/D*); $S/D = Vps/Ved$.

Функциональное состояние сосудистой системы мозга оценивали путем определения цереброваскулярной реактивности. Для этого использовали функциональные нагрузочные пробы (гипер- и гипокапническая пробы). По их результатам рассчитывали индексы реактивности. С целью оценки способности сосудов к вазодилатации и вазоконстрикции рассчитывали коэффициенты реактивности на гиперкапническую пробу $Kp+: = V+/Vo$ и на гипокапническую пробу $Kp = 1 - V/Vo$. Кроме того, рассчитывали индекс вазомоторной реактивности ИВМР $= V + -V/Vo \times 100\%$ и коэффициент ассиметрии мозгового кровотока КА $= Vd - Vs/Vd \times 100\ \%$, где *Vo* – средняя фоновая линейная скорость кровотока (ЛСК), *V*+ – средняя ЛСК на фоне гиперкапнической нагрузки, *V′* – средняя ЛСК на фоне гипокапнической нагрузки, *Vd* – фоновая средняя ЛСК в правой СМА, *Vs* – фоновая средняя ЛСК в левой СМА.

Динамику клинических проявлений менопаузального синдрома оценивали с помощью модифицированного менопаузального индекса Купермана в модификации Уваровой (1996) с раздельным анализом нейровегетативных, метаболических и психоэмоциональных симптомов

Для статистической обработки данных использовали пакеты программ Microsoft Access 2000, Microsoft Excel 2000. Анализ полученных в процессе работы показателей проводили с помощью программы БИОСТАТ 4.03 [3], а также модуля Basic Statistics/Tables программы STATISTICA 5.0 [1]. Достоверность межгрупповых различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Достоверность различий между показателями оценивали по критериям Уилкоксона, Манна-Уитни. Полученные различия считали статистически значимыми при значениях критерия $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По результатам суточного мониторирования АД были отобраны пациентки, у которых среднее АД за день превышало 140/90 мм рт. ст. или среднее АД за ночь было выше 120/80 мм рт. ст. Данные СМАД приведены в табл. 1.

При анализе полученных результатов была выявлена повышенная вариабельность САД и ЧСС днем и ДАД за сутки. При этом ночное повышение вариабельности ДАД носило достоверный характер. Также обнаружено достоверное повышение пульсового АД (ПАД) на $14 \pm 4,2\%$ за ночные часы, которое в норме составляет 60 мм рт. ст.

Суточный ритм АД – один из валидных показателей АД, имеющих серьезную прогностическую значимость и определяемый с помощью СМАД. В связи с этим при обработке данных СМАД проведен анализ суточного профиля АД. Оказалось, что в среднем у 71,2% больных, помимо повышения АД, наблюдалось также нарушение циркадного ритма АД, причем чаще всего отмечалось недостаточное ночное снижение АД (рис. 1). Этот показатель отражает раннее вовлечение артерий эластического типа в процесс сосудистой перестройки при формировании АГ с менопаузальным син-

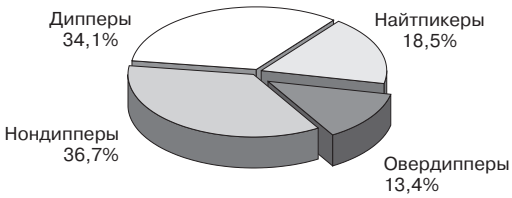


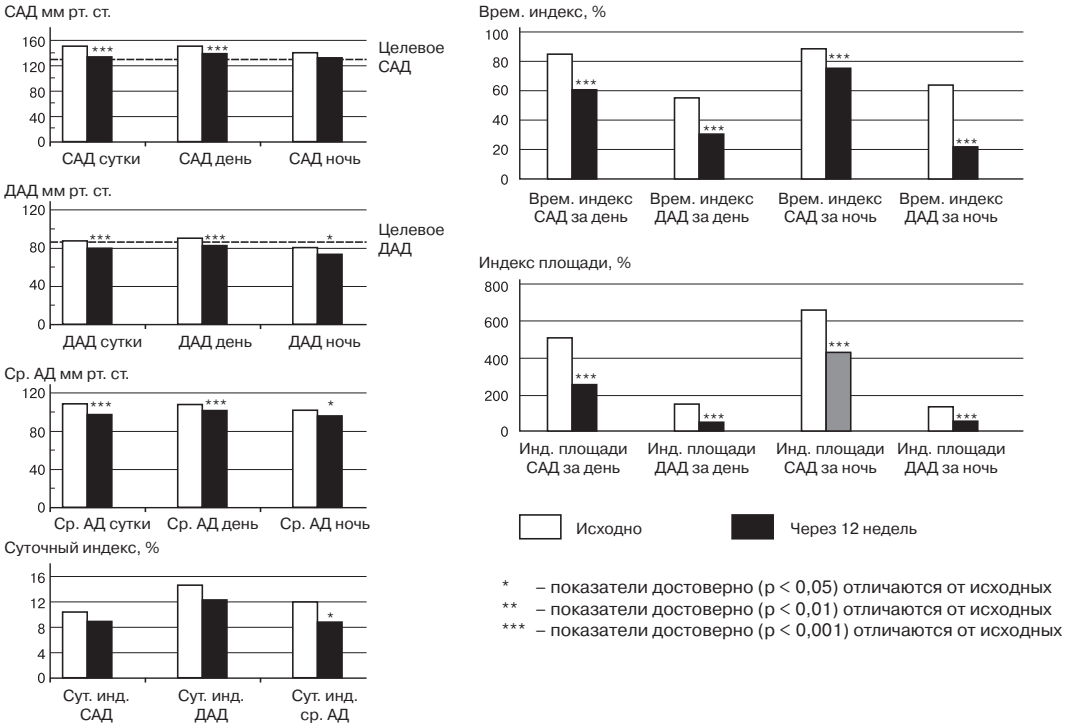
Рис. 1. Распределение больных с АГ и менопаузальным синдромом по степени ночного снижения АД

Таблица 1

Характеристика показателей суточного профиля АД у пациенток с АГ и менопаузальным синдромом (по результатам СМАД)

Показатели	Контрольная группа (n = 20), M±m	Основная группа (n = 112), M±m	p
САД за сутки, мм.рт.ст.	110,7±6,7	161,9±11,09	0,000
САД днем, мм.рт.ст.	114,4±7,4	166,4±11,52	0,000
САД ночью, мм.рт.ст.	103,1±6,1	153,5±11,84	0,000
ДАД за сутки, мм.рт.ст.	69,4±5,7	94,24±6,69	0,000
ДАД днем, мм.рт.ст.	72,8±6,2	98,34±8,40	0,000
ДАД ночью, мм.рт.ст.	62,6±5,4	84,9±18,35	0,000
СрАД за сутки, мм.рт.ст.	90,5±7,4	113,9±8,14	0,000
СрАДднем, мм.рт.ст.	94,2±8,8	117,4±8,4	0,000
СрАД ночью, мм.рт.ст.	82,3+5,8	105,6±8,89	0,000
ПАДднем, мм.рт.ст.	44,3±5,2	68,8+10,45	0,000
ПАД за сутки, мм.рт.ст.	44,9±7,3	69,96±10,5	0,000
ПАД ночью, мм.рт.ст	42,4±5,6	68,45±10,9	0,000
Коэф. вариабельности САД за сутки	8,2±1,2	14,7±2,92	0,000
Коэф. вариабельности ДАД за сутки	7,2±0,8	14,41± 2,68	0,000
Коэф. вариабельности ЧСС за сутки	10,3±4,2	12,83±2,79	0,000
Коэф. вариабельности САД за день	9,9±1,6	16,23±2,34	0,000
Коэф. вариабельности ДАД за день	8,3±1,3	14,43±2,77	0,000
Коэф. вариабельности ЧСС за день	12,5±5,1	15,47±2,48	0,000
Коэф. вариабельности САД за ночь	9,5±1,6	12,61 ±2,41	0,001
Коэф. вариабельности ДАД за ночь	7,8±1,1	14,29±3,69	0,001
Коэф. вариабельности ЧСС за ночь	7,0±4,2	8,84±3,04	0,008
НС САД, % НС ДАД, %	12,8±2,8 15,9±4,2	10,49±5,30 12,07±7,73	0,06 0,033
НС ЧСС, %	8,8±3,6	9,41 ±3,26	0,044
Показатель двойного произведения за сутки	7610,1±210,1	8409±865,8	0,001
Показатель ДП за день	7961±169,2	9122±1086	0,000
Показатель ДП за ночь	5541,3±198,9	7001±918	0,000
ИВ сист. АД день, %	7,2±3,4	90,03±10,93	0,000
ИВ диаст АД день, %	5,2± 2,3	95,19±10,05	0,000
ИП сист. АД день	0,0± 0,1	577±221,9	0,000
ИП диас АД день	0,1±0,1	745,2±267,1	0,000
ИВ сист АД ночь, %	4,2±2,8	67,06± 23,33	0,000
ИВ диаст АД ночь, %	3,7±1,5	65,41±24,31	0,000
ИП сист. АД ночь	0,2±0,4	230,3±145,9	0,000
ИП диаст. АД ночь	0,1±0,1	188,9±131,2	0,000

дромом, так как считается, что у женщин в данный период ПАД повышается вследствие ригидности крупных артерий [10]. Исследованиями последних лет показали, что пульсовое давление — независимый предиктор сердечно-сосудистой смертности у мужчин с нормальным и повышенным АД и у женщин с гипертензией.



* – показатели достоверно ($p < 0,05$) отличаются от исходных
** – показатели достоверно ($p < 0,01$) отличаются от исходных
*** – показатели достоверно ($p < 0,001$) отличаются от исходных

Рис. 2. Динамика показателей АД по результатам СМАД при лечении лизиноприлом женщин с АГ и менопаузальным синдромом

Результаты изучения антигипертензивной активности лизиноприла у женщин с АГ и менопаузальным синдромом по данным СМАД привелены на рис. 2.

На фоне антигипертензивной терапии лизиноприлом произошло достоверное снижение среднеарифметического показателя САД с 160,0 ± 6,94 до 145,45 ± 9,48 мм рт. ст. и среднеарифметического показателя ДАД с 94,4 ± 5,81 до 84,94 ± 3,99 мм рт. ст., который к концу 12-й недели лечения достиг нормы. За день эти показатели снизились соответственно с 162,2 ± 8,95 до 147,0 ± 8,58 мм рт. ст. и с 96,5 ± 6,98 до 88,58 ± 2,92 мм рт. ст., а за ночь — САД со 151,1 ± 19,89 до 141,1 ± 11,57 мм рт. ст., ДАД с 87,8 ± 5,33 до 79,63 ± 5,84 мм рт. ст. Следует отметить, что на фоне лечения отмечена различная динамика показателей вариабельности АД в зависимости от исходных их значений. У больных с исходно нормальной вариабельностью АД она не изменялась, а у больных с исходно повышенной вариабельностью происходило ее снижение, и при повторном СМАД показатели вариабельности САД, ДАД, СрАД, ЧСС соответствовали нормальным величинам. При этом коэффициент вариабельности САД за ночь достоверно снизился с 12,05 ± 1,45 до 10,61 ± 1,02, а коэффициент вариабельности ДАД за сутки — с 14,19 ± 0,94 до 13,47±1,9 и за ночь с 14,35 ± 1,79 до 12,63 ± 1,7. В результате терапии лизиноприлом индекс времени САД за день с 89,93 ± 9,62% уменьшился до 65,5 ± 11,82%, а за ночь — с 96,83 ± 4,68% до 79,81 ± 12,94%. Для ДАД эти цифры уменьшились соответственно с 59,51 ± 13,97 до 34,18 ± 12,82% и с 67,79 ± 20,79 до 26,89% измерений ночью соответственно, то есть ДАД за все изучаемые временные отрезки достигло нормальных величин.

Следует отметить, что большинство женщин отмечали улучшение клинического самочувствия (уменьшение головных болей, головокружений, повышенной возбудимости, восстановление сна, исчезновение болей в области сердца) уже на 3-4 сутки от начала терапии, что, по-видимому, связано с церебральными эффектами препарата. Это было подтверждено и результатами анкетирования с помощью ММИ, проведенного повторно спустя 12 недель после антигипертензивной терапии, по данным которого выраженность климактерических симптомов достоверно уменьшилась, в основном за счет уменьшения нейровегетативных проявлений. Существенное снижение ММИ с 37,1 ± 6,9 до 30,68 ± 8,1 позволило перейти женщинам через 12 недель терапии лизиноприлом из группы со средней тяжестью климактерических расстройств в группу легкого течения климакса.

Положительное влияние лизиноприл оказывал на суточную кривую АД. Оказалось, что количество больных с суточным профилем АД типа диппер увеличилось на 14%, а типа нондиппер — на 7,8%, за счет уменьшения количества найтпикеров (на 12,1%) и овердипперов, которые прогностически наиболее неблагоприятны в плане развития цереброваскулярной патологии на 9,7% (рис. 3). Таким образом, назначение лизиноприла женщинам с АГ в пери- и постменопаузе в среднесуточной дозе 10-20 мг в день приводит не только к достоверному снижению среднесуточных показателей САД и ДАД, уменьшению исходно повышенной вариабельности ДАД за сутки и за ночь, достоверному снижению нагрузки временем и давлением, но и улучшает суточный профиль АД, максимально приближая его к физиологическому уровню.

Однако основной задачей исследования была оценка влияния антигипертензивной терапии лизиноприлом на показатели ауторегуляции МК. Наиболее выраженные изменения со стороны МК у женщин с АГ и менопаузальным синдромом отмечались в системе интракраниальных артерий.Так, в СМА, ПМА и ЗМА справа имели место повышение систолической и средней скорости кровотока. При этом изменения систолической скорости носили достоверный характер. В то же время в СМА и ПМА справа был достоверно повышен индекс сопротивления *RI*, тогда как в левых СМА и ПМА показатели сопротивления были достоверно ниже нормальных величин. В ЗМА показатели сопротивления были ниже, а систолодиастолический коэффициент был выше нормы. Полученные данные свидетельствуют о неадекватности компенсаторно-приспособительных реакций и гиперперфузии в вертебробазилярном бассейне. Известно, что АГ — одна из основных причин, оказывающих наибольшее влияние на состояние функционального цереброваскулярного резерва. У пациенток с АГ и менопаузальным синдромом, со стороны реактивности церебральных артерий в исходном состоянии отмечалось снижение способности церебральных артерий к вазоконстрикции и нормальная или сниженная способность к вазодилатации.

На фоне 12 недель приема лизиноприла и описанного выше снижения АД церебральная гемодинамика претерпела изменения: отмечалось достоверное уменьшение систолической скорости кровотока в обеих СМА. В то же время повышенное сопро-

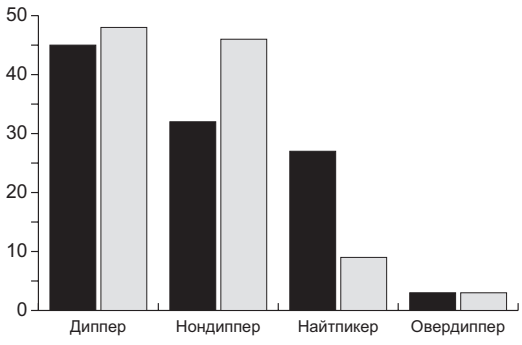


Рис. 3. Динамика суточного профиля АД под влиянием терапии лизиноприлом

тивление в правой СМА снизилось, а сниженное слева – повысилось. При этом в правых СМА показатели достигли нормальных значений. В ПМА справа систолическая скорость кровотока снизилась с 0,99 ± 0,12 до 0,96 ± 0,09 см/с, а средняя увеличилась с 0,61 ± 0,05 до 0,63 ± 0,06 см/с. Индексы *PI* и *RI* уменьшились соответственно с 0,84 ± 0,053 до 0,82 ± 0,13 и с 0,56 ± 0,03 до 0,52 ± 0,04. В то же время, в ПМА слева на фоне достоверного снижения до нормальных величин систолической скорости кровотока исходно сниженные индексы сопротивления повысились, а *PI* стал даже выше нормальных значений. В ЗМА справа на фоне терапии отмечено увеличение систолической и средней скорости кровотока и *PI*, причем средняя скорость и *PI* повысились и достигли нормальных величин. Слева на фоне снижения систолической и повышения средней скорости кровотока исходно сниженные показатели сопротивления достоверно увеличились.

Как видно из полученных данных, под влиянием проводимой терапии в интракраниальных сосудах происходят неодинаковые изменения. Более того, в симметричных сосудах они могут носить даже разнонаправленный характер. Однако при детальном рассмотрении оказалось, что все они направлены на реадаптацию МК к изменившимся параметрам АД. Так, для предотвращения гипоперфузии в левом полушарии, более важном для основной массы людей, в условиях снижения исходно повышенного АД сопротивление СМА и ПМА слева повысилось, а справа снизилось. Это сопровождалось и нормализацией скоростных показателей кровотока. В задних мозговых артериях, значение которых в компенсации изменившегося кровообращения в каротидном бассейне при нормализации АД уменьшилось, скоростные показатели снизились, а тонус сосудов увеличился. Кроме того, произошло достоверное уменьшение асимметрии МК, которая до лечения составляла 16,55 ± 5,2%, а через 12 недель 7,01 ± 3,01%.

Следовательно, можно говорить о нормализующем влиянии терапии лизиноприлом на МК у женщин с АГ с менопаузальным синдромом.В то же время наибольшие изменения были получены при оценке функционального состояния церебральных сосудов. Под влиянием терапии лизиноприлом изменилась реактивность мозговых артерий. При этом достоверно увеличилась и достигла нормальных величин с обеих сторон способность артерий к вазодилатации и к вазоконстрикции, что отражает вазодилатирующие свойства лизиноприла. Динамика показателей реактивности сосудов отражена на рис. 4.

Таким образом, назначение лизиноприла сопровождалось восстановлением реактивности церебральных сосудов. Это имеет принципиальное значение для больных АГ в плане защиты от органодеструкции. Демпфирование значительных колебаний АД у пациентов с АГ позволяет предотвратить повреждение ткани мозга. Восстановление нормальных показателей реактивности сосудов головного мозга создает благо-

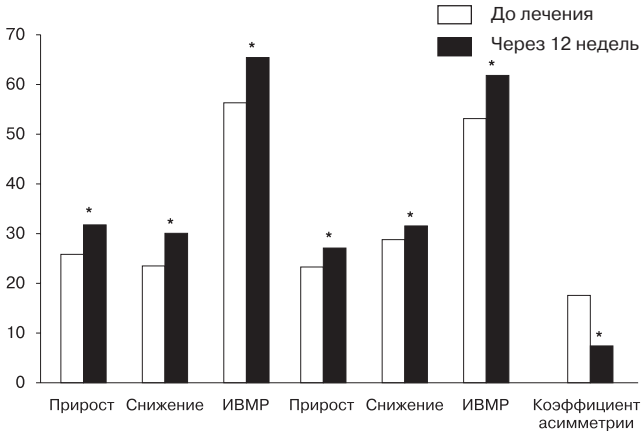


Рис. 4. Изменение реактивности церебральных сосудов под влиянием терапии лизиноприлом у женщин с АГ и менопаузальным синдромом

приятные условия для профилактики МИ. Анализ результатов антигипертензивной терапии небивололом показал,что улучшение клинического состояния большинства больных наступало на 4-5 сутки, а стойкое снижение АД к 7-8 дню приема небивола. Повторное СМАД было проведено спустя 12 недель непрерывного лечения. Результаты СМАД отражены на рис. 5.

Как видно из представленных данных, произошло достоверное снижение среднеарифметического показателя САД с 161,0 ± 12,0 до 142,7 ± 5,8 мм рт. ст., а среднеарифметического показателя ДАД с 89,09 ± 8,78 до 80,38 ± 2,47 мм рт. ст., т.е. к концу 12 недель приема препарата среднеарифметический показатель ДАД достиг нормы.

В дневные часы САД и ДАД снизились соответственно с 162,1 ± 10,68 до 147,06 ± 2 мм рт. ст. и с 91,87 ± 9,89 до 82,7 ± 3,51 мм рт. ст., а за ночь — САД с 149,1 ± 11,69 до 28,2 ± 16,95 мм рт. ст., ДАД с 85,38 ± 4,97 до 74,83 ± 5,6 мм рт. ст. При этом коэффициент вариабельности САД за день достоверно снизился с 14,89 ± 1,29 до 9,81 ± 1,7 и за ночь с 11,17 ± 2,51 до 9,82 ± 2,12, а коэффициент вариабельности ДАД за день с 14,5 ± 1,93 до 11,42 ± 1,18 и за ночь с 12,22 ± 1,88 до 11,96 ± 2,12.

Таким образом, небиволол снижает повышенную вариабельность как систолического, так и диастолического АД, причем в большей степени это влияние проявляется в дневные часы. В то же время препарат в одинаковой степени снижает максимальные показатели САД в дневные и ночные часы, тогда как на минимальные показатели САД, особенно ночью, влияния практически не оказывает. Кроме того, в результате терапии небивололом индекс времени САД за день с 87,92 ± 11,95 уменьшился до 48,42 ± 10,5%, а за

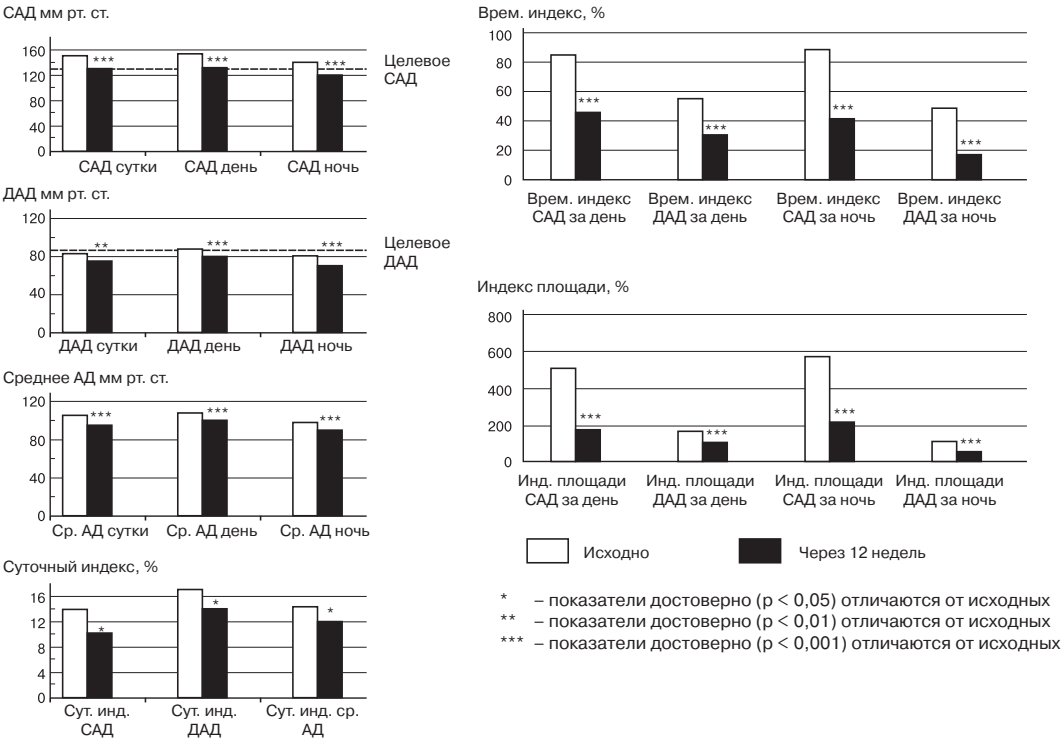


Рис. 5. Динамика показателей АД по результатам СМАД при лечении небивололом женщин с АГ и менопаузальным синдромом

ночь с 91,12 ± 9,95 до 45,71 ± 5,13%. Для ДАД эти цифры уменьшились соответственно с 58,32 ± 17,32 до 32,57 ± 8,6% днем и с 53,17 ± 27,47 до 19,64 ± 6,16% измерений ночью соответственно. То есть САД за день и ДАД за все изучаемые временные отрезки достигли нормальных величин. При этом количество больных с суточным профилем АД типа найтпикер уменьшилось на 4,7%, овердипперов – не изменилось, нондипперов – уменьшилось на 14,7%, а число больных с типом диппер увеличилось на 19,6% (рис. 6)

Отмеченное снижение ММИ с 35,5 ± 5,9 до 28,0 ± 9,21 отражает уменьшение выраженности климактерических расстройств от среднетяжелых, в начале исследования до легких через 12 недель терапии небивололом. Кроме того, терапия небивололом АГ у женщин в пери- и постменопаузе в течение 12 недель оказала положительное влияние на суточную кривую АД.

При изучении влияния терапии небивололом на параметры МК у женщин с АГ и менопаузальным синдромом наблюдали следующие изменения: скоростные показатели и сопротивление ОСА не изменились, а диаметр сосудов уменьшился, при этом справа эти изменения носили достоверный характер. Исходно сниженные систолическая и средняя скорости кровотока в ВСА на фоне терапии увеличились, однако не достигли нормальных величин. В то же время, сопротивление и диаметры ВСА не изменились. В интракраниальных сосудах отмечена иная динамика. В обеих СМА на фоне снижения скорости кровотока зарегистрирована нормализация сопротивления сосудов, причем справа эти изменения носили достоверный характер. В ПМА систолическая скорость кровотока и сопротивление артерий справа снизились, а слева, на фоне снижения до нормы систолической скорости, отмечено уменьшение сопротивления ниже нормальных величин. В ЗМА справа скоростные показатели не изменились, а сопротивление увеличилось и стало несколько выше нормы. Слева, несмотря на снижение скорости кровотока, изменений сопротивления не обнаружено. Под влиянием терапии небивололом достоверно увеличилась и с обеих сторон и достигла нормальных величин способность артерий к вазоконстрикции, что отражает вазодилатирующие свойства препарата. Кроме того, произошло достоверное уменьшение асимметрии МК, которая до лечения составляла 7,0 + 4,07%, а через 12 недель – 2,44 ± 1,6%.

Динамика показателей реактивности сосудов и асимметрии кровотока отражена на рис. 7.

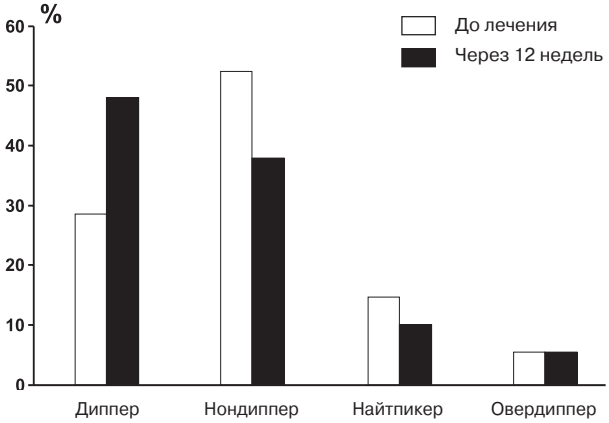
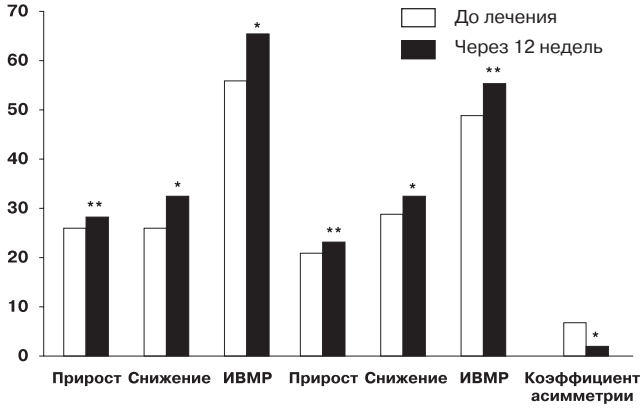


Рис. 6. Динамика суточного профиля АД под влиянием терапии небивололом

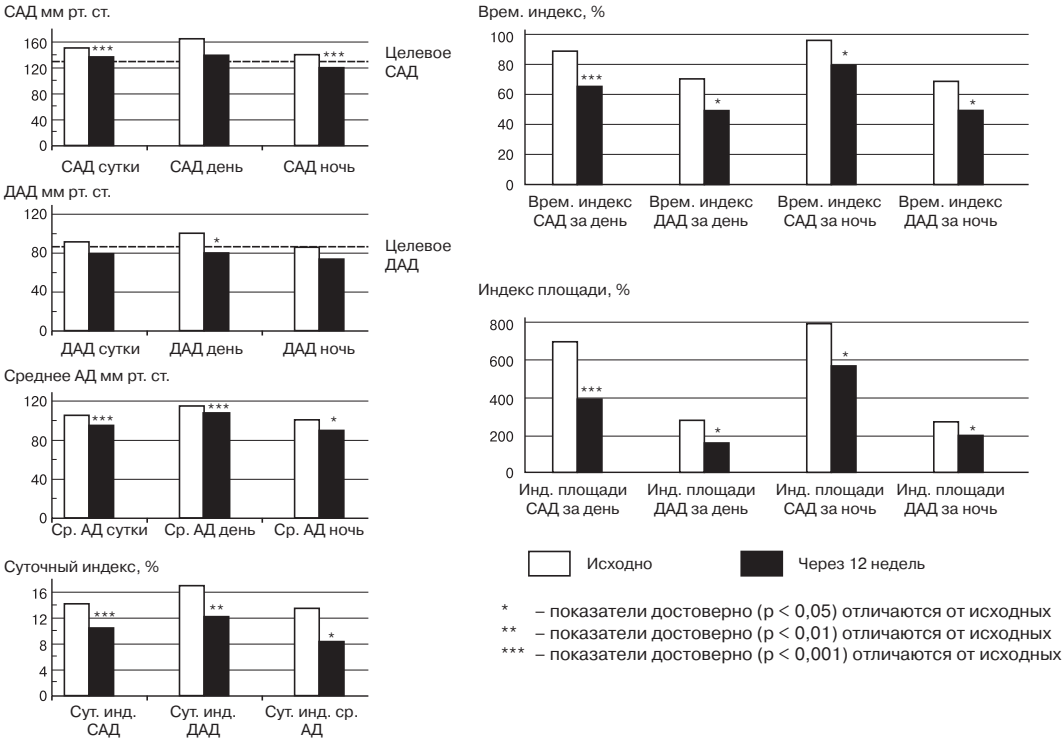
Можно считать, что одним из механизмов нейропротективной активности небиволола является улучшение реактивности церебральных сосудов, обнаруживаемое через 12 недель терапии. При этом скоростные характеристики и сопротивление сосудов за этот период практически не изменились. То есть, в первую очередь происходит восстановление процессов ауторегуляции, которые обеспечивают поддержание МК при значительных колебаниях АД. Таким образом, можно говорить о преимущественном влиянии терапии неби-

вололом на функциональные свойства церебральных сосудов у женщин с АГ и менопаузальным синдромом. Результаты изучения антигипертензивной активности амлодипина у женщин с АГ и менопаузальным синдромом представлены на рис. 8. Терапия АГ амлодипином сопровождалась достоверным снижением среднеарифметического показателя САД с 164,0 ± 10,19 до 147,7 ± 8,89 мм рт. ст. и среднеарифметического показателя ДАД с 95,83 ± 6,78 до 87,51 ± 5,56 мм рт. ст. За день эти показатели снизились соответственно с 173,0 ± 11,74 до 152,3 ± 16,44 мм рт. ст. и с 100,5 ± 8,63 до 89,81 ± 7,81 мм рт. ст., а за ночь — САД с 155,2 ± 10,8 до 137,8 ± 13,97 мм рт ст., ДАД с 89,37 ± 8,4 до 82,99 ± 9,61 мм рт. ст. Следует отметить, что в сравнении с остальными препаратами амлодипин в наибольшей степени уменьшал дневную и в то



Статистически значимые различия по сравнению с исходными данными: * — <0,05; ** — >0,05

Рис. 7. Изменение реактивности церебральных сосудов под влиянием терапии небивололом у женщин с артериальной гипертензией



* – показатели достоверно ($p < 0,05$) отличаются от исходных
** – показатели достоверно ($p < 0,01$) отличаются от исходных
*** – показатели достоверно ($p < 0,001$) отличаются от исходных

Рис. 8. Динамика показателей АД по результатам СМАД при лечении амлодипином женщин с АГ и менопаузальным синдромом

же время недостоверно увеличивал ночную вариабельность САД и ЧСС, тогда как частота сердечных сокращений в дневные часы достоверно увеличилась. В то же время вариабельность ДАД на фоне терапии практически не изменилась. При этом в результате терапии амлодипином индекс времени САД за день с 92,80 ± 10,63% уменьшился до 66,32 ± 22,07%, а за ночь с 97,38 ± 12,02 до 84,54 ± 22,4%. Для ДАД эти цифры уменьшились соответственно с 70,17 ± 26,09 до 51,59 ± 19,55% и с 71,67 ± 20,17 до 58,25 ± 19,75% измерений ночью соответственно. Обнаружено, что у изучаемого контингента больных АГ амлодипин в одинаковой степени снижает САД и ДАД и это действие более выражено в дневные часы. Суточный профиль АД у больных, принимавших в нашем исследовании амлодипин, не изменялся.

При оценке ММИ, проведенного повторно спустя 12 недель антигипертензивной терапии амлодипином, отмечено некоторое уменьшение выраженности нейровегетативных симптомов климакса. Однако эти изменения носили недостоверный характер, что, по-видимому, связано с характерным для всех дигидропиридиновых АКК влиянием на симпатическую нервную систему.

Изучение МК у больных, принимавших амлодипин, показало, что в интракраниальных артериях – СМА, ПМА с обеих сторон и ЗМА справа – имело место повышение систолической, средней скорости кровотока. При этом изменения систолической скорости носили достоверный характер. В то же время в СМА и ПМА справа был достоверно повышен индекс сопротивления *RI*, тогда как в левых СМА и ПМА показатели сопротивления были достоверно ниже нормальных величин, что, по-видимому, отражает большую гемодинамическую роль адекватного кровоснабжения левого полушария мозга. В задних мозговых артериях показатели сопротивления и систолодиастолический индекс были ниже нормы. Это подтверждает наличие субклинических изменений МК и гиперперфузии в вертебробазилярном бассейне. Известно, что ведущим компенсаторным механизмом МК считается ауторегуляторный, количественными характеристиками которого являются показатели реактивности. Так, в этой группе больных со стороны реактивности церебральных артерий в исходном состоянии отмечалось снижение способности церебральных артерий к вазоконстрикции и нормальная или сниженная способность к вазодилатации.

На фоне 12 недель приема амлодипина и описанного выше снижения АД церебральная гемодинамика претерпела следующие изменения. На экстракраниальном уровне в общих сонных артериях произошло достоверное увеличение систолической и средней скорости кровотока при неизменных показателях сопротивления и диаметра сосудов. В то же время в ВСА справа увеличилась скорость кровотока, причем средняя скорость кровотока повысилась в большей степени, и это увеличение носило достоверный характер. Это сопровождалось уменьшением сопротивления при неизменном диаметре ВСА. Похожие изменения скоростных показателей кровотока обнаружены и в ВСА слева, однако сопротивление и диаметр артерий практически не изменились, то есть существенных гемодинамически изменений со стороны экстракраниальных сосудов на фоне приема амлодипина выявлено не было. Увеличение скорости в ОСА и ВСА вероятно обусловлено увеличением ударного объема сердца, однако и эти изменения также носили недостоверный характер.

Со стороны интракраниальных сосудов в исследовании получены следующие результаты. В СМА с обеих сторон существенных изменений скоростных показателей и сопротивления сосудов не обнаружено. В то же время в ПМА произошло достоверное снижение до нормы систолической скорости кровотока с 0,94 ± 0,12 до 0,87 ±

0,08 см/с справа и с 0,96 + 0,93 до 0,90 + 0,06 см/с слева. При этом индексы сопротивления справа достоверно увеличились, а слева уменьшились и стали несколько ниже нормальных величин. В ЗМА с обеих сторон отмечено увеличение как скоростных характеристик кровотока, так и сопротивления артерий, однако эти изменения носили недостоверный характер. Оказалось, что под влиянием антигипертензивной терапии амлодипином в интракраниальных сосудах происходят неодинаковые изменения. Так, в СМА кровоток не изменился, в ПМА несколько ухудшился, а в ЗМА отмечается тенденция к улучшению показателей церебральной перфузии.Вместе с тем не обнаружено изменений реактивности мозговых артерий. Подобные результаты свидетельствуют о том, что, с одной стороны, амлодипин не ухудшает мозговой кровоток у женщин с АГ и менопаузальным синдромом, но с другой — в случае уже имеющихся нарушений церебральной гемодинамики, обусловленных АГ, обратного развития этих изменений на фоне приема препарата не происходит.

Изучение антигипертензивной активности метопролола по данным СМАД представлено на рис. 9. На фоне применения метопролола произошло достоверное снижение среднеарифметического показателя САД с 162,7 ± 8,56 до 144,1 ± 6,2 мм рт. ст. и среднеарифметического показателя ДАД с 94,78 ± 6,07 до 86,32 ± 5,89 мм рт. ст, который к концу 12 недели лечения достиг нормы. За день эти показатели снизились соответственно с 167,1 ± 8,75 до 149,1 ± 5,61 мм рт. ст. и с 99,25 ± 9,4 до 90,55 ± 4,26 мм рт. ст., а за ночь— САД с 153,3 ± 8,93 до 138,1 ± 9,93 мм рт. ст., ДАД с 89,97 ± 6,2 до 80,82 ± 6,98 мм рт. ст. Следует отметить, что на фоне лечения вариабельность САД

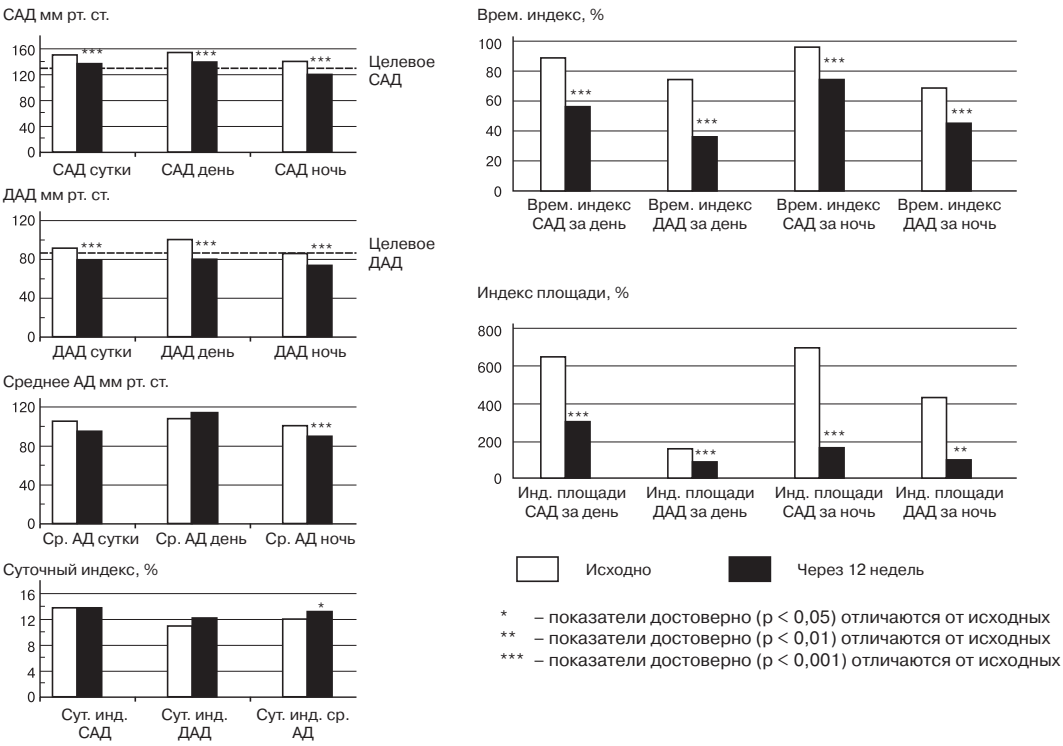


Рис. 9. Динамика показателей АД по результатам СМАД при лечении метопрололом женщин с АГ и менопаузальным синдромом

и ДАД уменьшилась, однако только в ночные часы это уменьшение носило достоверный характер. Кроме того, достоверно снизилась ЧСС и ее вариабельность в течение суток, причем в наибольшей степени в дневные часы. Из негативных эффектов необходимо отметить, что препарат в большей степени снижал минимальные, нежели максимальные показатели САД и ДАД в дневные и ночные часы. При этом по влиянию на такие характеристики СМАД, как временной индекс и индекс площади САД за день, метопролол показал наибольшую эффективность среди всех изученных препаратов. Так, в результате терапии метопрололом индекс времени САД за день уменьшился с 92,24 + 9,09 до 59,8±11,29%, а за ночь — с 98,81 ± 9,1 до 79,79 ± 8,73%. Для ДАД эти цифры уменьшились соответственно с 77,79 ± 12,07 до 37,41±15,53% и с 74,19 ± 29,03 до 50,0± 23,39% измерений ночью соответственно. Одним из наиболее значимых эффектов метопролола явилось его положительное влияние и на суточную кривую АД. Оказалось, что количество больных с суточным профилем АД типа диппер увеличилось на 14,2%, нондиппер – не изменилось, с типом найтпикер уменьшилось на 9,4% и overdipper уменьшилось на 4,8% (рис. 10). Снижение ММИ с 36,41 ± 6,45 до 30,01 ± 8,43 позволило женщинам через 12 недель терапии метопрололом перейти из группы со средней тяжестью климактерических расстройств в группу легкого течения климакса.

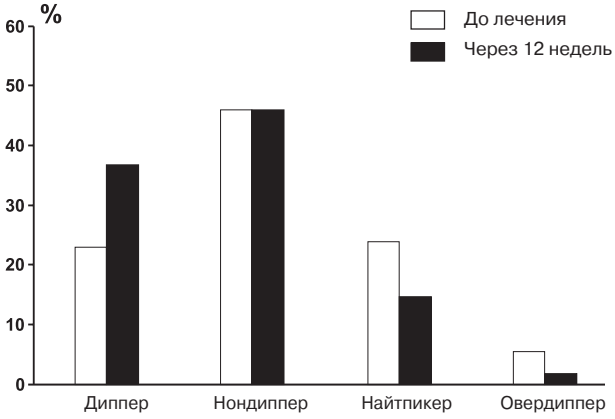


Рис. 10. Динамика суточного профиля АД под влиянием терапии метопрололом

Изучение МК у больных, получавших метопролол, показало, что в интракраниальных артериях – СМА, ПМА с обеих сторон и ЗМА слева – имело место повышение систолической и средней скорости кровотока. При этом изменения систолической скорости в правых СМА и ЗМА носили достоверный характер. В то же время в обеих СМА и ПМА справа индекс сопротивления *PI* был достоверно повышен, тогда как в левых ПМА и ЗМА показатели сопротивления были ниже нормальных величин. То есть и в данной группе больных были выявлены неадекватные компенсаторно-приспособительные реакции и гиперперфузия в вертебробазилярном бассейне.

Принимая во внимание то, что ведущим компенсаторным механизмом МК является ауторегуляторный и уже на ранних стадиях развития АГ снижается функциональный цереброваскулярный резерв, оценивались показатели реактивности мозговых сосудов. Так, со стороны реактивности мозговых артерий в исходном состоянии отмечалось снижение способности церебральных артерий к вазоконстрикции и нормальная или сниженная способность к вазодилатации. Через 12 недель приема метопролола и отмеченного выше снижения АД со стороны церебральной гемодинамики выявлены следующие изменения: в ВСА справа на фоне недостоверного снижения систолической и увеличения средней скорости кровотока отмечена тенденция к снижению сопротивления, слева в ВСА обнаружены противоположные изменения — повышение систолической скорости кровотока и увеличение показателей сопротивления. Увеличение скорости кровотока в сочетании с увеличением диаметра ВСА

слева привело к увеличению объемного кровотока в этом регионе, что, несомненно, является положительным результатом терапии. Отсутствие динамики МК в ОСА, по-видимому, обусловлено большей зависимостью кровотока в этих сосудах от сердечного выброса, величине, которая у женщин обсуждаемой группы практически не изменилась.

Исследованиями последних лет доказано, что развитие и прогрессирование АГ сопровождается комплексом специфических функциональных, а в последующем и структурных изменений артериального русла, и, в первую очередь, интракраниальных сосудов. Наибольший интерес представляет возможность коррекции подобных нарушений с помощью антигипертензивной терапии. В нашем исследовании обнаружено на фоне применения метопролола увеличение скорости кровотока и сопротивления СМА справа, тогда как слева эти показатели уменьшились, но не достигли нормальных величин. То есть, улучшение кровотока в левой СМА сопровождалось дальнейшим его ухудшением в правой СМА. Со стороны ПМА не выявлено существенных изменений основных характеристик МК. В ЗМА на фоне терапии отмечено снижение систолической и увеличение средней скорости кровотока в сочетании с повышением индексов *PI* и *RI*. Более того, показатели сопротивления стали даже выше нормальных значений. По-видимому, подобные изменения со стороны сосудов являются проявлением периферической вазоконстрикции, характерной для БАБ. Таким образом, при назначении метопролола только в левой СМА отмечена тенденция к улучшению МК. В ПМА кровоток не изменился, а в ЗМА произошло повышение сопротивления сосудов. Более того, не получено изменений со стороны функционального состояния церебральных сосудов. Так, даже реактивность мозговых артерий, которая наиболее чутко реагирует на колебания АД, в ходе терапии практически не изменилась и осталась ниже нормы. Кроме того, произошло увеличение асимметрии МК, которая до лечения составляла 6,48 ± 4,14%, а через 12 недель — 9,56 ± 3,35%.

Выводы

1. Особенности состояния мозгового кровотока у пациенток с АГ и менопаузальным синдромом определяются нарушениями механизмов ауторегуляции МК, возникающими на ранних этапах развития заболевания. Основными проявлениями повреждения системы нейропротекции являются нарушения реактивности артерий на интракраниальном уровне, а также повышение скоростных показателей кровотока и сопротивления в магистральных артериях головного мозга.

2. Профилактическое влияние антигипертезивных препаратов на развитие нарушений мозгового кровообращения у пациенток с АГ и менопаузальным синдромом четко коррелирует с их влиянием на вариабельность САД, так как именно с этим показателем связано повышение сопротивления интракраниальных сосудов.

3. При среднесрочной антигипертензивной терапии у больных с АГ и менопаузальным синдромом с нарушениями ауторегуляции МК нейропротектимвные эффекты лекарственных препаратов связаны как с корригирующим влиянием на системную гемодинамику, так и с их воздействием на нарушенный церебральный кровоток. При этом наибольшие различия в действии препаратов обнаружены в отношении реактивности артерий мозга.

4. Терапия ИАПФ (лизиноприл) и БАБ с вазодилвтирующими свойствами (небиволол) у пациентов с АГ и нарушениями ауторегуляции мозгового кровообращения сопровождается снижением церебрального сосудистого сопротивления и восстановлением реактивности церебральных сосудов.

5. Назначение АКК дигидропиридинового ряда (амлодипин) приводит к сниже-

нию сосудистого сопротивления, но не устраняет нарушения ауторегуляции мозгового кровотока.

6. Использование кардиоселективного БАБ (метопролол) не оказывает влияния на нарушения мозгового кровотока, несмотря на гемодинамически значимое антигипертензивное действие.

Результаты исследования являются подтверждением того, что одно лишь снижение показателей САД/ДАД не является гарантией нейропротективного действия АГС. С одной стороны, представители различных классов гипотензивных препаратов, в одинаковой степени снижающие АД, не идентичны в плане влияния на параметры ауторегуляции МК. С другой стороны, изучение механизмов регуляции гемодинамических систем и влияния на них АГС позволяет повысить эффективность гипотензивной терапии.

В этой связи дальнейшее изучение фармакологической регуляции гемодинамических систем у пациентов с АГ остается важнейшей задачей в оптимизации выбора антигипертензивных средств в плане предотвращения развития фатальных и нефатальных осложнений заболевания.

Литература

1. *Боровиков В.П., Боровиков И.П.* STATISTICA – Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М.: Информационно-изд. дом «Филин», 1998. – 608 с.
2. *Верещагин Н.В., Пирадов М.А.* Инсульт: Состояние проблемы. М., 2002.
3. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М., 1999. – 365 с.
4. *Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В.* Эпидемиология инсульта в России. *Журн. неврол. и психиатр. им. С.С.Корсакова, 2003; 8: 4–9.*
5. *Кобалава Ж.Д., Терещенко С.И., Калинкин А.Л.* Суточное мониторирование артериального давления: методические аспекты и клиническое значение. М. 1997. – 32 с.
6. *Москаленко Ю.Е.* Кровоснабжение головного мозга. В кн.: *Руководство по физиологии: Физиология кровообращения. Физиология сосудистой системы. Л. Наука. 1984, с. 352-381.*
7. *Толпыгина С.Н., Ощепкова Е.В., Варакин Ю.Я.* Мозговой кровоток при артериальной гипертонии. (Методы оценки и влияние антигипертензивной терапии). *Кардиология. 2001; 4: 71-77.*
8. *Lewington S., Clarke R., Qizilbash N., Peto R., Collins R.* Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet 2002; 360 (9349): 1903–13.*
9. *Mackay J., Mensah G.* The Atlas of Heart Disease and Stroke. *WHO. 2004.*
10. *Staessen J., Bieniaszewski L., O'Brien E. et al.* Nocturnal blood pressure fall on ambulatory monitoring in a large international database. *Hypertension. 1997. Vol.29. P. 30-39.*

THE EVALUATION OF ANTIHYPERTENSIVE DRUG EFFECTS ON INDEXES OF CEREBRAL BLOODSTREAM AUTOREGULATION AND OPTIMAL COMBINATION OF DRUGS IN THE CONTEXT OF NEUROPROTECTION

O.Yu. Sokolov, N.I. Volkova

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don

Comparison study of antihypertensive drugs impacting parameters of cerebral bloodstream (CB) autoregulation in patients with arterial hypertension and menopausal syndrome with high risk of development of cerebral insult is presented. DMAP (daily monitoring of arterial pressure) indexes were used for assessment of antihypertensive drugs activity. The state of CB was studied by method of transcranial Doppler ultrasonography. The state of CB autoregulation was determined from reactivity indexes obtained in hypo- and hypercapnia tests. The results of investigation demonstrated that various antihypertensive drugs were identical in reducing arterial pressure, yet varied in correction of CB indexes. Lisinoprile and nebivolole restored the deteriorated reactivity of cerebral blood vessels, while amlodipine and metoprolole did not have any effect on deterioration of CB autoregulation in patients with arterial hypertension.

Роль процессов свободнорадикального окисления в механизме гепатопротекторного действия масла из семян амаранта

Г.Н. Близнецова, М.И. Рецкий, Н.Д. Полякова-Семенова, И.М. Коренская

Всероссийский НИВИ патологии, фармакологии и терапии РАСХН, Воронеж
Воронежский государственный университет, Воронеж

Профилактическое применение внутрь амарантового масла в дозе 0,5 мл на кг массы тела оказывает выраженное гепатопротекторное действие при токсическом гепатите, вызванным введением тетрахлорметана. Выдвинуто предположение о том, что механизм гепатопротекторной активности препарата обусловлен снижением интенсивности образования супероксиданиона и стабилизацией процессов пероксидного окисления липидов.

Ключевые слова: амарантовое масло, гепатопротектор, свободнорадикальное окисление, тетрахлорметан, токсическое повреждение печени.

Введение

В основе морфологических изменений, развивающихся в печени при её токсическом повреждении, лежит цитолиз гепатоцитов, инициирующий процесс прогрессирующего некробиоза печеночных клеток [3]. Одним из универсальных механизмов повреждения и даже гибели клеток любых органов, тем более печени, является чрезмерная пероксидация мембранных структур, обусловленная усиленной выработкой активных форм кислорода [1, 19]. Повышение уровня продуктов пероксидного окисления в органах и тканях при интоксикации печени оказывает неблагоприятное влияние на структурно-функциональное состояние клеток, в том числе самих гепатоцитов, вызывая в них процессы аутолиза и самоокисления [16]. В связи с этим, при разработке средств лечения поражений печени различной этиологии внимание исследователей привлекают препараты, обладающие антиоксидантными свойствами [6], среди которых особое место занимают препараты на основе природного сырья [23].

Одним из таких препаратов является жирное масло из семян различных видов амаранта *(Amaranthus spp. L.)*. В его состав помимо витамина Е входят полиненасыщенные жирные кислоты, сквален, витамины группы Д, рибофлавин, холин, желчные кислоты и спирты, стероиды, фитостерины, фосфолипиды [11]. И хотя лекарственные препараты на основе амарантового масла применяют наружно при псориазе, экземах, нейродермитах, пролежнях, а внутрь – при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, онкозаболеваниях [7, 12], механизм гепатопротекторного действия амарантового масла остается не достаточно изученным, что и обусловило цель настоящей работы.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 80 половозрелых конвенциональных нелинейных крысах-самцах с массой тела 200-250 г, разведения вивария Всероссийского НИВИ патологии, фармакологии и терапии. Животные содержались в условиях вивария при 20-22 °С и влажности 40-60 % и получали без ограничения гранулированный корм КК-58-2218.00-316гр производства АООТ «Воронежский экспериментальный комбикормовый завод».

В качестве подстилочного материала использовали древесные опилки. На мо-

мент проведения исследований животные были клинически здоровы, без изменений в поведении, аппетита, режимов сна и бодрствования. За 12 часов до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды. Токсическое повреждение печени и получение биоматериала проводили в соответствии с существующими требованиями к экспериментам на животных.

Исследования проведены на 4 группах животных. Первая группа (n = 20) – интактные животные, которым внутрижелудочно вводили физиологический раствор из расчета 0,5 мл/кг. У животных 2-й группы (n = 20) вызывали токсическое повреждение печени тетрахлорметаном (ТХМ, CCl_4). Крысам 3-й группы (n = 20) в течение 6 суток внутрижелудочно с помощью специального зонда в утренние часы, до основного кормления, вводили амарантовое масло (АМ) из расчета 0,5 мл/кг. Животным 4-й группы (n = 20) в течение 6 дней внутрижелудочно вводили амарантовое масло в дозе 0,5 мл/кг, и на 5 и 6 дни – внутрибрюшинно CCl_4. Все исследования проводили через сутки после повторного введения CCl_4. Токсическое повреждение печени вызывали путем двукратного внутрибрюшинного введения, один раз в сутки, тетрахлорметана в виде 40%-ного раствора в оливковом масле в дозе 0,2 мл/100 г массы тела [5].

Амарантовое масло получали экстракционным способом по оригинальной технологии, разработанной в Воронежском государственном университете [13], из семян амаранта отечественных сортов «Ультра», «Харьковский 1», «Харьковский 2», отвечающих требованиям ГОСТ 28636-90.

О степени повреждения печеночной паренхимы судили по изменению активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови, которую определяли с использованием тест-системы «АлАТ-Импакт», и по изменениям гистоструктуры ткани печени. Об интенсивности процессов пероксидного окисления и состоянии системы антиоксидантной защиты судили по изменению содержания в крови конъюгированных диенов (ДК), кетодиенов (КД), малонового диальдегида (МДА), активности каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) [4] и супероксиддисмутазы (СОД) [14], степени окислительной модификации белков плазмы крови [21]. Определение уровня супероксиданиона и источников его генерации в гомогенате печени проводили с использованием модифицированного НСТ-теста, позволяющего оценить суммарную (спонтанную), а также потенциальную преимущественную генерацию супероксиданиона в митохондриальной или микросомальной электронотранспортной цепи [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

Установлено, что после двукратного внутрибрюшинного введения тетрахлорметана в сыворотке крови опытных животных активность АлАТ, являющаяся маркером цитолитических процессов клеток печени, возрастала в 3,51 раза (рис. 1).

Помимо этого при гистологическом исследовании печеночной ткани были обнаружены явные признаки токсического ге-

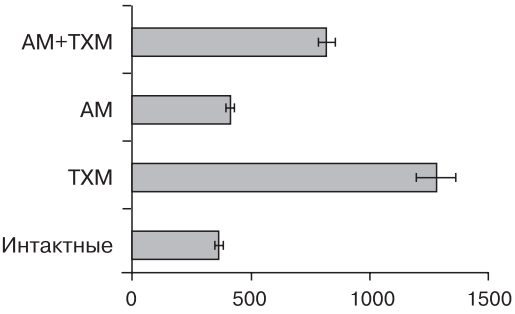
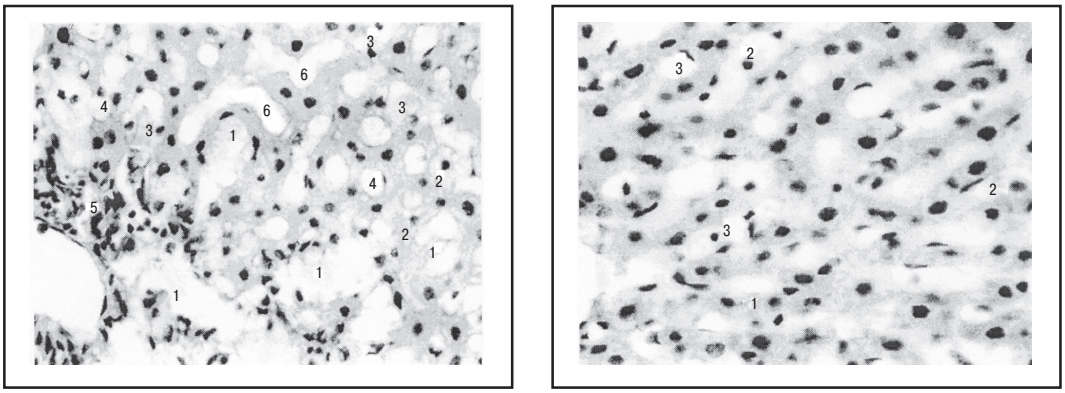


Рис. 1. Активность АлАТ (нМоль/сек × л) в сыворотке крыс при токсическом повреждении печени CCl_4 и применении амарантового масла



А

1– некрозы; 2 – жировая дистрофия мелко- и среднекапельная; 3 – жировая дистрофия крупнокапельная; 4 – жировые кисты; 5 – периваскулярная инфильтрация; 6 – расширенные синусоиды

Б

1 – жировая дистрофия мелкокапельная; 2 – жировая дистрофия средне- и крупнокапельная; 3 – жировые кисты

Рис. 2. Гистоструктура печени после введения ТХМ (А) и интоксикации им на фоне применения АМ (Б). Окраска гематоксилином-эозином; увеличение: х 280

патита: некрозы, различные формы жировой дистрофии, выраженная периваскулярная инфильтрация в окружности центральной вены, расширение синусоидов, характеризующее застойные явления (рис. 2А).

Характер установленных нарушений структуры печеночной ткани и повышение активности АлАТ соответствуют изменениям, происходящим при развитии гепатозо-гепатита [10].

Внутрижелудочное введение амарантового масла в дозе 0,5 мл/кг перед введением тетрахлорметана оказывало достаточно выраженное гепатопротекторное действие, снижая активность АлАТ в сыворотке крови на 36,1% по сравнению с её активностью у животных с токсическим гепатитом, вызванным введением тетрахлорметана.

Об ограничивающем влиянии профилактического применения АМ на проявление цитолитического синдрома свидетельствуют и результаты гистологического исследования. В печеночной паренхиме у животных 4-й группы (АМ+ТХМ) хотя и наблюдались явления жировой дистрофии, но отсутствовали некротические поражения, и сохранялась балочная структура печеночной дольки (рис. 2Б). Для выяснения механизмов, обусловливающих проявление гепатопротекторной активности амарантового масла, было оценено его влияние на интенсивность свободнорадикального окисления и состояние антиоксидантной системы при тетрахлорметановой интоксикации.

Поскольку чрезмерное образование реактивных метаболитов является одним из универсальных механизмов повреждения клеток печени, представляло интерес не столько изменение интенсивности свободнорадикального окисления и генерации супероксиданионрадикала (что является вполне закономерным), сколько изучение субклеточной локализации образования $O_2^{\cdot-}$ в различных компартментах клетки.

Проведенные исследования показали, что токсическое повреждение печени сопровождается усилением на 66 % спонтанной генерации супероксида в гомогенате печени. При этом существовали различия в интенсивности образования $O_2^{\cdot-}$ в митохондриальной и микросомальной электронтранспортных цепях (табл. 1). Преиму-

щественно митохондриальная (НАДН-индуцированная) генерация $O_2^{\cdot-}$ возрастала в 2,3 раза, а НАДФН-стимулированная (преимущественно микросомальная) – в 2,8 раза.

Применение животным амарантового масла существенно понижало интенсивность генерации супероксиданиона при CCl_4-индуцированном токсическом повреждении печени. Наиболее существенно снижались спонтанная и НАДН-стимулированная продукция $O_2^{\cdot-}$: соответственно на 21,7 % и 27,1% ($p < 0,05$) по сравнению с животными, которым вводили только один тетрахлорметан. При этом НАДФН-зависимое образование супероксида статистически достоверно уменьшалось всего на 8,5%.

Ограничивающее влияние превентивного применения амарантового масла на интенсивность образования активных форм кислорода в клетках печени при развитии токсического гепатита обусловило корригирующее действие препарата на интенсивность накопления в крови как начальных, так и вторичных (промежуточных) продуктов пероксидного окисления липидов: уровень диеновых конъюгатов снижался на 24,9%, кетодиенов – на 32,0% и малонового диальдегида – на 34,7% по сравнению с животными, которым вводили только тетрахлорметан (табл. 2).

Оценивая уровень продуктов ПОЛ, характерный для животных, получавших амарантовое масло до введения гепатотоксина (4-я группа), по отношению к пока-

Таблица 1

Влияние амарантового масла на продукцию супероксида при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном

№	Группа животных	Продукция супероксида, нмоль/г × сек		
		Спонтанная	Стимулированная	
			НАДН	НАДФН
1	Интактные	0,50±0,021	6,3±0,08	7,2±0,09
2	CCl_4	0,83±0,024*	14,4±0,51*	20,0±0,10*
3	АМ	0,47±0,040△	6,8±0,28△	7,1±0,41△
4	АМ + CCl_4	0,65±0,032*△▽	10,5±0,52*△▽	18,3±0,72*▽

Примечание: * — $P_{1-2,3,4} < 0,05$; △ — $P_{2-3,4} < 0,05$; ▽ — $P_{3-4} < 0,05$.

Таблица 2

Влияние применения амарантового масла на показатели пероксидного окисления липидов в крови крыс при CCl_4-индуцированном гепатите

№	Группа животных	Диеновые конъюгаты, D_{232}/мг липидов	Кетодиены, D_{278}/мг липидов	Малоновый диальдегид, мкМ/л
1	Интактные	0,122±0,010	0,030±0,021	1,39±0,015
2	CCl_4	0,305±0,024*	0,075±0,030*	2,22±0,041*
3	АМ	0,135±0,012*	0,031±0,015*	1,39±0,010*
4	АМ + CCl_4	0,229±0,036*△	0,051±0,034*△	1,45±0,057*△

Примечание: * — $P_{1-2,3,4} < 0,05$; △ — $P_{2-4} < 0,05$.

зателям у интактных животных (1-я группа), видно, что концентрации начальных продуктов ПОЛ возрастали почти в 2 раза, в то время как содержание МДА увеличивалось незначительно. Такое отсутствие избыточного накопления в крови МДА по сравнению с интактными крысами также может свидетельствовать о выраженном антиоксидантном эффекте амарантового масла в условиях CCl_4-индуцированного токсического гепатита.

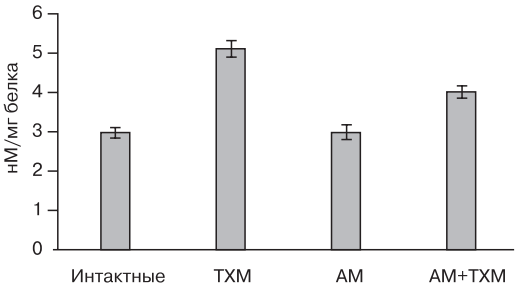


Рис. 3. Влияние амарантового масла на интенсивность окислительной модификации белков при токсическом повреждении печени CCl_4

Как видно из данных, представленных на рис. 3, токсическое повреждение печени тетрахлорметаном на фоне применения амарантового масла уменьшало интенсивность окислительной модификации белков. Применение препарата способствовало статистически достоверному снижению на 25% концентрации карбонильных групп в белках плазмы крови крыс 4-й группы, по сравнению с животными, которым вводили один CCl_4.

Следует подчеркнуть, что введение животным амарантового масла не оказало существенного влияния на степень индукции активности антиоксидантных ферментов в крови крыс, наблюдаемую на начальных этапах развития токсического повреждения печени, так как статистически достоверных различий между активностью ферментов у животных 2-й и 4-й групп не установлено (табл. 3).

Обсуждение результатов

Феномен оксидативного стресса является одним из базисных механизмов патологии печени различной этиологии [8]. Механизм повреждающего действия CCl_4 на печень реализуется через активацию процессов пероксидации, поскольку тетрахлорметан, поступая в организм, превращается в радикал $CCl_3^{\bullet}$, инициирующий окисление свободнорадикального типа [24].

Как показали наши исследования, введение животным CCl_4 приводит к усилению генерации в клетках печени супероксиданиона. Увеличение НАДФН-стимулированной продукции супероксида связано с ведущей ролью цитохрома P_{450} мик-

Таблица 3

Влияние амарантового масла на состояние ферментативного звена антиоксидантной системы в крови крыс при токсическом повреждении печени

Фермент	Группы животных			
	1	2	3	4
	Интактные	CCl_4	АМ	АМ+CCl_4
СОД (усл. ед./мг Hb)	1,49±0,01	1,85±0,02*	1,47±0,01$^{\triangle}$	1,90±0,01$^{*\triangledown}$
Каталаза (мкМ H_2O_2/л×мин)	34,2±1,53	43,4±1,28*	36,1±1,70$^{\triangle}$	43,9±2,13$^{*\triangledown}$
ГПО (мМ G-SH/л×мин)	39,3±1,20	48,4±1,25*	39,4±2,10$^{\triangle}$	46,5±2,29$^{*\triangledown}$
ГР (мкМ G-SS/л×мин)	151,4±3,13	166,2±4,89	150,4±1,26	163,7±5,34

Примечание: $* — P_{1-2,3,4} < 0,05$; $\triangle — P_{2-3,4} < 0,05$; $\triangledown — P_{3-4} < 0,05$.

росомальной фракции в механизме биотрансформации тетрахлорметана.

Инициация свободнорадикального окисления, вызванная введением тетрахлорметана и сопровождающаяся усилением генерации супероксиданиона в клетках печени, разрушая клеточные мембраны, приводит к высвобождению негемового железа из отделов эндоплазматического ретикулума [9]. Таким образом выполняется необходимое условие для протекания процессов пероксидного окисления – наличие в системе свободных радикалов (повышение концентрации $O_2^{\cdot-}$) и ионов железа. Концентрации этих компонентов определяют скорость зарождения цепи – лимитирующего звена всей цепной реакции, от скорости которого зависит интенсивность протекания процесса в целом.

Как показали проведенные исследования, токсическое повреждение печени терахлорметаном сопровождается активацией процесса пероксидного окисления липидов, о чем однозначно свидетельствовало накопление в крови начальных и вторичных продуктов ПОЛ. Эти данные в целом подтверждают результаты исследований большинства авторов, изучавших эти процессы при CCl_4-интоксикации [17, 22, 24].

Помимо усиления процессов пероксидного окисления липидов, введение животным тетрахлорметана приводило к повышению уровня карбонильных групп в белках, что является маркером их окислительной модификации активными формами кислорода. Это может приводить к нарушению их многообразной функциональной активности (ферментативной, регуляторной и т.д.) и даже деградации [18]. При этом считается, что степень окислительной модификации белков отражает соотношение между про- и антиоксидантными процессами при действии экологических, генетических, пищевых и других экстремальных факторов [20].

Применение животным амарантового масла существенно снижает продукцию супероксиданиона при токсическом повреждении печени. Наиболее выражен этот эффект в отношении спонтанной и НАДН-стимулированной (митохондриальной) продукции $O_2^{\cdot-}$. Такой эффект воздействия на характер субклеточной генерации супероксиданиона, вероятно, связан с тем, что амарантовое масло существенно не влияет на процессы метаболической детоксикации тетрахлорметана в системе микросомального окисления, а главным образом ограничивает образование и элиминацию активных форм кислорода, что может быть связано с достаточно высоким содержанием в нем α-токоферола (≈2%), который обладает выраженными антиоксидантными свойствами, и сквалена (≈8%), являющегося предшественником ряда стероидных гормонов и холестерина, у которых также установлено наличие антиоксидантных свойств [15].

Выведение избыточного количества супероксида из биофазы приводило к снижению интенсивности процессов пероксидного окисления, причем ограничивающее влияние амарантового масла в меньшей степени отражалось на изменении уровня первичных продуктов ПОЛ – конъюгированных диенов и в большей – на снижении концентрации малонового диальдегида. По-видимому, профилактическое применение амарантового масла способствует не только снижению образования активных форм кислорода, в частности супероксиданиона, но и ограничению пероксидного окисления липидов на более поздних этапах, предотвращая образование наиболее токсичных и стабильных продуктов пероксидации. Об этом также может свидетельствовать и то, что корригирующее действие амарантового масла на проявления оксидативного стресса не оказало существенного влияния на степень индукции антиоксидантных ферментов участвующих в обезвреживании супероксида (СОД) и гидроперекисей (ГПО и каталаза).

Выводы

Применение амарантового масла в дозе 0,5 мл/кг массы тела способствует более интенсивному течению репаративных процессов в печени при её токсическом поражении. Это обусловлено стабилизацией интенсивности свободнорадикального окисления липидов, что, в свою очередь, обеспечивается поддержанием функционального потенциала ферментативного звена системы антиоксидантной защиты, а также сохранением физиологического баланса образования и утилизации активных форм кислорода.

Литература

1. *Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б.* Перекисное окисление и стресс. *СПб.: Наука, 1992.*
2. *Близнецова Г.Н., Цебржинский О.И., Нацвина А.К., Рецкий М.И.* Метод определения субклеточной генерации супероксиданиона у здоровых животных и при токсическом повреждении печени. *Вестник ВГУ. Серия химия, биология, 2004, № 2, с. 111-118.*
3. *Блюгер А.Ф., Майоре А.Я., Залцмане В.К.* Роль нарушений функций мембран в патологии печени. В кн.: Биомембраны: Структура, функции, медицинские аспекты. *Рига, 1981, с. 185-195.*
4. *Бузлама В.С., Рецкий М.И., Мещеряков Н.П., Рогачева Т.Е.* Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма животных. *Воронеж, 1997, 35 с.*
5. *Венгеровский А.И., Марков И.В., Саратиков А.С.* Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Фисененко В.П., М.: *Ремедиум, 2000, с. 228-231.*
6. *Губский Ю.И.* Коррекция химического поражения печени. *Киев: Здоров'я, 1989.*
7. *Десалень Т.Л., Моргунов А.А., Офицеров Е.Н.* Изучение химических соединений, полученных из растений рода Amaranthus, на кардиотропную активность. *II Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». М., 1995, с. 234-235.*
8. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Оксидативный стресс. Биохимический и патофизио-логический аспекты. *М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001, 343 с.*
9. *Коваленко О.А., Тарасова Н.И., Микоян В.Д., Ванин А.Ф.* CCl_4 как индуктор L-аргинин зависимого синтеза NO. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1996, № 4, с. 414-416.*
10. *Кутина С.Н., Зубахин А.А.* Резистентность печени к повреждению CCL_4 при стимуляции макрофагов препаратами разных классов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2000, № 6, с. 620-622.*
11. *Макеев А.М., Коренская И.М., Кунин А.А.* Амарантовое масло – уникальное природное лекарственное средство. *IV международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», М.: Пущино, 2001, с. 255-265.*
12. *Макеев А.М., Мирошниченко Л.А., Суровцев И.С.* Регенерационные и противоопухолевые свойства амарантового масла. *Матер. III междунар. Симпоз. «Новые и нетрадиционные растения и перспектива их использования», М.: Пущино, 1999, с. 100-103.*
13. *Макеев А.М., Суровцев И.С., Левачев М.М.* Способ получения масла из семян амаранта. *Патент РФ № 2080360, приоритет от 22.12.1994.*
14. *Сирота Т.В.* Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии, 1999, Т. 45, № 3, с. 263-272.*
15. *Чиркова Т.В.* Амарант – культура XXI века. *Соросовский образовательный журнал, 1999, Т. 5, № 10, с. 22-27.*
16. *Alric L., Orfila C., Carrere N., Beraud M., Carrera G., Lepert J. C., Duffaut M., Pipy B., Vinel J. P.* Reactive oxygen intermediates and eicosanoid production by kupffer cells and infiltrated macrophages in acute and chronic liver injury induced in rats by CCl_4. *Inflamm. Res., 2000, V. 49, No 12, p. 700-707.*
17. *Campo G.M., Squadrito F., Ceccarelli S.* Reduction of carbon tetrachloride-induced rat

liver injury by IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. *Free Radic. Res., 2001, Vol. 34, № 4, p. 379-393.*

18. *Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J.* Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry J. 1997, V. 324, No 1, p. 1-18.*
19. *Kim K.Y., Choi I., Kim S.S.* Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl_4-induced fibrogenesis. *Mol. Cells., 2000, Vol. 10, No 3, p. 289-300.*
20. *Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R.* Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino. Acids., 2003, Vol. 25, No 3-4, p. 221-226.*
21. *Reznick A.Z., Packer L.* Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzimol., 1994, Vol. 233, p. 357-363.*
22. *Sodergen E., Cederberg J., Vessby B., Basu S.* Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *Eur. J. Nutr., 2001, Vol. 40, No 1, p. 10-16.*
23. *Yoshikawa M., Ninomiya K., Shimoda H., Nishida N., Matsuda H.* Hepatoprotective and antioxidative properties of Salacia reticulata: preventive effects of phenolic constituents on CCl_4-induced liver injury in mice. *Biol. Pharm.Bull., 2002, Vol. 25, No 1, p. 72-76.*
24. *Zhu W., Fung P.C.* The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl_4-induced acute liver injury of mice. *Free Radic. Biol. Med., 2000, Vol. 29, No 9, p. 870-880.*

THE ROLE OF FREE RADICAL OXIDATION PROCESSES IN MECHANISMS OF AMARANTH OIL HEPATOPROTECTIVE ACTION

G.N. Bliznetsova, M.I. Retsky, N.D. Polyakova-Semenova, I.M. Korenskaya

Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy RAAS, Voronezh
Voronezh State University, Voronezh

Application of amaranth oil per os in dose of 0,5 ml per kg of body weight have a distinct hepatoprotective action on toxic hepatitis caused by administration of tetrachloromethane. It has been supposed that mechanism of hepatoprotective activity of preparation is conditioned by decrease of intensity of superoxide anion formation and stabilization of lipid peroxidation processes.

Key words: amaranth oil, hepatoprotector, free radical oxidation, tetrachloromethane, toxic damage of liver.

МУТАГЕНЕЗ

Цитогенетический анализ антимутагенного действия α-токоферола и глюкозы при индукции мутаций героином у лабораторных мышей

Н.А. Пирцхелани, А.Г. Пирцхелани, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Мамаладзе

Тбилисский государственный медицинский университет, Тбилиси, Республика Грузия
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

На лабораторных мышах изучено антимутагенное и антицитотоксическое действие глюкозы и α-токоферола при индукции мутаций наркотическим веществом (героин). В работе применены цитологические и генетические методы исследования.
Героин характеризуется мутагенным и цитотоксическим действием. Интраперитонеальное введение животным героина (терапевтическая доза) вызывает достоверное ($p < 0,001$) повышение количества структурных нарушений хромосом (единичные и парные фрагменты, лизис), геномных мутаций (триплоидия, тетраплодия), патологических митозов (полая метафаза, К-митоз, слипание хромосом), центромерных ассоциаций хромосом и нарушение интерфазных ядер (полое ядро). Глюкоза, α-токоферол и комплекс глюкоза+α-токоферол характеризуются выраженным антимутагенным и антицитотоксическим действием. Глюкоза в три раза, α-токоферол в четыре раза, а комплекс глюкоза+ α-токоферол 4,5 раза уменьшают частоту мутагенных и цитотоксических эффектов героина.

Ключевые слова: Героин, глюкоза, α-токоферол, митозы, хромосомы, мыши.

Массовое злоупотребление психоактивными веществами (ПАВ) приводит к увеличению числа случаев отравления, травматизма, асоциального поведения, преступлений, связанных с насилием, и т.д. Внутривенное употребление наркотиков способствует быстрому распространению вирусных инфекционных заболеваний, таких, как СПИД, гепатит В и С. Большинство больных опийной наркоманией, как правило, умирает еще в молодом возрасте [4].

Большинство вредных химических веществ вызывает повреждение генетического аппарата человека, что приводит впоследствии к возникновению наследственных болезней, врожденных аномалий, злокачественных образований, болезней сердечно-сосудистой, нервной, пищеварительной систем и т.д. [1, 8].

В наших работах [11] было показано, что введение лабораторным мышам наркотического вещества, героина, вызывает достоверное увеличение ($p < 0,001$) хромосомных аномалий, патологических митозов и центромерных ассоциаций хромосом.

Исходя из вышесказанного, представляется необходимым проведение мероприятий, направленных на ослабление действия повреждающих агентов, с целью защиты генетического аппарата. Среди них особенно важно выделение и использование эффективных антимутагенов, которые максимально уменьшают повреждение генетического аппарата.

Целью настоящего исследования явилось изучение хромосомных нарушений при воздействии героина на клетки костного мозга лабораторных мышей и определение степени защитной роли α-токоферола и глюкозы.

Материалы и методы

Из наркотических веществ был использован героин, который вводили разнопо-

лым нелинейным мышам интраперитонеально в течении 10 дней (доза терапевтическая). В качестве антимутагенов были использованы α-токоферол (Е-витамин) и глюкоза (доза терапевтическая), которые вводили мышам подкожно.

Исследования проведены на 25 разнополых нелинейных мышах весом 20-25 г в 5 сериях: 1-я серия – цитогенетическое изучение героина; 2-я серия – цитогенетическое исследование клеток костного мозга белых мышей при комплексном введении героина и α-токоферола; 3-я серия – цитогенетическое изучение клеток при комбинированном воздействии героина и глюкозы; 4-я серия – цитогенетическое исследование мышей при комплексном введении героина, α-токоферола и глюкозы; 5-я серия – контрольная группа.

Хромосомные препараты из костного мозга животных готовились по методу Форда и Воллама [15]. Анализ препаратов проводился под световым микроскопом (МБИ6) при увеличении (10 × 90).

Учет структурных нарушений хромосом проводился по классификации Н. Бочкова [7], геномных мутаций – Н.Дубинина [8], патологических митозов – И Алова [3].

Изучение нарушения интерфазных ядер проводились по методу А. Пирцхелани [13].

Результаты исследовании и обсуждение

Из проведенных экспериментов установлено, что героин характеризуется сильным мутагенным и цитотоксическим действием. Он с высокой частотой вызывает структурные нарушения хромосом (лизис, одиночные и множественные фрагменты), патологические митозы (k-метафаза, полая метафаза, слипание хромосом) и геномные мутации (триплоидия, тетраплоидия). Существуют единичные данные о том, что героин характеризуется мутагенным действием [16]. Известно, что генетический аппарат клетки, который подвергается тяжелым нарушениям (фрагментация, лизис, к-метафаза, полая метафаза, полая интерфаза), в дальнейшем элиминируется [10, 12], т. е. имеет место цитотоксическое действие, что является показателем как мутагенного, так и общетоксического действия.

Из исследований, проведенных в 1986 году, известно, что у пациентов, которые употребляли героин и коноплю, наблюдалось повышение числа сестринских хроматидных обменов ($p < 0{,}002$). Таким образом, героин характеризуется высоким мутагенным и токсическим действием. Нашей целью было изучение таких веществ, которые максимально уменьшают нарушения генетического аппарата и токсическое воздействие героина. Нами были использованы α-токоферол и глюкоза. Из таблицы видно, что при отдельном влиянии героина на животных частота аберраций хромосом достигала 8,6 ± 1,8%, геномных мутаций — 12,4%, а патологических митозов — 14,6%. Также были повышены центромерные ассоциации хромосом — 3,8%, а на фоне α-токоферола этот показатель соответственно уменьшился до 2,0, 4,0, 4,8 и 1,2%, т. е. данный антимутаген уменьшает приблизительно в 4 раза мутагенное действие героина. В следующих сериях опытов нами было изучено влияние глюкозы в сочетании с героином. Оказалось, что каждодневное однократное введение героина в течение 10 дней с высокой частотой вызывало хромосомные аномалии (структурные нарушения хромосом, геномные мутации) в 21% случаев, также была повышена частота патологических митозов (14,6%) и центромерные ассоциации хромосом (3,8%). На фоне глюкозы эти показатели уменьшались в 3 раза (см. табл. 1). Данные, полученные нами, совпадают с данными других авторов, которые изучали антимутагенное влияния интерферона, комплексов витаминов при индукции мутаций канцерогенами,

* Мыши были получены из вивария Тбилисского государственного медицинского университета.

Таблица 1

Результаты цитогенетических исследований клеток костного мозга мышей при отдельном и комбинированном воздействии героина, α-токоферола и глюкозы

Варианты	Количество животных	Число исследованных метафаз	Струтурные нарушения хромосом, %	Геномные мутации, %	Патологические метафазы, %	Центромерные ассоциации хромосом, %	Число нарушений интерфазных ядер, %
Героин	5	450	8,9±1,8	12,4±1,4	14,6±1,6	3,8±0,0	0,4±0,2
Героин + α-токоферол	5	500	2,0±0,7	3,5±0,8	3,8±0,6	0,5±0,2	0,2±0,02
Героин + глюкоза	5	500	2,8±0,6	4,0±0,8	4,8±0,9	1,2±0,3	0,1±0,04
Героин + α-токоферол + глюкоза	5	450	2,0±0,6	2,7±0,7	3,2±0,9	0,3±0,9	0,01±0,01
Контроль	5	500	1,2±0,5	0,7±0,05	3,7±0,6	0,7±0,5	0,01±0,01

пестицидами и азотистых удобрений [6]. В последующей серии изучали антимутагенное и антигенотоксическое действие комплекса α-токоферола и глюкозы при индукции мутации героином. Оказалось, что цитогенетические нарушения, вызванные героином, при комплекном воздействии α-токоферола и глюкозы уменьшились в 4,5 раза.

Изученные нами ранее [14] канцерогены (бенз(а)пирен, основание Арнольда) и героин обладают резко выраженным токсическим действием: на связь между мутагенным, цитотоксическим и токсическим действием этих факторов указывает то, что увеличение дозы в определённом диапазоне влечет за собой увеличение токсического действия, при этом также увеличивается мутагенный и цитотоксический эффекты.

Как было показано, клетки с тяжелыми нарушениями впоследствии элиминируются. Вследствие повреждения митозного аппарата большинство изученных нами делящихся клеток были повреждены. С большой вероятностью можно допустить, что животные с указанными нарушениями могут оказаться нежизнеспособными, т. е. токсическое действие должно быть вызвано увеличением мутагенного и цитотоксического эффектов этих соединений.

При изучении механизмов действия антимутагенов основную сложность представляет то, что они относятся к соединениям разных классов. Антимутагены обладают свойством включаться в разные биологические процессы.

Один из способов реализации протекторных свойств — это дисмутагенизация, т. е. инактивация вредного агента антимутагеном. Второй путь — это участие антимутагенов в активации репарационных процессов. Указанные механизмы изучены и доказаны экспериментально [2, 9].

Исходя из вышесказанного, представляется перспективным использование антимутагенов с лечебно-профилактической целью людьми, имеющими контакт с наркотическими веществами, а также больными, отравленными указанными веществами.

Выводы

1. Героин характеризуется мутагенным и цитотоксическим действием. Введение героина (в терапевтической дозе) вызывает у лабораторных мышей достоверное повышение частоты структурных

нарушений хромосом, геномных мутаций, патологических митозов, центромерных ассоциаций хромосом и нарушение интерфазных ядер ($p < 0,001$).
2. Глюкоза и α-токоферол обладают выраженными антимутагенными и антицитотоксическими свойствами. Глюкоза уменьшает количество нарушений, вызываемых героином, в среднем в 3 раза, а α-токоферол — в 4 раза.
3. Более высоким антимутагенным и антицитотоксическим действием обладают комбинации глюкоза + α-токоферол: в этом случае указанные эффекты уменьшаются в 4,5 раза.

Литература

1. *Алакперов У.К.* Тормоза для мутагенов. *Наука и жизнь, 1986, №1 0, с. 56-60.*
2. *Алекперов У.К.* Антимутагенез. *М.: Наука, 1984, с. 13-17.*
3. *Алов И.А.* Цитофизиология и патология митоза. М., 1972, 263 с.
4. *Анохина И.П., Арзуманов Ю.Л., Веретинская А.Г. и др.* Проблемы диагностики и лечения алкоголизма и наркоманий. *Сборник трудов НИИ Наркологии. М.: Анахарсис, 2001, 112 с.*
5. *Бариляк И.Р.* Особенности эмбриотоксического действия вируса гриппа. *Архив анат. гистол. и эмбриол., 1986, № 2, с. 53-58.*
6. *Бичикашвили Н.* Автореферат. 2003.
7. *Бочков Н. П., Демин Ю.С., Лучник Н.В.* Классификация и методы учета хромосомных аббераций в соматических клетках. *Генетика, 1972, 8, № 6, с. 138-141.*
8. *Дубинин Н.П.* В кн.: Общая генетика, *М.: Наука, 1976, с. 145-160.*
9. *Засухина Г.Д.* Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды. *М.: Наука, 1979, 183 с.*
10. *Михайлова Г.Р., Горшунова Л.П.* Цитологическое и кариологическое изучение культур клеток человека хрон. инфиц. вируса гриппа Ао/PR8. *Цитол. и генет., 1980, 10, 6, с. 582-534.*
11. *Пирцхелани Н.А, Абзианидзе Е.Б., Пирцхелани А.Г.* Исследование хромосомных аномалии и патологических митозов при воздействии героина в эксперименте. *Сб. науч. трудов Тбил. гос. мед. университет, том XXXVII, 2001, с. 369-371.*
12. *Пирцхелани А.Г.* Докт. дисс. 1994.
13. *Пирцхелани А.Г., Мамаладзе Н.В.* Нарушение интерфазных ядер митозов и хромосом как показатель общетоксического и мутагенного действия факторов среды на организм. *Методические рекомендации. Тбилиси, 1991, 1-10.*
14. *Пирцхелани А.Г., Мамаладзе Н.В., Ониани Д.А, Пирцхелани Н.А.* Изучение антимутагенног и антитоксического действия глюкозы, полисахарида и «Центрум» в эксперименте. *Известия АН Грузии. Сер. «Биол. А», 2004, т. 30, № 2, с. 271-275.*
15. *Ford C., Wollam D.* A study of the mitotic chromosomes of mice of the strong line. *Exp. Cell Res., 1963, 32, 320-326.*

CYTOGENETIC ANALYSIS OF ANTIMUTAGENIC ACTION OF α-TOCOPHEROL AND GLUCOSE WHEN INDUCTING MUTATIONS IN LABORATORY MICE BY HEROIN

N.Pirtshelani, A.Pirtshelani, G.Kapanadze, N.Mamaladze

Tbilisi Medical State University

Research Center for Biomedical Technology of RAMS, Moscow

The ten-day administration of narcotic substance heroin (therapeutic dose) induced high incidence of structural aberrations of the chromosomes (deletions, multiple fragments, lyses), genomic mutations (triploid, tetraploidy), chromosomal centromere associations and pathologic mitosis (hollow metaphase, K-mitosis, chromosomal adhesion), and deterioration of the interphase nuclei (hollow nucleus). Experiments showed that glucose and vitamin a-tocopherol exerted highly effective antimutagenic and anticytotoxic action. Glucose decreased incidence and mutagenic and cytotoxic effects of the heroin about 3 times while α-tocopherol 4 times and complex α-tocopherol+glocose 4,5 times.

Key words: heroin, glucose, a-tocopherol, mitosis, chromosome, mice.

БИОМЕДИЦИНА ● № 2 2006, с. 117–121

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Новые пиримидины — стимуляторы регенерации

Ю.С. Макляков, Е.В. Иванова, С.А. Овчар, А.Л.Батурин

ГОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

В статье отражены данные о регенераторной активности нового синтетического производного пиримидина под кодом ВМ-7. Показано, что данное соединение ускоряет сроки заживления термических и химических ожогов у крыс, превосходя стандартный препарат метилурацил в 1,6 раза. Отмечено, что в опытной и контрольной группах и в группе сравнения не формировались грубые рубцовые изменения, что, вероятно, связано с высокой регенерационной способностью крыс за счет наличия высокопотентного клона стволовых эпителиальных клеток в области волосяных фолликулов.

Ключевые слова: пиримидины, регенераторная активность, ожоги.

Введение

Известно, что производные пиримидина входят в структуру нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и участвуют в синтезе белков [14, 15]. При ожоговых повреждениях в коже и нижележащих тканях происходит разрушение белков клеток. В основе процесса регенерации тканей всегда лежит новообразование белковых структур. Поэтому любой препарат, прямо или косвенно влияющий на этот процесс, относится к группе стимуляторов репаративной (восстановительной) регенерации тканей [10].

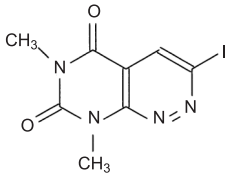
Еще в 60-70-е годы прошлого столетия Н.В. Лазарев, Т.В. Богданова, М.Л. Гершанович и ряд других ученых доказали наличие у производных пиримидина стимулировать репаративную регенерацию кожу у животных и людей при ожогах, трофических язвах, пролежнях, длительно незаживающих ранах [2, 4, 5, 10], результатом чего стал синтез, производство и широкое применение в клинической практике метилурацила [1-5, 10, 11]. В 1964 году В.С.Резником и Н.Г.Пашкуровым в институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН был синтезирован препарат под названием «Ксимедон». По химической структуре он является дериватом пиримидина и превосходит аналогичные препараты по эффективности регенераторного, противовоспалительного, иммуномодулирующего и ранозаживляющего действия [7, 12]. В 2000 г. группа ученых из Уральского научного центра Российской академии наук и Башкирского государственного медицинского университета синтезировали и изучили фармакологическую активность оксиметилурацила и 2-метил-4-амино-6-оксипиримидина (МАОП) [9]. Так, они доказали наличие у этих соединений способности стимулировать репаративную регенерацию кожи животных при химических и термических ожогах [9]. А при воздействии на крыс рентгеновскими лучами производные пиримидина повышали эффективность антибиотикотерапии. Соединение 2-метил-4-амино-6-оксипиримидин, в 2 раза эффективнее оксиметилурацила и в 6 раз – метилурацила, стимулировало репаративную регенерацию кожи. При общем облучении в дозе 6 Гр производные пиримидина также

повышали эффективность антибиотикотерапии. При профилактическом введении производных пиримидина в течение 7 дней до общего облучения повышалось их терапевтическое действие, уменьшалась выраженность экссудативного компонента, возрастала эпителизация ткани, снижались сроки заживления ран, повышалась выживаемость животных [8].

Цель работы заключалась в том, чтобы синтезировать вещество с заданными регенераторными биологическими свойствами. В результате было синтезировано вещество, которому присвоили шифр ВМ-7. Активность данного соединения была рассчитана сначала теоретически, а затем подтверждена исследованиями регенераторных свойств на моделях термических и химических ожогов у животных.

Материалы и методы

Вещество ВМ-7 относится по химической структуре к йодсодержащим производным пиримидина:



Соединение ВМ-7 является малотоксичным веществом (LD_{50} 4230 мг/кг).

Эксперименты выполнены на конвенциональных рандомбредных крысах обоего пола, в возрасте 6-9 месяцев, полученных из филиала «Андреевка» НЦ БМТ РАМН. Животные содержались в клетках из плексигласа, размером 55 х 45 х 15 см, с подстилкой из древесных опилок, по шесть голов в клетке. Крысы получали гранулированный комбикорм производства ООО «Лабораторснаб» два раза в день. Водой, предварительно прошедшей очистку на окислительно-сорбционном фильтре ОСФ «Купер-02», наполняли поилки объемом 200 мл. Смена поилки производилась два раза в сутки.

Методика формирования термического ожога

На боковой поверхности тела крыс выбривали шерсть. К оголенному месту приставляли стеклянный цилиндр, в который наливали воду с температурой 100 °С и удерживали в течение 7-10 с. Формировались ожоги III степени [9]. Повреждения имели округлую форму, дно ран было ярко-красным, местами с коричневым оттенком. Края представляли собой слегка нависающие маленькие кусочки мягких тканей красно-коричневого цвета. Вокруг раны отмечалась зона гиперемии шириной 0,5-0,8 см, а также небольшое количество пузырей. На дне визуализировались межреберные мышцы, местами у некоторых крыс были видны ребра.

Методика формирования химического ожога

На боковой поверхности тела крыс выбривали шерсть. На оголенное место наносили 2-3 капли концентрированной соляной кислоты и равномерно их распределяли. Формировались ожоги III степени [9]. Рана имела овальную, реже округлую форму, грязное дно буро-коричневого цвета, местами красного. Края ее слегка нависали в виде мелких рваных кусочков красно-коричневого цвета. По периферии, вокруг краев раны, отмечалась зона гиперемии шириной 1 см с небольшим количеством пузырей. У всех крыс в ране были видны скелетные (межреберные) мышцы. У ряда животных визуализировались обнаженные ребра. Формирование всех ожогов проводили под эфирным наркозом, согласно требованиям Международного этического комитета по экспериментам на лабораторных животных [13].

На 2-й день производили вульнографию. Для этого к образовавшимся ожоговым ранам приставляли кальку, переносили их контуры и вычисляли площадь ран. Среднюю площадь ран считали на 5, 10 и 15-й дни эксперимента.

Всех крыс разделили на 3 группы: опытной группе на рану наносили испытуемое вещество ВМ-7 в виде 10%-ной мази, группе сравнения наносили на рану 5%-ную мазь метилурацила (LD_{50} 4850 мг/кг), контрольной группе на рану наносили вазелин. Статистическая обработка результатов эксперимента проводилась с помощью q′-критерия Даннета [13].

Результаты и обсуждение

При термических ожогах у крыс, леченных веществом ВМ-7, на 5-й день края ран были неподвижны, спаянными с дном, завершалось покрытие их эпителием. Средняя площадь ран уменьшилась на 41% по сравнению с исходной (табл. 1). В группе крыс, леченных метилурацилом, края раны также были покрыты эпителием, но местами эпителизации была незавершена. Края не были плотно спаяны с дном раны. Средняя площадь ран уменьшилась на 29% по сравнению с исходной (табл. 1). У контрольных животных площадь ран уменьшилась всего на 12% (табл. 1).

На 8-й день был снят струп с ожоговой поверхности у всех крыс. Раны крыс, леченных веществом ВМ-7, имели к 8-10 дню чистое розовое дно, располагались на уровне краев кожи, средняя площадь их уменьшилась на 85%, в то время как в группе крыс, леченных метилурацилом, – на 47%, в контрольной – на 19%. Причем у первой группы площадь ран была меньше чем у второй почти в 4,5 раза, а по сравнению с контрольной группой – в 5,2 раза (табл. 1). Окончательная и полная регенерация ожоговых ран у крыс, леченных веществом ВМ-7, наступала к 12 дню без образования рубца, в группе, леченных метилурацилом, – к 18-19 дню, у контрольной группы – к 21-23 дню.

Далее изучали влияние испытуемого вещества на течение химического ожога у крыс. На 5-й день терапии ВМ-7 средняя площадь ран уменьшилась на 49%, а у леченных метилурацилом на 30 % от исходной (табл. 2). К 10-му дню в опытной группе площадь ран снизилась на 79%, а в группе, леченной метилурацилом, – на 57% от

Таблица 1

Регенерация ран у крыс после термического ожога

Препарат	Средняя площадь ран, мм²			
	Исходная	5-й день	10-й день	12-й день
ВМ-7	39,3±0,7	20,0±1,3*▽	6,2±1,2*▽	0,0±0,0*▽
Метилурацил	38,8±0,9	24,6±2,7	16,3±2,1*	12,2±1,3*
Контроль	39,0±0,6	26,9±2,6	25,3±2,5	23,8±2,6

Таблица 2

Регенерация ран у крыс после химического ожога

Препарат	Средняя площадь ран, мм²			
	Исходная	5-й день	10-й день	12-й день
ВМ-7	33,6±0,8	20,1±1,2*▽	4,4±1,1*▽	0,0±0,0*▽
Метилурацил	33,7±0,7	29,45±2,1	17,8±2,2*	16,3±1,1*
Контроль	34,0±0,4	28,7±1,6	26,2±1,3	25,8±1,4

* — данные достоверны по отношению к контролю;
▽ — данные достоверны по отношению к метилурацилу.

исходной. У опытной группы площадь была меньше чем у группы сравнения в 2,7 раза, а по сравнению с контролем – в 5,2 раза. Уже к 11-12-му дню отмечалось полное, без рубцовых изменений, заживление ожоговых ран у крыс, леченных ВМ-7. Аналогичные изменения наблюдались и в группе животных, леченных метилурацилом, но лишь к 16-18-му дню. У контрольной группы полное заживление ран отмечено только на 20-22-е сутки.

Таким образом, применение вещества ВМ-7 при термических ожогах у крыс сокращало сроки заживления ран в среднем на 6 суток по сравнению с группой, леченной метилурацилом, и на 10 суток по сравнению с контрольной группой.

Лечение крыс с химическими ожогами веществом ВМ-7 позволило сократить сроки регенерации ран на 5,5 суток по сравнению с группой, леченной метилурацилом, и на 9,5 суток по сравнению с контролем.

Учитывая, что крысы являются животными с высокой регенерационной способностью и имеют высокопотентный клон стволовых эпителиальных клеток в области волосяных фолликулов [6], можно говорить о достаточной эпителизации ран, без образования грубых рубцов. Вероятно, этим объясняется тот факт, что во всех группах животных не сформировались рубцы, и место ожога было покрыто шерстью.

Выводы

1. Новое синтетическое производное пиримидина под кодом ВМ-7 обладает способностью стимулировать репаративную регенерацию тканей.
2. Вещество ВМ-7 превосходит по времени заживления ран эталонный препарат метилурацил в 1,6 раза.
3. Вещество ВМ-7 относится к группе малотоксичных соединений (LD_{50} — 4230 мг/кг) и сравнимо по показателю с острой токсичностью метилурацила (LD_{50} — 4850 мг/кг).

Литература

1. *Билич Г.Л., Колла Э.В.* Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в клинике и эксперименте. *Горький*: *1978, с. 10-17.*
2. *Богданова Т.М.* Материалы конференции по проблеме применения пиримидиновых и пуриновых производных в онкологии. *Л.*: *1966, с. 19-20.*
3. *Бушма М.И.* «Фармакологическая активность уридина и цитидина» Автореф. дисс. канд. мед. наук. *Тарту*: *1979.*
4. *Гершанович М.Л.* Материалы конференции по проблеме применения пиримидиновых и пуриновых производных в онкологии. *Л.*: *1963, с. 20-21.*
5. *Гетманский А.П.* Материалы конференции по проблеме применения пиримидиновых и пуриновых производных в онкологии. *Л.*: *1966, с. 111.*
6. *Динзмор Ч.Е.* Истоки современных исследований в области регенерации: история вопроса. *Онтогенез. 1992, т.23, № 1, с. 5-22.*
7. *Измайлов С.Г., Измайлов Г.А., Аверьянов М.Ю., Резник В.С.* Ксимедон в клинической практике. Н. Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, *2001. с. 188.*
8. *Исмагилова А.П., Зарудний Ф.С., Лазарева Д.Н., Савицкий Ф.П.* Производные пиримидина повышают эффективность антибиотикотерапии при ионизирующем облучении. *Антибиотики и химиотерапия*, *1998, № 7, с. 12-14.*
9. *Исмагилова А.Ф., Белов А.Е., Зарудний Ф.С., Исмагилова Л.У.* Влияние некоторых производных пиримидина на репаративную регенерацию кожи лабораторных животных при стрессе. *Эксп. и клин. фармакология. 2000, № 4, с. 41.*
10. *Лазарев Н.В.* Применение пиримидиновых и пуриновых производных в хирургии и других областях медицины. Ростов-на-Дону: *1970, с. 4-10.*
11. *Лазарева Д.Н., Волков С.С., Зарудний Ф.С.* Иммунная система и регенераторные процессы. *Иммунология. 1995, № 4, с. 59-61.*
12. *Лифшиц Р.И., Клячкин С.А., Однопозов А.К. и др.* Ксимедон. Казань: Изд-во ИОФХ АН СССР им.А.Е.Арбузова, *1986. с. 46–74.*

13. Положение и руководство «Лабораторные животные» *М.: Межакадемическое издательство ВПК 2004.*
14. *Турпаев Т.М.* Биохимия и функция нервной системы. *Л.: 1967, с. 234-243.*
15. *Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э.* Основы биохимии. *М.: 1981, т.2, с.124-131.*

NEW PYRIMIDINES – STIMULATORS OF REGENERATION

Yu.S. Makljakov, E.V. Ivanova, S.A. Ovchar, A.L. Baturin
Rostov State Medical University, Rostov-on-Don
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Regenerative activity of a new synthetic derivate of pyrimidines, code VM 7, is discussed. This substance accelerates healing of third-degree burns in rats and surpasses methyluracil in efficacy. Substance BM-7 retarded the formation of coarse scars.

Key words: pyrimidines, regeneration activity, burns.

■

Лечение гиповитаминозов: выбор оптимальной нагрузочной дозы рибофлавина путем сопоставления фармакокинетических параметров, характеризующих всасывание и выведение

Е.В. Ших, О.С. Конюхова, Л.М. Моргунова

ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва
ММА им. И.М. Сеченова, Москва
Институт клинической фармакологии ФГУ НЦ ЭСМП РОСЗДРАВНАДЗОРА

Приведены данные по изучению фармакокинетичесих параметров рибофлавина, характеризующих его всасывание и выведение при приеме в нагрузочных дозах 10, 20 и 30 мг в виде монопрепарата. Показано, что увеличение дозы вызывает как повышение максимальной концентрации рибофлавина в плазме крови, так и усиление его выведения из организма. Доза 20 мг является наиболее оптимальной для использования в лечебной практике с целью лечения гиповитаминоза.

Ключевые слова: рибофлавин, нагрузочная доза, всасывание, выведение, фармакокинетика.

Введение

В последние годы в медицинской практике все более широкое применение находят витаминные комплексы. Витаминные комплексы используются как для профилактики гипо- и авитаминоза, так и для лечения этих состояний, кроме того, их включают в состав стандартной комплексной терапии целого ряда заболеваний. При этом витаминные и витаминно-минеральные комплексы очень сильно отличаются не только по качественному, но и по количественному составу [4].

Ряд комплексов, содержащих витамины, витаминоподобные вещества, макро- и микроэлементы в количествах, адекватных суточному потреблению в качестве пищевых продуктов, применяются в виде биологически активных добавок к пище. Рационально сформированные БАД, содержащие адекватное суточной норме количество микронутриентов, способны повысить неспецифическую резистентность

организма и предотвратить развитие гиповитаминоза, если он не обусловлен патологией внутренних органов и/или не является результатом медикаментозного лечения пациента [2].

Регистрация витаминных комплексов в качестве лекарственных препаратов предполагает наличие определенной фармакологической активности, которая должна иметь подтверждение.

Лечение гиповитаминоза и авитаминоза основывается на всасывании определенного количества витамина из комплекса. Результатом этого является исчезновение клинических симптомов и повышение до нормального уровня биохимических показателей обеспеченности организма этим витамином. Однако при проведении лечения по поводу гиповитаминоза и авитаминоза врачи не контролируют уровень витамина в плазме крови, а основываются на клинических наблюдения [4, 5].

Так как клиническая картина гиповитаминоза не имеет патогномоничных симптомов и гиповитаминоз, как правило, протекает на фоне другой соматической патологии, контролировать эффективность применения витаминного комплекса без определения содержания витамина в плазме крови достаточно трудно.

При лечении гиповитаминозов большое значение имеет доза витаминов. Этот факт требует изучения и выбора оптимальной дозы для каждого витамина в отдельности.

Материалы и методы

Проведено исследование у здоровых добровольцев с приемом дозы 10, 20 и 30 мг тиамина с интервалом в 1 неделю. Забор образцов крови для построения фармакокинетической кривой витамина B_2 производился натощак в 8 час. 30 мин (определение содержания эндогенного уровня), затем через 30 мин, 1 час, 1,5 часа, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов и 6 часов после приема. Для определения концентрации витамина B_2 образцы центрифугировались, плазма отбиралась, замораживалась и хранилась при температуре $-35\ ^{o}C$.

Определение рибофлавина в моче проводилось без приема препарата, при приеме в дозе 10, 20 и 30 мг. Сбор мочи проводился по интервалам в 4 часа в течение суток после начала исследования. Определялось количество рибофлавина, экскретируемое волонтером в течение суток.

Количественное определение B_2 проводили методом высокоэффективной жидкостной хромотографии, прибор Shimadzu (LC-6A, детектор SPD-6A), колонка диасорб – 130-C_{16}T (4 × 250 мм, 7 мкм), объем петли дозатора 100 мкл. Эльюирование проводили смесью спирта метилового с водой с различным соотношением компонентов и добавлением ион-парных реагентов, скорость потока 1 мл в минуту. УФ-детектирование осуществляли при длине волны 254 нм.

Испытывались различные методы экстракции витаминов из таблетной массы. Оптимальное разделение витаминов достигнуто в подвижной фазе метанол–вода (50:50) с введением ион-парных реагентов (1,2 мг/мл). Экстракции исследуемых проб целесообразно проводить смесью метанол-вода 1:1, при этом процент экстракции составил 95%. Относительная ошибка отдельного определения от ± 1,5 до ±3,8%. Время анализа составило 25 минут. Прочие компоненты таблеток определению не мешали.

Результаты исследования

При приеме здоровыми добровольцами витамина B_2 в дозе 10 и 20 мг максимальная концентрация в плазме крови обнаруживалась через 4 часа после введения препарата. При приеме витамина теми же добровольцами в дозе 30 мг время достижения максимальной концентрации составляло 2 часа. Проведенные нами ранее исследования с приемом волонтерами этого же витамина в дозах 1,5 и 2 мг показа-

ли, что время достижения максимальной концентрации для этих доз составляет 1,5–2 часа. Максимальная концентрация витамина B_2 в плазме крови при приеме в дозе 20 мг статистически достоверно превышает его максимальную концентрацию при приеме в дозе 10 мг, а максимальная концентрация при приеме в дозе 30 мг – максимальную концентрацию при приеме в дозе 20 мг. Выявлена прямая коррелятивная зависимость между величиной, принятой здоровым волонтером дозы рибофлавина, и максимальной концентрацией рибофлавина в плазме крови. Коэффициент корреляции между принятой дозой и максимальной концентрацией составил 0,99 (табл. 1).

При приеме витамина B_2 в дозе 10 мг наиболее высокая концентрация в моче определялась в период времени от 4 до 8 часов после приема препарата, при дозе 20 мг и 30 мг в первые четыре часа после приема препарата. При этом максимальная концентрация в моче при приеме в дозах 10 и 20 мг статистически достоверных различий не имела. Максимальная концентрация в моче при приеме B_2 в дозе 30 мг статистически достоверно превышала концентрацию в моче как при приеме при приеме в дозе 10 мг, так и при приеме в дозе 20 мг (табл. 2).

При приеме витамина в дозе 10 мг максимальная экскреция витамина происходит в интервале времени через 4-8 часов после приема (45,31% от всего экскретируемого количества). При приеме витамина в дозе 20 мг максимальная экскреция происходит в первые 4 часа после приема (51,96% от всего экскретируемого количества), при приеме витамина в дозе 30 мг максимальная экскреция происходит также в первые 4 часа после приема (54,11% от всего экскретируемого количества) (табл.3).

При приеме витамина B_2 в дозе 10 мг экскреция в первые 12 часов составила 78% от экскретируемого в течении суток, при приеме в дозе 20 мг – 87%, при приеме в

Таблица 1

Концентрация витамина B_2 в плазме крови здоровых добровольцев при приеме в различных дозах (нг/мл)

Доза	Эндогенное значение	2 час	4 час	6 час	8 час
Без приема	3,01±0,42	3,9±0,41	3,62±0,4	2,97±0,4	3,38±0,4
10 мг	2,67±0,31	7,09±0,8	8,7±0,9	8,16±0,9	4,53±0,34
20 мг	3,89±0,5	16,55±1,9	18,42±2,1	12,7±1,5	5,02±0,38
30 мг	3,01±0,43	31,31±3,5	26,72±2,9	28,89±3,2	16,48±1,8

Таблица 2

Концентрация витамина B_2 в моче в зависимости от принятой дозы (нг/мл)

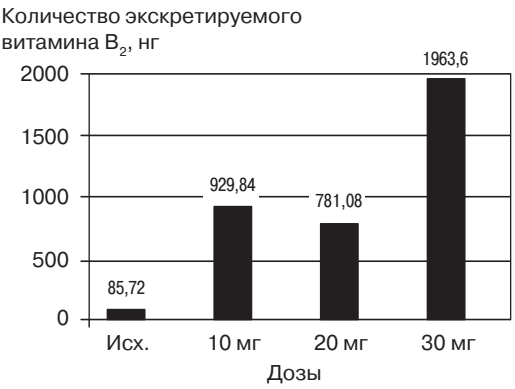
Доза	Время суток				
	8-12	12-16	16-20	20-24	24-8
Исходная	124,04±11,2	141,05±15,1	134,57±14,5	149,14±16,7	138,68±15,2
10 мг	489,66±56,3	4923,1±378,4	1495,9±167,1	542,41±62,3	184,1±20,2
20 мг	1883,97±123,4	575,9±61,4	462,48±52,6	281,04±30,1	222,02±24,1
30 мг	5968,8±498,4	3703,9±401,2	1481,75±153,2	460,74±51,2	594,1±61,3

Таблица 3

Экскреция витамина B_2 с мочой в зависимости от принятой дозы (в среднем в час в указанные временные интервалы, нг)

Доза	Время суток				
	8-12	12-16	16-20	20-24	24-8
Исходная	5,68±0,6	7,4±0,9	8,35±0,9	12,34±1,8	13,24±1,7
10 мг	31,11±4,1	127,75±13,2	73,6±8,1	12,3±1,8	36,63±4,3
20 мг	126,5±13,1	41,27±5,6	27,5±3,6	17,43±1,8	30,71±3,5
30 мг	294,5±29,8	144,9±15,2	51,5±6,6	32,13±4,1	21,2±2,7

дозе 30 мг – 96%. Количество витамина B_2 экскретируемое при приеме здоровым добровольцем в дозе 30 мг статистически достоверно превышает количество экскретируемого витамина B_2 при его приеме как в дозе 10 мг, так и в дозе 20 мг. Количество экскретируемого витамина B_2 при его приеме в дозе 10 мг статистически достоверно не отличается от количества экскретируемого витамина B_2 при его приеме в дозе 20 мг.



Выведение витамина B_2 с мочой в течение 12 ч после приема различных доз

Обсуждение результатов

При высоких дозах витамина B_2 (10 и 20 мг) отмечено увеличение времени достижения максимальной концентрации, по сравнению с более низкими дозами (1,5 и 2 мг). При приеме рибофлавина в дозе 30 мг максимальная концентрация отмечается через 2 ч, что, вероятнее всего, объясняется включением дополнительного механизма всасывания рибофлавина путем простой диффузии по градиенту концентрации [1, 3].

Обнаружено, что при введении витамина B_2 в дозах 10, 20 и 30 мг его максимальная концентрация в плазме крови находится в прямой коррелятивной зависимости от количества принятого витамина. При этом не выявлено прямой коррелятивной зависимости между количеством принятого рибофлавина и количеством рибофлавина, экскретируемого в течение суток.

Поиск оптимальной дозы необходимо проводить по каждому витамину, так как простое увеличение дозы не означает, что мы увеличиваем количество поступившего в организм витамина, а иногда и наоборот. Увеличение дозы витамина приводит к более существенному выведению его из организма, результатом чего может являться не обогащение, а обеднение организма витамином. При этом возможно уменьшение всасывания других витаминов группы В в связи с конкуренцией за переносчики, участвующие в механизмах активного транспорта витаминов [4, 5].

Выводы

1. Существует прямая коррелятивная зависимость между дозой принятого рибофлавина (в диапазоне 10-30 мг) и его максимальной концентрацией в плазме крови здоровых добровольцев.

2. Не наблюдается прямой коррелятивной зависимости между дозой принятого рибофлавина (в том же диапазоне доз) и количеством экскретируемого рибофлавина.
3. Количество экскретиремого в течение суток рибофлавина при его приеме в дозе 10 и 20 мг не имеет статистически достоверных отличий.
4. Наиболее оптимальной дозой для лечения гипо- и авитаминоза по витамину B_2 в интервале изученных доз является доза 20 мг.

Литература

1. Клиническая фармакология. Под ред. акад. РАМН проф. Кукеса В.Г. *Москва, «ГЕОТАР-МЕД», 2004.*
2. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. Методические рекомендации МР 2.3.1. 1915-04 (утв. 2 июля 2004 г.). М, 2004.
3. *Тутельян В.А., Кукес В.К.* Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии. *М.: Палея, 2001. 465 с.*
4. *Ших Е.В.* Витаминный статус и его восстановление с помощью фармакологической коррекции витаминными препаратами Автореф. диссерт. д.м.н., Москва, 2002.
5. B-Vitamins Prove Effective in relieving chronic pain. *American Physiological Society. April, 2003.*
6. *Shrimpton D.H.* Nutritional implications of micronutrients interactions. *Chemist and Druggist, 2004, 15 May, pp. 38-41.*

TREATMENT OF HYPOVITAMINOSIS: SELECTION OF OPTIMUM SATING DOSE OF RIBOFLAVINUM BY COMPARISON OF PHARMACOKINETIC PARAMETERS DEFINING ABSORPTION AND EXCRETION

E.V. Shikh, O.S. Konyukhova, L.M. Krasnykh, L.M. Morgunova

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow
Sechenov Moscow Medical Academy
Institute of Clinical Pharmacology of FSD SC ESMP ROSZDRAVNADZOR

This paper addresses pharmacokinetics of riboflavinum when taking as a monopreparation in loading doses 10, 20, 30 mg. It is shown that increasing dose increases maximum concentration of riboflavinum in plasma and enhances excretion of riboflavinum from an organism. Among all doses studied a 20-mg dose is optimal for use in medical practice for treatment of hypovitaminosis.

Keywords: riboflavinum, loading dose, absorption, excretion, pharmacokinetics

БИОМЕДИЦИНА ● № 2 2006, с. 126–129

Снижение «изомерического балласта» и безопасность лекарств

Д.В. Байдак, Н.В. Терещук, Д.Н. Цветков, Г.Н. Гильдеева

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва
ММА им. И.М. Сеченова, Москва

В статье проанализирована возможность снижения числа неблагоприятных побочных реакций лекарств при применении их энантиомеров на примере трех репаратов: амлодипина, клопидогреля и циклосерина.

Ключевые слова: энантиомеры, изомерический балласт, рацемические смеси, конформеры.

В настоящее время всё большую тревогу вызывают участившиеся случаи осложнений лекарственной терапии, которые вышли на четвертое место среди причин смертности. Вот почему так остро встает вопрос поиска путей предотвращения возникновения неблагоприятных побочных реакций. Одним из таких путей может быть снижение воздействий «рацемического баланса» лекарств. Рост применения в фармакотерапии синтетических препаратов в качестве рацемических смесей поставил проблему устранения «изомерического балласта» как одну из важнейших в плане оптимизации применения в медицине оптически активных лекарственных веществ (ЛВ) и ксенобиотиков.

С развитием молекулярной стереофармакологии объектом самого пристального внимания химиков, фармакологов и клиницистов стал анализ возможностей мобилизации лечебного потенциала известных лекарственных веществ за счет избирательного использования оптически активных ЛВ-энантиомеров, а также «предпочтительных» конформеров ЛВ. Обязательным компонентом фармакологических исследований является не только изучение количественной взаимосвязи структура–активность (QSAR) лекарственных соединений, но и учет их стереоструктуры (QSSAR) как в плане оптической, геометрической, так и конформационной изомерии.

В данной работе представлены различия в фармакологической активности лекарственных средств и их оптических изомеров на примере трёх препаратов: амлодипина, клопидогреля и циклосерина.

Амлодипин – производное дигидропиридина, антагонист кальция второго поколения; антиангинальное, гипотензивное, сосудорасширяющее, спазмолитическое средство.

Амлодипин имеет два стереоизомера – R(+), S(-). На фармацевтическом рынке в терапии используется как рацемат [9]. При анализе источников информации было обнаружено, что S-амлодипин в дозе 2,5 мг эквивалентен по своему действию и толерантности амлодипину 5 мг в лечении гипертензии легкой и средней степени тяжести: у испытуемых достоверно одинаково происходило уменьшение среднего систолического и диастолического кровяного давления [8]. Причем вазодилятирующее действие оказывает только S(-)–изомер [7] (антагонист кальциевых каналов) [5], обладающий блокирующей активностью каналов L-типа [7, 9], в то время как активность R(+)-изомера в 1000 раз слабее [9].

Амлодипин и его R(+)–изомер высвобождают NO в изолированных коронарных микрососудах *in vitro* в концетрациязависимой форме.

S(-)–изомер (энантиомер) не оказывает эффекта на высвобождение NO в какой либо концентрации.

Амлодипин и его R(+)–изомер также уменьшают потребление кислорода миокардом у собак *in vitro* по типу блокады N(омега)-нитро-L-аргинин метиловым эфиром. S(-)–изомер (энантиомер) амлодипина не оказывал эффекта [9].

Были изучены и сравнены фармакокинетические параметры R-(+) и S-(-) амлодипина после их однократного совместного приема здоровыми мужчинами-волонтерами с приемом рацемической смеси. Результаты исследования выявили, что фармакокинетика R-(+) и S-(-) амлодипина после однократного приема энантиомеров сравнима с фармакокинетикой каждого энантиомера после приема рацемата. После однократного приема энантиомеров *in vivo* в плазме человека не образовывалось рацемата [6].

Известно, что R-(+) энантиомер амлодипина отменял резистентность хлорокина к Plasmodium falciparum *in vitro*. R-(+) энантиомер амлодипина незначительно эффективенее в потенцировании действия хлорокина против хлорокин-резистентных видов (штаммов) паразитов *in vitro* и *in vivo* без летального эффекта и приводил к существенному увеличению концентрации хлорокина в инфицированных эритроцитах мышей [4]. У хлорокинчувствительных паразитов не было потенцирующего эффекта. Оба энантиомера быстро проникали в эритроциты с паразитами в одинаковой степени. Отмененная резистентность хлорокина энантиомерами амлодипина связана с дозозависимым увеличением аккумуляции хлорокина внутри эритроцитов с паразитами у резистентных пациентов. Эти результаты предполагают, что потенцирующий эффект на хлорокин независим от метаболизма кальция у малярийных паразитов [3]. При сравнении R-(+) энантиомера и рацемической смеси в совместном приеме с хлорокином *in vitro* рацемат был незначительно эффективенее, чем R-(+)–изомер. В эксперименте на мышах *in vivo* R-(+) энантиомер в комбинации с хлорокином в одинаковых дозах также усиливал противомалярийное действие и даже в наивысших дозах (250 мг/кг) не вызывал летального эффекта в отличие от рацемического амлодипина, который уже в дозе 30-40 мг/кг приводил к летальному исходу [2, 4].

Клопидогрель – ***метил- (+) - (S) – альфа- (о-хлорфенил) –6,7 –дигидротиено*** [3.2-с] пиридин-5(4Н)-ацетат, антиагрегационное средство. Имеет активную форму метаболита S-конфигурации при атоме углерода С7 и Z конфигурацию при двойной связи у атомов углерода С3-С16, R–изомер лишен антитромботической активности и может вызвать судороги (конвульсии) в больших дозах у животных, т.е. обладает токсическим действием.

Циклосерин – антибиотик, образующийся в процессе жизнедеятельности *Streptomyces orchidaceus* или других микроорганизмов; получают также синтетическим путем. По химической структуре представляет собой D-4-амино-3-изоксазолидинон

Препарат обладает широким спектром антибактериального действия: угнетает грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Наиболее ценнным свойством является его способность задерживать рост микобактерий туберкулеза. По активности уступает стептомицину, тубазиду и фтивазиду, но действует на микобактерии туберкулеза, устойчивые к этим препаратам и ПАСК [1].

Противотуберкулезной активностью обладает D-форма, но при лечении могут наблюдаться побочные явления, обусловленные главным образом токсическим влиянием препарата на нервную систему: головная боль, головокружение, бессонница (иногда, наоборот, сонливость), беспокойство и т.д. [1], вплоть до суицидальных явлений. Обычно эти явления проходят при уменьшении дозы или отмене препарата. Предупредить или уменьшить токсическое действие циклосерина можно,

назначая в период лечения глутаминовую кислоту [1].

L-cycloserine генерирует характерные PLP-adducts, которые создают инактивацию SPT (серин пальмитоилтрансфераза – ключевой энзим в биосинтезе сфинголипидов и катализирует конденсацию путем декарбоксилирования L-серина и пальмитоил коэнзима А в 3-кетодигидросфинголизин) в необратимой форме.

L-cycloserine — более важный ингибитор роста *Bacteroides levii*, чем D-cycloserine. L- и D-cycloserine инактивируют кристаллическую структуру рацемазы аланина *Bacillus stearothermophilus*.

D-cycloserine, лечит атаксию у крыс и имеет более длительный постэффект, чем другие потенциальные препараты для лечения атаксии. D-cycloserine восстанавливает память.

Таким образом, в настоящее время известно, что энантиомеры описанных лекарственных препаратов обладают различными фармакологическими свойствами.

Применение энантиомеров может позволить снизить общую токсичность ЛВ-рацематов, существенно уменьшить затраты, нагрузки на технологические линии и на экологию. Это тем более перспективно, что стереоселективный синтез ЛВ и ксенобиотиков технологически становится не только возможным, но и рентабельным.

Литература

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. *М.: Медицина. Т. 2, с.381-382.*
2. *Ajayi A.A, Adigun A.Q.* Syncope following oral chloroquine administration in a hypertensive patient controlled on amlodipine. *Br J Clin Pharmacol. 2002 Apr; 53(4): 404-5.*
3. *Basco L.K, Le Bras. J.* Plasmodium falciparum: in vitro drug interaction between chloroquine and enantiomers of amlodipine. *Exp Parasitol. 1991 Apr;72(3):262-70. Erratum in: Exp Parasitol 1993 May;7 6(3): 328.*
4. *Deloron P., Basco L.K., Dubois B., Gaudin C., Clavier F., Le Bras J., Verdier F.* In vitro and in vivo potentiation of chloroquine against malaria parasites by an enantiomer of amlodipine. *Antimicrob Agents Chemother. 1991 Jul; 35(7): 1338-42.*
5. *Goldmann S., Stoltefuss J., Born L.* Determination of the absolute configuration of the active amlodipine enantiomer as (-)-S: a correction. *J Med Chem. 1992 Sep 4; 35(18): 3341-4.*
6. *Luksa J., Josic D., Kremser M., Kopitar Z., Milutinovic S.* Pharmacokinetic behaviour of R-(+)- and S-(-)-amlodipine after single enantiomer administration. J *Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1997 Dec 5;703(1-2):185-93.*
7. *Ohmori M., Arakawa M., Harada K.et al.* Stereoselective pharmacokinetics of amlodipine in elderly hypertensive patients. *Am J Ther. 2003 Jan-Feb; 10(1): 29-31.*
8. *Pathak L., Hiremath, Kerkar P.G, Manade V.G.* Multicentric, clinical trial of S-Amlodipine 2.5 mg versus Amlodipine 5 mg in the treatment of mild to moderate hypertension – a randomized, double-blind clinical trial. *J Assoc Physicians India. 2004 Mar; 52: 197-202.*
9. *Zhang X.P., Loke K.E., Mital S., Chahwala S., Hintze T.H.* Paradoxical release of nitric oxide by an L-type calcium channel antagonist, the R+ enantiomer of amlodipine. *J Cardiovasc Pharmacol». 2002 Feb; 39(2): 208-14.*

REDUCTION OF «ISOMERIC BALLAST» AND IMPROVEMENT OF DRUG SAFETY

D.V. Baidak, N.V. Tereschuk, D.N. Tsvetkov, G.N. Gildeeva

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Sechenov Moscow Medical Academy

The possibility of reducing side effects of drugs through usage of their enantiomers was analyzed. As an example there were taken amlodipine, clopidogrele and cycloserine.

Key words: enantiomers, «isomeric ballast».

Выведение оппозитных линий крыс по чувствительности к острой гипобарической гипоксии

Х.Х. Семенов

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Выполнена работа по селекции линий крыс, высоко- и низкочувствительных к острой гипобарической гипоксии, на основе популяции нелинейных крыс филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. В результате отбора и тесного инбридинга (близкородственного скрещивания родных братьев и сестер) в течение 5 поколений были получены линии крыс: низкоустойчивая (НУ), в которой доля низкоустойчивых животных составляла более 83%, и высокоустойчивая (ВУ) линия, доля высокоустойчивых крыс в которой была около 86%, что соответствует теоретически ожидаемому уровню для указанного инбредного возраста. Такие линии могут быть использованы в качестве биологических моделей в экспериментальных исследованиях, посвященных поиску антигипоксантов – веществ, облегчающих реакцию организма на гипоксию, либо предотвращающих ее развитие.

Ключевые слова: селекция, крысы, гипобарическая гипоксия, инбридинг.

Введение

Гипоксия – актуальнейшая проблема современной медицины. Любое патологическое состояние прямо или косвенно связано с нарушением кислородного гомеостаза организма. Инсульты, инфаркты, ишемические состояния различных органов, инфекционные заболевания – это лишь небольшой перечень тех патологий, в основе генеза которых лежит гипоксия. Поэтому защита от гипоксии и ее последствий становится первостепенной задачей медицины и, кроме того, приобретает социальную значимость [1, 3, 4, 5].

Проблема защиты организма от гипоксии является наименее разработанной в фармакологии и патологической физиологии. Она включает два самостоятельных подхода. Первый основан на использовании способов увеличения естественной резистентности организма к гипоксии и составляет основу самостоятельной области – адаптационной медицины, успешно развиваемой в последние годы в нашей стране [6]. Второй – путь фармакологической коррекции гипоксических состояний. Его основателями являются ученые – представители ленинградской школы фармакологов (В.В.Закусов, 1968; Л.В.Пастушенков, 1969; В.М.Виноградов, 1978 – 1985; П.П.Денисенко, 1986, 1988 и др.). Именно этой школой был впервые введен в употребление термин «антигипоксанты», обозначающий средства защиты от гипоксических повреждений [1, 3, 4, 5].

В настоящее время можно назвать десятки работ, посвященных поиску антигипоксантов – веществ, облегчающих реакцию организма на гипоксию, либо предотвращающих ее развитие, ускоряющих нормализацию функции в постгипоксический период и увеличивающих резистентность организма или отдельных органов к ней [3, 5, 7].

Поэтому актуален выбор адекватной биологической модели для исследования антигипоксантов, так как от чувствительности животного к гипоксии во многом зависит и точность оценки антигипоксантного действия препаратов.

Известно, что животные отличаются по своей чувствительности к воздействию экстремальных факторов. Гипоксия – один из таких факторов. В связи с этим задачей настоящей работы является создание линий крыс, оппозитных по чувствительности к острой гипобарической гипоксии.

Необходимость такой работы вызвана тем, что экспериментаторы испытывают определенные затруднения, так как до сих пор отсутствуют линии крыс, которые были бы селекционированы по чувствительности к острой гипобарической гипоксии. Отбор же их из популяции неинбредных животных требует больших материальных и временных затрат.

Материалы и методы

Исходным материалом служила неинбредная популяция крыс филиала «Андреевка» (ранее Центральный питомник РАМН) ГУ НЦ БМТ РАМН. Для селекции были использованы животные обоего пола в возрасте 3–3,5 месяцев, содержащиеся в конвенциональных условиях. Крысы содержались в пластмассовых клетках Т2 с автопоилками и получали гранулированный комбикорм фирмы «Информкорм» вволю. Еженедельно они получали также белково-витаминную подкорку (состав: овсянка, сухое молоко, витамины А, Е, С в масле). В качестве подстилочного материала применялись древесные опилки.

Отбор животных осуществляли по индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии. Для этого каждая крыса в барокамере «поднималась на критическую высоту» (11,5 тыс. м) со скоростью 165 м/сек, где она находилась до агонального состояния. Исследуемые показатели: ВПП – время первого падения (переход в лежачее положение), характеризующее порог реакции организма на данное воздействие, с; ВЖ – время жизни «на высоте» (до появления агонального дыхания), с; ВВП – время восстановления позы после «спуска» животного с «высоты», с [7].

Мерой оценки чувствительности животных к острой гипобарической гипоксии служило время жизни «на высоте». К группе высокоустойчивых крыс были отнесены те животные, которые выдерживали в барокамере острую гипобарическую гипоксию не менее 1200 с (ВЖ > 1200 с), к низкоустойчивым – животные, выдерживающие острую гипобарическую гипоксию менее 150 сек (ВЖ < 150 с).

Разведение отобранных (по селектируемому признаку) животных осуществляется в строгом соответствии с «Правилами разведения инбредных животных» по системе близкородственного скрещивания родных братьев и сестер (в соотношении 1:1). При этом нами неукоснительно соблюдаются два условия, а именно, чтобы потомство каждого последующего поколения проходило тест на чувствительность к острой гипобарической гипоксии и соответствовало требованию селекции. Второе – для поддержания гипоксийных линий (во избежание нежелательных скрещиваний) потомство каждого последующего поколения при отсадке от родителей рассаживалось раздельно по полу.

Результаты

Показателем эффективности селекции при инбредном разведении является степень инбридинга, что означает процентное соотношение гомозиготных и гетерозиготных особей в инбредируемой линии. Очевидно, что чем больше инбредных поколений прошла данная линия, тем больше соотношение в ней гомозигот и гетерозигот смещается в пользу первых. В представленных таблицах приведены результаты селекции инбредируемых линий крыс по чувствительности к острой гипобарической гипоксии. Для сравнения взяты животные второго (F2) и пятого (F5) поколений.

Как свидетельствуют полученные данные, у крыс обеих линий во втором поколении обнаруживаются все три категории чувствительности к гипоксии – низкоустойчивые, среднеустойчивые и высокоустойчивые, в то время как у крыс пятого поколения проявляются только по две категории чувствительности. У высокоустойчивой линии отсутствует низкоустойчивая

категория крыс, а у низкоустойчивой – нет высокоустойчивых животных.

В целях контроля степени эффективности селекции американским генетиком Райтом были введены кривые роста гомозиготности при скрещивании животных, связанных между собой различными степенями родства. Они позволяют определять теоретически ожидаемую степень гомозиготности в каждом последующем поколении в зависимости от используемой системы скрещивания (рис. 1) [8]. Все линии лабораторных животных (в нашем случае крысы) выведены и, как правило, поддерживаются скрещиванием родных братьев и сестер. Теоретические расчеты показывают, что во втором поколении доля гомозиготных особей составляет примерно 67-68%, а в пятом — 83%. Следовательно, результаты наших исследований не только не отличаются от теоретически ожидаемых, а, напротив, полностью согласуются с ними. Таким образом, приведенные данные (табл. 1 и 2, рис. 1) показывают, что после 20 поколений братско-сестринских скрещиваний гомозиготность линий приближается к 100%.

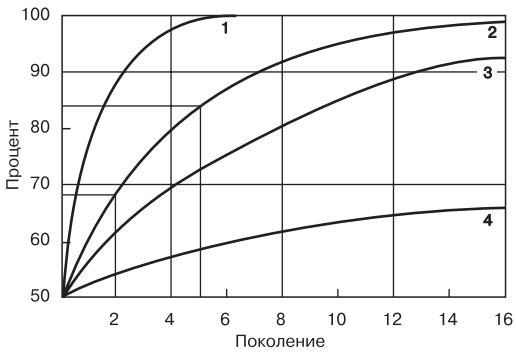


Рис. 1. Повышение гомозиготности при различной интенсивности инбридинга: 1 – самооплодотворение; 2 – скрещиваемые особи родные братья и сестры; 3 – скрещиваемые особи полубратья и полусестры; 4 – скрещиваемые особи двоюродные братья и сестры

Однако, каков бы ни был инбредный возраст линии и степень ее инбридинга, линейных животных нельзя рассматривать как неизменных на протяжении длительного промежутка времени, так как существует ряд объективных и субъективных факторов, которые могут повлиять на гомозиготность линии. В частности, линейные животные подвержены наследственной (мутационной) изменчивости в той же мере и по тем же закономерностям, как и всякие другие организмы. К числу указанных факторов относятся также сцепление признаков и отбор животных на жизнеспособность.

Для того чтобы исключить влияние этих факторов, инбридинг линий должен проводиться беспрерывно с регулярным (один раз в четыре поколения) контролем степени гомозиготности селектируемого признака.

Таблица 1

Показатели степени инбридинга у крыс второго поколения (F2)

	Чувствительность к гипобарической гипоксии	**Время жизни (ВЖ), мин**	**Количество животных**	**Процентное соотношение**
	Высокоустойчивые линии (ВУ)			
1	Низкоустойчивые	от 0 до 3	5	10,6
2	Среднеустойчивые	от 3 до 15	11	23,4
3	Высокоустойчивые	от 15 и >	31	66,0
	Низкоустойчивые линии (НУ)			
1	Низкоустойчивые	от 0 до 3	27	67,5
2	Среднеустойчивые	от 3 до 15	8	20,0
3	Высокоустойчивые	от 15 и >	5	12,5

Таблица 2

Показатели степени инбридинга у крыс второго поколения (F5)

	Чувствительность к гипобарической гипоксии	Время жизни (ВЖ), мин	Количество животных	Процентное соотношение
	Высокоустойчивые линии (ВУ)			
1	Низкоустойчивые	от 0 до 3	—	—
2	Среднеустойчивые	от 3 до 15	3	14,3
3	Высокоустойчивые	от 15 и >	15	85,7
	Низкоустойчивые линии (НУ)			
1	Низкоустойчивые	от 0 до 3	25	83,4
2	Среднеустойчивые	от 3 до 15	5	16,6
3	Высокоустойчивые	от 15 и >	—	—

Поскольку явление гипоксии сопровождает многие патологические состояния, выведение линий крыс, оппозитных по чувствительности к острой гипобарической гипоксии, весьма актуально. Такие линии могут быть использованы в качестве биологических моделей при изучении аналогичных состояний у человека.

Литература

1. *Арбузов С.А., Пастушенков Л.В.* Фармакология и токсикология. 1969, № 1, с. 115.
2. *Гичев Ю.Ю., Гичев Ю.П.* Руководство по биологически активным пищевым добавкам. *М.: Триада-Х, 2001. с. 230.*
3. *Лукьянова Л.Д.* Механизмы действия антигипоксантов. Антигипоксанты – новый класс фармокологических веществ. *В сб. Антигипоксанты, М., 1991, с. 5.*
4. *Лукьянова Л.Д.* Фармокологическая коррекция митохондриальной дисфункции при гипоксии. *В сб. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. М. 2004, с. 456.*
5. *Оковитский С.В., Смирнов А.В.* Антигипоксанты. *Экспериментальная и клиническая фармакология. 2001. Т. 64, № 3, с.76- 80.*
6. *Стрелков Р.Б., Чижов А.Я.* Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. *Екатеринбург: Уральский рабочий. 2001, с. 398.*
7. *Хатт Ф.* В сб. Генетика животных. *М. 1969, с. 314.*
8. *Чернобаева Г.Н., Романова В.Е., Дудченко А.М., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д.* Антигипоксические эффекты и механизмы действия некоторых производных 3-оксипиридинов. *В сб. Антигипоксанты. М. 1991, с. 26.*

DEVELOPMENT OF OPPOSITE RAT STRAINS WITH DIFFERENT HYPOBARIC HYPOXIA SENSITIVITY

H.H.Semenov

Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

The random bred white rats from the RAMS Central Farm of Laboratory Animals (now a filial branch Andreevka of RCBMT) were being selected within 5 generations to develop two inbred strains with opposite sensitivity to hypobaric hypoxia. As a result, we have a sensitive strain (83% of animals are sensitive) and a resistant strain (86% of animals are resistant).

Key words: selection, rats, hypobaric hypoxia, inbreeds.

Морфологическая характеристика спонтанной хронической респираторной болезни крыс

Э.Х.Абдрашитова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Исследованы респираторные органы 375 крыс конвенционального разведения различных колоний гистологическими и гистохимическими методами. Результаты показали генерализованное системное поражение респираторных органов почти в 100% случаев.
Верхние дыхательные пути подвержены хроническому воспалительному процессу с характерной гиперсекрецией покровного и железистого эпителия, круглоклеточной инфильтрацией слизистой оболочки. Бронхиальное дерево на всем протяжении также поражено хроническим воспалительным процессом, характерной особенностью которого является массивная лимфоидная инфильтрация стенок бронхов, влекущая разрушение мышечной и фиброзной оболочек. В респираторной паренхиме легкого наблюдается хроническая очаговая интерстициальная пневмония, сочетающаяся с очагами ателектазов, разрушающая эластический каркас легкого. Заболевание, наблюдающееся уже у крысят 20-25 дней жизни, с возрастом прогрессирует и в финальных стадиях (7-8 мес.) приводит к развитию бронхоэктазов и пневмосклероза. В литературе данный синдром чаще описывается под названием «хроническая респираторная болезнь» крыс.

Ключевые слова: крыса, хроническая респираторная болезнь, бронхит, пневмония.

Среди лабораторных животных конвенционального разведения, используемых в экспериментальной практике, распространены болезни, часто протекающие латентно или в субклинической форме. Это так называемая «скрытая» или «интеркурентная» спонтанная патология, представляющая большую группу патологических состояний: заболевания, связанные с неполноценным питанием, авитаминозы, начальные стадии опухолевого роста, инфекционные болезни вирусной и бактериальной природы, инвазионные заболевания, микозы и др.

Это позволило У.Лейн-Петеру, одному из основоположников науки о лабораторных животных, сказать: «В настоящее время лабораторные животные любой колонии в той или иной степени поражены какой-нибудь болезнью» [1]. Вопросы скрытой патологии являлись предметом острых дискуссий в 60-70-х годах [2, 3]. В некоторой степени они освещены в фундаментальных руководствах по патологии лабораторных животных [4].

Наиболее значимой среди скрыто протекающих патологических состояний представляется группа заболеваний инфекционной природы. Не имеющие клинических проявлений, они, как правило, обостряются под влиянием экспериментальных нагрузок и, будучи неучтенными, приводят к искажению данных эксперимента [5].

Это обстоятельство привело исследователей к поиску новых технологических приемов создания и воспроизводства лабораторных животных, обеспечивающих их надежное качество и возможность стандартизации по состоянию здоровья. В конце 50-х – начале 60-х годов стало реальностью получение животных, свободных от патогенов, путем кесарева сечения и содержания в строгой барьерной системе. Это так называемые SPF-животные (specific pathogen free).

По мере использования в экспериментальных исследованиях животных SPF-категории вопросы скрытой патологии почти перестали интересовать исследователей.

Образовавшиеся ассоциации специалистов стремились разработать единые стандарты качества животных по состоянию здоровья для получения надежных результатов эксперимента [6, 7, 8]. Однако до настоящего времени многие исследования проводятся с использованием конвенциональных животных. При этом нельзя игнорировать возможное наличие у них различных видов спонтанной патологии.

У крыс спонтанным поражениям наиболее подвержены респираторные органы. В настоящем сообщении мы приводим результаты морфологических исследований хронической респираторной болезни крыс, протекающей латентно или в субклинической форме.

Нами обследованы конвенциональные крысы линий WAG, AUG и популяции Sto:Wistar в коллекционном фонде и колониях разведения питомников РАМН трех возрастных групп: 20–25 дней жизни, 3 месяца и 8–10 месяцев. Гистологическими и гистохимическими (PAS-реакция, окраска по Браше) методами исследованы респираторные органы: нос, носоглотка, гортань, трахея, бронхиальное дерево и респираторная паренхима легкого у 375 крыс.

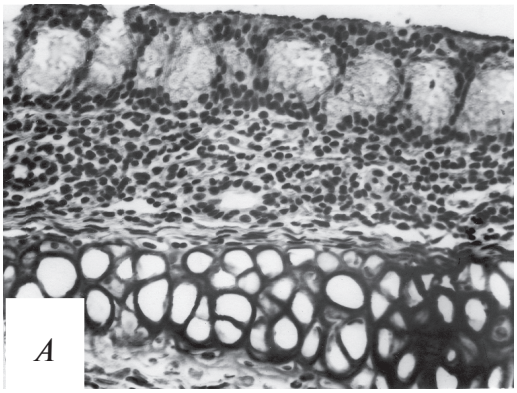
У всех обследованных крыс обнаружено системное поражение органов дыхания: от полости носа до альвеолярной паренхимы легкого включительно. Начальные, морфологически определяемые признаки заболевания наблюдаются уже у крысят 20–25 дней жизни. С возрастом патологические изменения нарастают и к 8–10 месяцам жизни приводят к финальным явлениям, которые, однако, клинически не проявляются. Летальность при этом не отмечается.

Поражение верхних дыхательных путей носит характер хронического катарального или катарально-гнойного воспаления, проявляющегося гиперсекрецией слизи покровным эпителием и железами носа, гортани, трахеи, обильной круглоклеточной инфильтрацией собственного слоя слизистой оболочки, появлением полинуклеарных клеток (рис. А).

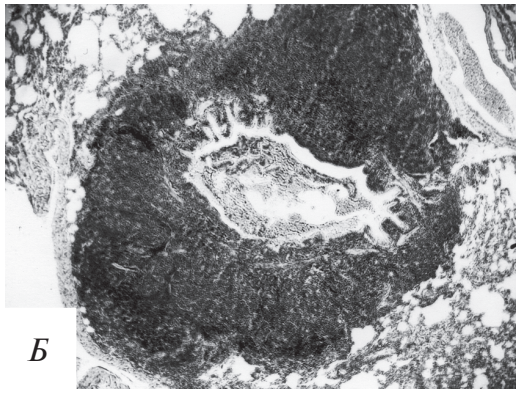
Бронхиальное дерево легкого также претерпевает патологические изменения на всем его протяжении. Они выражаются в развитии хронического катарального или катарально-гнойного бронхита и катарально-десквамативного бронхиолита. Особенностью этого воспаления являются выраженная гипертрофия и гиперплазия покровного эпителия и его обильная слизистая гиперсекреция. Однако превалирующим признаком этого состояния является исключительно массивная лимфоидная инфильтрация всех слоев стенки бронха с формированием крупных перибронхиальных инфильтратов, часто в виде муфты, одевающих бронх (рис. Б). Имеют место и периваскулярные инфильтраты, однако менее выраженные – образованные преимущественно плазматическими клетками. Такая массивная инфильтрация стенки бронха обусловливает постепенную атрофию его мышечной и фиброзной оболочек, разрушение эластического каркаса.

Респираторная паренхима легкого также подвергается патологическим изменениям. Здесь наблюдается развитие множественных очаговых ателектазов с тенденцией к увеличению. Зоны ателектазов сочетаются, как правило, с развитием интерстициальной пневмонии, которая также носит хронический очаговый характер. Межальвеолярные перегородки при этом значительно утолщены, гиперемированы, инфильтрированы лимфоцитами и плазматическими клетками, эластические волокна разрушаются, в альвеолах – множество макрофагов и десквамированных клеток (рис. В).

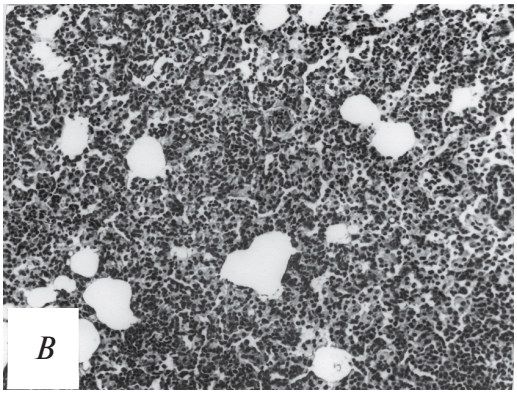
Описанные патологические изменения с возрастом, как отмечалось, прогрессируют. К 7–8 мес. жизни одновременно протекающие изменения бронхиальной стенки и окружающей паренхимы приводят к развитию бронхоэктазов (рис. Г).



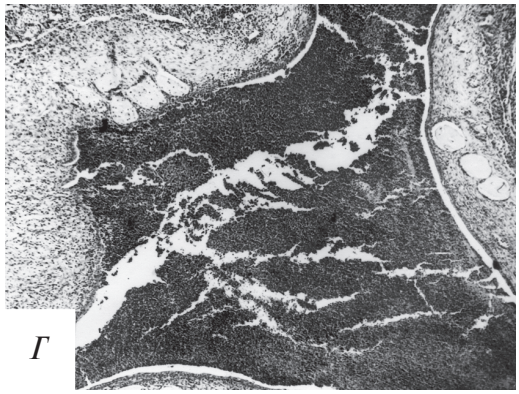
Хронический катаральный ринит. Эндоэпителиальные железы. Фикс.: 10% формалин. Увел.: x100.



Перибронхиальная лимфоидная инфильтрация. Фикс.: 10% формалин. Увел.: x80



Очаговая интерстициальная пневмония. Видны щелевидные просветы альвеол. Фикс.: 10% формалин. Увел.: x80



Бронхоэктаз с гнойным содержимым. Фикс.: 10% формалин. Увел.: x50.

Патологические изменения респираторных органов при «хронической респираторной болезни» крыс

Последние выстланы многорядным слизеобразующим или реже многослойным эпителием и заполнены слизью или гноем (при присоединении секундарной инфекции). Усиленное слизеобразование вообще весьма характерно для данного синдрома. В некоторых случаях целые участки пораженного легкого подвергались слизистому перерождению. В окружающей паренхиме органа развивается пневмосклероз. На этих поздних стадиях легкое приобретает характерный макроскопический вид: на поверхности сморщенной, серого цвета доли выбухают округлые жемчужные образования, заполненные тягучей слизью. В случаях присоединения секундарной инфекции доля легкого превращается в массивный абсцесс.

Выявленные патологические изменения респираторных органов носят генерализованный характер и относятся ко всем линиям крыс, в том числе и к нелинейным.

Этот своеобразный синдром, обнаруживаемый авторами в различных колони-

ях конвенционального типа, не является исключением и для обследованных нами колоний. При этом показана широкая распространенность этого синдрома: в обследованных питомниках крысы болеют им почти в 100% случаев, то есть поражено все поголовье. Авторы указывают даже на фатальную неизбежность распространения этой болезни среди крыс конвенционального разведения.

Описанное заболевание чаще обозначается как хроническая респираторная болезнь (CRD), хотя имеются и другие наименования (около 20) этой патологии.

Этиология этого заболевания до настоящего времени не выяснена окончательно, несмотря на ряд фундаментальных исследований, проведенных еще в 60-70-х годах. Наибольшее распространение получили две точки зрения. Согласно одной, поражение верхних дыхательных путей, так называемый инфекционный катар, вызывается *Mycoplasma pulmonis*, а поражение легкого – вирусом мышиной пневмонии (PVM). Согласно второй, *M.pulmonis* является единственным этиологическим фактором данного синдрома, в связи с чем предлагается называть его «пульмональный микоплазмоз грызунов» [4].

Описанные глубокие изменения респираторных органов крыс при их поголовной распространенности не могут не отразиться на результатах экспериментов, проводимых на таких животных. Экспериментаторам необходимо тщательно изучать «исходное» состояние животных, предназначенных для эксперимента, или же использовать крыс SPF-категории, лишенных описанной патологии.

Литература

1. *Лейн-Петер У.* Обеспечение научных исследований лабораторными животными. М. 1964.
2. *Innes J. R. M., Garner F. M., Stookey J.L.* In: Pathologie of Laboratory Rats and Mice. *Ed. E.Cotchin, F. Roe. Oxford, 1967, p. 229-259.*
3. *Lindsey J.R., Baker H. et al.* In: Disease of Laboratory Animals Complicating Biomedical Research. Chicago, 1971, p. 675-716.
4. Pathology of Laboratory Animals. *Ed. K. Benirschke. New York, 1978.*
5. *Войно-Ясенецкий М.В.. Жаботинский Ю.М.* Источники ошибок при морфологических исследованиях. Л. 1970, с. 105-124.
6. Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals. U.S.,1986.
7. List of Pathogens for Specification in SPF Laboratory Animals. *GV- SOLAS, 1988, No. 2.*
8. Guidelines for breeding and care of laboratory animals. *WHO and ICLAS, 1993, p. 169.*

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF CHRONIC RESPIRATORY DISEASE IN RATS

E.Kh. Abdrashitova

Research Center for Biomedical Technology of RAMS, Moscow

The rats with conventional breeding have been investigated. Pathology of respiratory system under the name “Chronic Respiratory Disease” that has systematical nature and total prevalence, was found and described.

ПРАКТИКУМ

Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей

О.И.Степанова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Описан простой метод взятия крови, который позволяет многократно брать разные порции крови у мышей без анестезии, обездвиживания и сохранять жизнь животным.

Ключевые слова: подкожная вена голени, мышь, метод, кровь, капилляры..

Существуют разные способы взятия крови у мышей: прокол лапки, ампутация хвоста, из ретроорбитального или подъязычного венозных сплетений и пункция сердца, но каждый из вышеперечисленных методов имеет свои недостатки: это применение анестезии, ведущее к искаженным результатам, обездвиживание, отсутствие специального вакуумного прибора, образование культи вместо хвоста, недостаточные объемы крови при многократных взятиях в течение дня.

Для многократных взятий крови, необходимых для биохимических или других постоянных исследований, существует простой альтернативный метод - это взятие крови из латеральной подкожной вены голени и стопы у мышей (малая подкожная вена). Данный метод был разработан сотрудниками Forsoksdyrveterinartjeneste Laboratory Animal Veterinary Services Vivarium Universitetet i Bergen, 5021- Bergen, NORGE, авторами Hemas A., Smith A.J., Solberg P. (1998 г.)

Особую благодарность выражаем директору отдела лабораторного оборудования ООО «РТС Инжиниринг» А.В. Нарнову за любезно предоставленную информацию.

Материалы и метод



Рис. 1. Для использования этого метода необходимо иметь:

- центрифужную пробирку из пластмассы (фалькон) на 50 мл с удаленным дном для поступления воздуха;
- инсулиновую иглу 23G (0,6 мм);
- капилляры для взятия крови разных объёмов (5,35 мкл и т.д. или микровет-ты до 300 мкл).

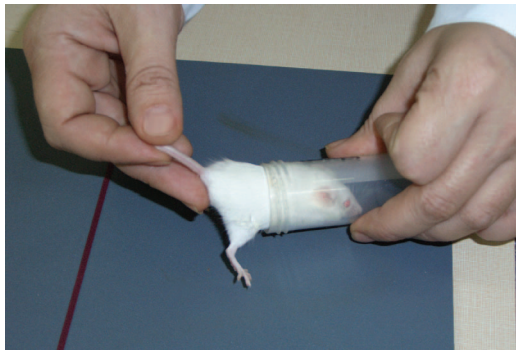


Рис. 2. Животное помещаем в пробирку (фалькон) для фиксации



Рис. 3. Фиксируем заднюю (левую) лапку за складку кожи между голенью и бедром, придерживая хвост.

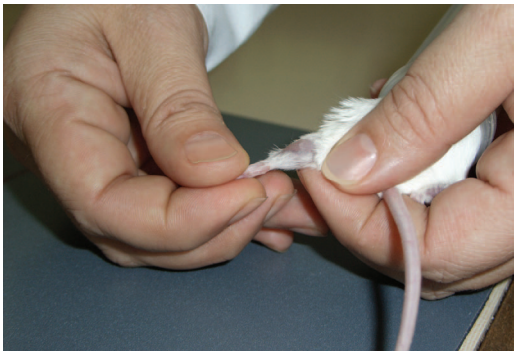


Рис. 4. Шёрстный покров голени удаляем безопасной бритвой и место прокола дезинфицируем 70%-ным спиртом.



Рис. 5. На голени хорошо видна латеральная подкожная вена (малая подкожная вена).

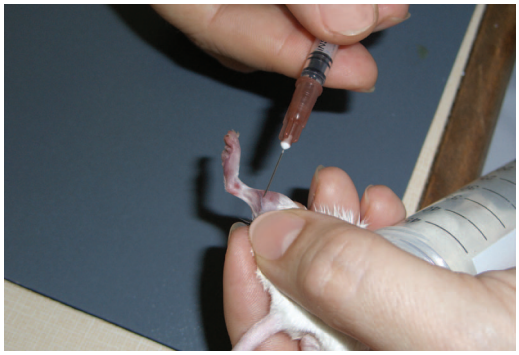


Рис. 6. Делаем прокол вены стерильной инсулиновой иглой.

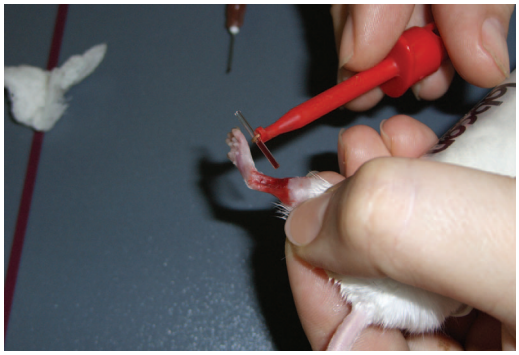


Рис. 7. Вытекающую кровь собираем капиллярами, а для снижения свертываемости крови используем 5%-ный раствор лимоннокислого натрия, предварительно смочив им кожный покров голени.



Рис. 8. Лапку фиксируем в положении, замедляющем ток крови, затем место пункции тампонируем до полной остановки крови и прижигаем ранку 3%-ным раствором йода.

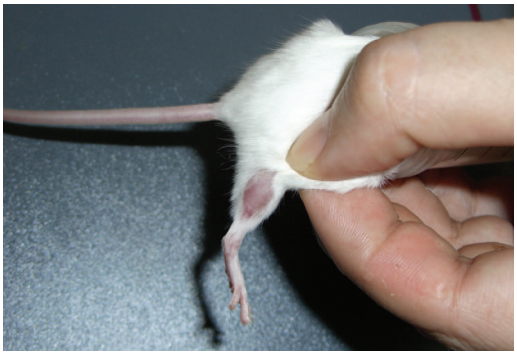


Рис. 9. Фиксируем заднюю (правую) лапку за складку кожи между брюшком и бедром. Мышь готова к повторному взятию крови.

Вскоре на месте пункции у мыши образуется корочка, которую нужно удалить при повторном заборе крови. Использовать место пункции можно многократно в течение дня или провести забор крови на другой лапке.

Предложенный метод весьма прост и удобен, исключает использование анестезии и обездвиживание, сохраняет жизнь животного и позволяет многократно и в разных объёмах (до 500 мкл) собирать кровь для необходимых исследований. Этот метод подходит и для более крупных лабораторных грызунов.

ALTERNATIVE METHOD OF BLOOD SAMPLING FROM MOUSE'S SAPHENOUS VEIN

O.I. Stepanova

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

This method allows us to take different portions of blood, repeatedly, without anesthesia. Also the method presented reduces mice mortality.

Key words: saphenous vein, mouse, method, blood, capillary.

БИОМЕДИЦИНА ● № 2 2006, с. 140–142

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Фундаментальные основы GLP (Часть 1. Основные положения качественной лабораторной практики)

Е.В. Брайцева

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Одним из основных этапов разработки и изучения лекарственных средств являются доклинические исследования. В настоящее время международным стандартом для проведения доклинических исследований является руководство ВОЗ по GLP (Good Laboratory Practice — качественная лабораторная практика). В первом номере журнала «Биомедицина» была опубликована статья «Введение в GLP», в которой давалось разъяснение, что такое GLP, и рассказывалось об истории ее создания. Редакция журнала считает целесообразным ввести постоянную рубрику, в которой будут представлены все разделы этого руководства с комментариями и обсуждениями.

Ключевые слова: правила, ресурсы, документация, характеристика, обеспечение качества.

В данной статье описаны основные положения качественной лабораторной практики (GLP), включающие в себя унифицированные подходы к планированию исследования, регистрации эксперимента, написанию отчёта и хранению всех данных, касающихся эксперимента.

Стандартизированный и соответствующий современным требованиям подход к проведению лабораторных исследований предполагает обучение участников процесса принципам GLP с целью:

- повышения качества планируемых научных исследований
- обеспечения уверенности в том, что исследования проводились в полном соответствии с разработанными принципами GLP.

Требования GLP устанавливают официальные правила организации исследования и определяют стандарты всех его этапов. Эти правила не касаются научных и технических аспектов проводимого исследования и их целью не является научная оценка эксперимента и его результатов, что входит в задачу регуляторных органов.

Качественная лабораторная практика, применимая к любому исследованию, обязательно включает в себя следующие положения:

ресурсы – организация, штат, помещение, оборудование;

правила – протоколы, стандартные операционные процедуры (инструкции), руководитель исследования в качестве центральной фигуры, обеспечивающий контроль исследования;

характеристика – объект исследования, тест-системы;

документация – первичные данные, заключительный отчет, архив;

обеспечение качества – независимая от исследования оценка эксперимента.

Дадим более подробные пояснения каждого из вышеперечисленных положений.

Ресурсы

1. Организация и персонал

Согласно требованиям GLP научные исследования могут проводиться только в тех учреждениях, где имеются достаточные условия для работы (соответствующие лаборатории, обеспечение взаимодействия подготовленного персонала и т.д.) Необходимым условием качественного проведения лабораторных исследований является *достаточный штат специально обученного* персонала, умеющего работать по принципам GLP.

Четко должны быть определены задачи и ответственность каждого участника исследования.

Другим важным условием проведения таких исследований является наличие соответствующего Руководителя (директора), который должен быть компетентным во всех вопросах и требованиях GLP, способного нести ответственность за качество и достоверность проводимого исследования, по завершении которого он обязан поставить свою подпись на заключительных документах.

2. Оборудование

Согласно требованиям «качественной лабораторной практики» необходимо наличие адекватного планируемому исследованию, качественного, точного оборудования. Это позволит избежать проблем, связанных с несоответствием проекта исследования неадекватным рабочим условиям.

Правила

1. Протоколы

Обязательны план и протокол исследования, в котором должны быть отражены все принципиальные этапы исследования и который позволит выявить адекватность проведения исследования намеченному плану. Протокол должен быть одобрен и подписан руководителем до начала исследования. В дизайн исследования не могут быть внесены изменения без официальной процедуры их одобрения. Соблюдение этих правил обеспечивает в дальнейшем возможность воспроизводить исследования в случае необходимости.

2. Описание хода исследования

В протоколе невозможно отразить все технические детали планируемого исследования**.** Обычные или рутинные процедуры описываются в специальных инструкциях (стандартные операционные процедуры – СОП). В этих инструкциях описываются также стандартные методы проведения исследования. Это необходимо для облегчения понимания, анализа и сравнения получаемых результатов.

СОП должны периодически пересматриваться в соответствие с современным уровнем знаний и техническим прогрессом.

И, наконец, важно, чтобы СОП имелись у каждого исслндователя на рабочем месте и только в виде современной версии.

3. Руководитель исследования

Согласно требованиям GLP, руководитель эксперимента является центральным звеном в организации и контроле выполнения исследования. Он полностью отвечает за соответствие проведения исследования требованиям GLP, принимает на себя ответственность, подписывая специальный документ.

Характеристика исследуемых материалов и объектов

Корректность проводимого эксперимента возможна только при наличии достаточных знаний о материалах и объектах исследования.

Например, для изучения безопасности нового фармацевтического средства на доклинической фазе необходимо иметь подробные сведения об испытуемом веществе и тест-системе (обычно животное), на которую это вещество воздействует.

Такие характеристики, как идентичность, чистота, состав, стабильность, наличие примесей должны быть представлены, как для самого вещества и его лекарственной формы, так и для препарата сравнения (референс-стандарт).

Если тест-системой является животное, то необходимо иметь данные о его виде (породе, линии), состоянии здоровья и нормальных биологических показателях.

Документация

1. Первичные данные

Все исследования имеют первичные данные, которые, с одной стороны, являются результатом начального этапа исследования и основой для дальнейших заключений и выводов и, с другой стороны, документируют все подробности и обстоятельства, при которых проводились исследования. Некоторые данные в дальнейшем подвергаются статической обработке, другие используются в исходном виде. В любом случае, в протоколе исследования научными работниками должно быть обеспечено правдивое и точное отображение первичных данных, описание результатов и их интерпретация.

2. Протокол исследования

В протоколе исследования приводится подробное описание всех этапов эксперимента. За протокол исследования, также как и за все другие аспекты, ответственность несет руководитель исследования. Он должен гарантировать точность передачи всех данных, а также отвечать за научную интерпретацию результатов.

3. Архивы

Для того чтобы результаты исследования могли быть восстановлены, а сами исследования воспроизведены спустя длительный период времени, необходимо обеспечить надежное хранение документации, при котором исключается возможность потери или подделки первичных данных и других основных документов. Для достижения этой цели доступ к документации должен быть ограничен и строго контролируем.

4. Обеспечение качества

Гарантию качества исследования обеспечивает группа независимых от исследователей экспертов путем проверки всех этапов испытаний и их соответствия рекомендациям GLP.

В следующих номерах журнала «Биомедицина» мы остановимся конкретно на каждом положении GLP.

THE FUNDAMENTAL POINTS OF GLP (PART 1)

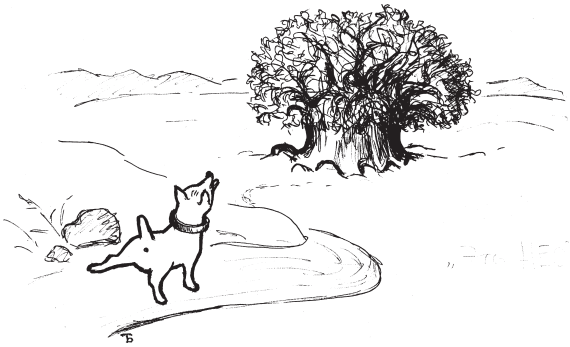
E.V. Braitseva

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

The paper presents the main points of GLP which include unified approaches to planning the study, recording experimental data, drawing up a report and keeping documentation.

Key words: rules, documentation, resources, characterization, quality assurance

ЗДРАВСТВУЙ, МЕДИК, НОВЫЙ ГОД!
(Год красной собаки)



– Это НЕОПИСУЕМО! – подумала собака, глядя на баобаб

«БИОМЕДИЦИНА» ПРЕДУПРЕЖДАЕТ:
Отправляясь встречать Новый год в Африку, не берите с собой вашего пёсика: при виде некоторых представителей аборигенной дендрофлоры ваш любимец может испытать сильный психический шок...

УДАР ПЕГАСА

Покаяние

Трансплантация и прививки,
Мутагены и облучение...
Мы оправдываться привыкли
Громким словом «предназначение».

Добывая крупицы знания,
Неизбежное зло несём.
Но, не требуя покаяния,
Мыши бедные терпят всё!

Не скажу, что правы «зелёные»,
Только слышатся мне подчас:
«Люди, разумом наделённые,
Мы нисколько не хуже вас!».

Дорогие мои хвостатые!
Перед вами я виновата,
За работу мою проклятую
Вы простите меня, мышата!

Т. Бескова

СМЕЯТЬСЯ, ПРАВО, НЕ ГРЕШНО НАД ТЕМ, ЧТО ИСТИНО СМЕШНО

– Чем отличается человек от свиньи?
– Свинья не становится человеком, когда напьётся...

* * *

– Что такое жар-птица?
– Это курица, больная гриппом.

* * *

Собака думает: «Человек меня кормит, поит, заботится обо мне, значит человек – бог». Кошка думает: «Человек меня кормит, поит, заботится обо мне, значит я – бог».

* * *

– Доктор, я работаю как лошадь, ем как свинья, устаю как собака! Что мне делать!?
– Не знаю, я не ветеринар.

Изготовлено в «Универсум Паблишинг»
Тираж 3 000 экз.

Адрес: ул. 3-я Мытищинская, д. 16
тел. (495) 980-9230, факс (495) 980-9231
e-mail:prepress@clinpharma.com