

# БИОМЕДИЦИНА

№ 1 2008

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

## Главный редактор

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

## Редакционный совет:

Dr. Hans-W. Askermann, профессор (Канада)  
Dr. Iorgen Backmen, профессор (Германия)  
В.А. Быков, академик РАМН и РАСХ (Россия)  
Витан Влахов, профессор (Болгария)  
Dr. Ralf Edwards, профессор (Швеция)  
С.И. Колесников, академик РАМН (Россия)  
А.А. Кубатиев, академик РАМН (Россия)  
В.Г. Кукес, академик РАМН (Россия)  
Michael Ogте, профессор (Великобритания)  
М.А. Пальцев, академик РАН и РАМН (Россия)  
В.И. Петров, академик РАМН (Россия)  
Ю.Л. Перов, член-корреспондент РАМН (Россия)  
К.В. Судаков, академик РАМН (Россия)  
В.П. Фисенко, академик РАМН (Россия)  
Д.Ф. Хритинин, член-корреспондент РАМН (Россия)  
В.Н. Ярыгин, академик РАМН (Россия)  
Dr. Solemene Umberto, профессор (Италия)

## Редакционно-издательская группа:

Б.М. Бороденков, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Касинская,  
Ю.С. Макляков, Е.Л. Матвеевко, В.А. Михайлов,  
А.О. Ревякин, Д.С. Сахаров, Х.Х. Семенов,  
О.И. Степанова, Д.А. Сычев, Г.В. Раменская, В.В. Хоронько

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  
matveyenkoel@mail.ru  
Тел.: 561-52-64, 917-32-17

© 2008, Научный центр биомедицинских технологий РАМН

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

- И.В. Сарвилина, Ю.С. Макляков, А.В. Криштопа, В.Н. Каркищенко.* Поиск новых мишеней для разработки сахароснижающих лекарственных средств на основе биомоделирования сахарного диабета II типа и протеомных технологий ..... 5
- Е.А. Сокова.* Особенности системы биотрансформации лекарственных средств в фетоплацентарном комплексе ..... 14

### БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

- О.И. Степанова, Н.А. Онищенко, Э.Х. Абдрашитова, Е.А. Степанова, Л.А. Конопленко, Т.В. Галахова, Т.Б. Бескова, В.А. Зайденов, Х.Х. Семенов.* Мононуклеарная фракция клеток костного мозга мышей линии B10.GFP нормализует углеводный обмен у мышей линии C57BL/KsJYdb/+ с моделью сахарного диабета II типа ..... 26

### ГЕНЕТИКА

- Н.Ю. Сахарова, А.М. Малашенко, А.А. Смирнов, Ю.А. Ковалицкая, Е.Ф. Вихлянцева.* Влияние генотипа на экспрессию гена Kit<sup>W-Y</sup> в раннем эмбриогенезе у мышей линии WR ..... 36

### МУТАГЕНЕЗ

- Н.А. Пирицелани, А.Г. Пирицелани, Р. Гахокидзе, С. Цквитаиа, Г.Д. Капанадзе.* Цитогенетический анализ антимуtagenного действия комплекса витаминов «Пиковит» при индукции мутации у лабораторных мышей цехумом ..... 44

### МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

- В.А. Злобин, Н.Н. Каркищенко, В.А. Павлов, А.А. Жиров, Г.В. Назаров.* Разработка теоретических основ метода косвенного спектрофотометрического детектирования с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии ..... 47

### КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

- Ю.В. Горшкова, А.В. Трегубов, И.В. Сарвилина.* Новый программный продукт для клинической фармакологии ..... 54

### ФАРМАКОЛОГИЯ

- М.А. Самотруева, Д.Ш. Дубина, С.А. Лужнова.* Оценка иммунокорректирующей активности производных бензимидазола на фоне циклофосфановой иммуносупрессии ..... 60
- В.А. Батулин, Э.А. Манвелян.* Сравнение интенсивности галоперидоловой катаlepsии у интактных и овариэктомированных самок крыс в разное время суток ..... 64
- В.Н. Каркищенко, С.П. Матуа, В.П. Омельченко.* Нейрофизиологические индикаторы центрального действия различных психотропных средств ..... 67

### ФАРМАКОЭПИДЕМИОЛОГИЯ

- Е.В. Колодийчук, М.В. Дерева, И.В. Терентьева, В.А. Батулин.* Фармакоэпидемиологическое изучение половых особенностей потребления лекарственных средств ..... 71

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- С.П. Матуа, В.Н. Каркищенко, В.П. Омельченко.* Компьютерные ЭЭГ-профили, как индикаторы биоэлектрической активности мозга животных ..... 75
- И.М. Шейман, Н.Д. Крещенко.* Морфологическая активность регуляторных нейропептидов и регенерация планарий ..... 79
- Салар Эйса Задех, В.Г. Кукес, Г.Д. Кapanидзе.* Изучение фармакокинетики анастразола на мини-свиньях светлогорской популяции ..... 88

## НАШ БЕСТИАРИЙ

- Биологи и медики шутят ..... 91

## CONTENTS

### REVIEWS

- I.V. Sarvilina, Yu.S. Maklyakov, A.V. Krishtopa, V.N. Karkischenko.* Searching for new targets for hypoglycaemic drug development based on biomodeling of diabetes mellitus type II and proteom technologies ..... 5
- E.A. Sokova.* Particularities of human drug-metabolizing system in fetoplacental complex ..... 14

### BIOMODELING

- O.I. Stepanova, N.A. Onischenko, E.Kh. Abdrashitova, E.A. Stepanova, L.A. Konoplenko, T.V. Galahova, T.B. Beskova, V.B. Zaidenov, H.H. Semenov.* Mononuclear bone marrow fraction of B10.GFP mice normalizes the carbohydrate metabolism in C57BL/KsJYdb/+ mice with diabetes ..... 26

### GENETICS

- N. Yu. Sakharova, A. M. Malashenko, A. A. Smirnov, Yu. A. Kovalitskaya, E. F. Vikhlyantseva.* The early embryonic development of mice WR bearing allele Kit<sup>W-Y</sup> ..... 36

### MUTAGENESIS

- N. Pirtskhelani, A. Pirtskhelani, R. Gakhokidze, C. Ckuitaia, G. Kapanadze.* Citogenetic analysis of antimutagenic action of «Picovit» vitamin complex when inducing mutations in laboratory mice by cechum ..... 44

### MATHEMATICAL MODELING

- V.A. Zlobin, V.A. Pavlov, A.A. Zhirov, N.N. Karkischenko, G.V. Nazarov.* Theoretical basis for a method of indirect spectrum photometric detection using high-performance liquid chromatography ..... 47

### CLINICAL PHARMACOLOGY

- U.V. Gorshkova, A.V. Tregubov, I.V. Sarvilina.* New program product for clinical pharmacology ..... 54

### PHARMACOLOGY

- M.A. Samotrueva, D.Sh. Dubina, S.A. Luzhnova.* The estimation of immunocorrecting activity of benzimidazol derivatives on the base of cyclophosphane immunosuppression ..... 60

<i>E.A.Manvelyan, V.A.Baturin. Comparison of cataleptogenic effects of haloperidol on intact and ovariectomized female rats at different time of day</i> .....	64
<i>V.N.Karkischenko, S.P.Matua, V.P.Omelchenko. Neurophysiological indicators of central action for different psychotropic drugs</i> .....	67

**PHARMACOEPIDEMOLOGY**

<i>E.V.Kolodiychuk, M.V.Dereva, I.V.Terent'eva, V.A.Baturin. Pharmacoepidemiological study of sex-related consumption of pharmaceuticals</i> .....	71
--	----

**BRIEF REPORTS**

<i>S.P.Matua, V.N.Karkischenko, V.P.Omelchenko. Computer EEG-profiles as indicators of bioelectrical activity of animal brain</i> .....	75
<i>I.M.Sheiman, N.D.Kreshchenko. Morphogenetic action of neuropeptides and planarian regeneration</i> .....	79
<i>Salar Asa Zadekh, V.G. Kukes, G.D. Kapanadze. Study of anastrozol pharmacokinetics in Svetlogorskaya minipigs</i> .....	88

**OUR BESTIARY**

Humor .....	91
-------------	----



## Поиск новых мишеней для разработки сахароснижающих лекарственных средств на основе биомоделирования сахарного диабета второго типа и протеомных технологий

И.В. Сарвилина, Ю.С. Макляков, А.В. Криштопа, В.Н. Каркищенко

*Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону*

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону*

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

В обзоре научной литературы представлены основные экспериментально-биологические модели сахарного диабета второго типа, которые позволяют с помощью современных технологических платформ для молекулярной диабетологии и экспериментальной фармакологии раскрывать ключевые звенья патогенеза заболевания и обнаруживать перспективные молекулы-мишени для создания инновационных сахароснижающих лекарственных средств.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, протеомный анализ, биомодель.

Сахарный диабет (СД) стоит в ряду значимых приоритетов национальных систем здравоохранения всех стран мира. Этим заболеванием страдает 6 % населения в мире. Прогнозируемое число больных к 2025 г., по данным ВОЗ, составит 300 миллионов человек во всем мире [28]. В связи с высокой распространенностью, хроническим течением, ухудшением качества жизни пациентов затраты на одного больного СД в России составляют около 3,7 тыс. долл. в год, а реабилитационные и профилактические мероприятия (малодоступные во многих регионах) требуют значительных дополнительных затрат. Сегодня мы все являемся свидетелями революции в наших представлениях об этиологии, патогенезе и лечении СД, что связано с достижениями в области молекулярной медицины и фармакологии. Мощное развитие в настоящее время получило изучение физико-химических основ развития этого заболевания [15].

Как известно, СД представляет собой гетерогенную группу заболеваний, характеризующихся высоким уровнем глюкозы

в крови вследствие дефекта инсулиновой секреции, сигнализации или их сочетанного дефекта.

Многочисленные исследования на основе новых биоаналитических методов прояснили основные пути регуляции экспрессии генов при СД I и II типов. Дальнейшее развитие получили исследования сложных биологических систем, в том числе системы взаимодействия белок–белок, определяющей фенотип на клеточном, тканевом, органном и организменном уровне у пациента с СД определенного типа [10].

СД II типа фактически представляет собой болезнь химических конформаций, так как в патогенезе принимают участие многочисленные белки  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы, амилоидный полипептид  $\beta$ -клеток, имеющий измененную четвертичную структуру вследствие самоассоциации и тканевого расположения [13].

В основе развития СД II типа лежит несколько генетических дефектов. Основное значение имеет дефект в гене инсулина, проявляющийся в снижении чувствитель-

ности рецепторов к инсулину периферических тканей на пострецепторном уровне. Рецептор инсулина состоит из двух субъединиц —  $\alpha$  и  $\beta$ :  $\alpha$ -субъединица находится на мембране клетки, а  $\beta$ -субъединица — в цитоплазме клетки. Инсулин занимает  $\alpha$ -субъединицу рецептора и сигнал от него идет к  $\beta$ -субъединице, которая передает сигнал тирозинкиназе в цитоплазме клетки. Наличие дефекта в передаче сигнала от  $\beta$ -субъединицы к тирозинкиназе приводит к снижению проницаемости клеточных мембран к глюкозе, уменьшается активность белков — транспортеров глюкозы (*GLUT*): в частности *GLUT 2* и *GLUT 4*. В результате развивается инсулинорезистентность и в ответ на нее — гиперинсулинемия, которая определенное время может компенсировать инсулинорезистентность и поддерживает нормогликемию. Избыток инсулина по механизму обратной связи еще больше снижает чувствительность рецепторов к инсулину. С течением времени гиперинсулинемия не может полностью преодолеть инсулинорезистентность и развивается относительная недостаточность инсулина. Снижается утилизация глюкозы тканями, увеличивается глюконеогенез в печени, что ведет к гипергликемии. Из-за недостаточности действия инсулина увеличивается липолиз, повышается концентрация жирных кислот в плазме крови, которые утилизируются тканями вместо глюкозы. В мышцах, в том числе в миокарде, из-за недостатка действия инсулина, недостаточно активируются *GLUT 2* и *4*, уменьшается образование из глюкозы лактата и пировиноградной кислоты. Жирные кислоты блокируют активность фермента пируватдегидрогеназы, который играет центральную роль в образовании из пирувата ацетил-КоА, и уменьшается участие глюкозы в цитратном цикле в митохондриях [13].

Второй генетический дефект при СД II типа связан со снижением чувствительности  $\beta$ -клеток к стимуляции глюкозой, что ведет к уменьшению секреции инсулина.

В результате запаздывает или отсутствует первая фаза — ранняя фаза секреции инсулина, усиливается глюконеогенез в печени и развивается гипергликемия. СД II типа может быть связан с туловищным ожирением, следствием которого является инсулинорезистентность.

Интересным является тот факт, что СД II типа сегодня встречается все чаще среди лиц молодого возраста и включает 5 генетических дефектов  $\beta$ -клеточной функции: — *MODY-1* (*MODY-maturity onset of the young*), в основе которого лежит генетический дефект и последующая мутация гепатоклеточного нуклеарного фактора  $4\alpha$  (ГКНФ- $4\alpha$ ), находящегося в клетках печени и  $\beta$ -клетках островков поджелудочной железы. Ген ГКНФ- $4\alpha$  находится в 20-й хромосоме, мутация этого гена ведет к снижению секреции инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой;

— *MODY-2*, в основе которого лежит дефект в гене глюкокиназы в 7-й хромосоме, в результате чего снижается уровень инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой;

— *MODY-3*, в основе которого лежит дефект гена ГКНФ- $1\alpha$ , экспрессирующегося в клетках печени и  $\beta$ -клетках поджелудочной железы. Мутация этого гена ослабляет его сигнал на секрецию инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой, поступающей в  $\beta$ -клетки из плазмы;

— *MODY-4*, в основе которого лежит мутация инсулинпромоторного фактора в  $\beta$ -клетках, который в норме регулирует гены глюкокиназы и глюкозотранспортного белка-2 (*GLUT 2*). При мутации инсулинпромоторного фактора снижается активность глюкокиназы и *GLUT 2*, уменьшается секреция инсулина;

— *MODY-5*, в основе которого лежит мутация ГКНФ  $1\beta$  в  $\beta$ -клетках [12].

На основе новых знаний молекулярной диабетологии и применения технологических платформ для высокопроизводительного скрининга ключевых молекул-мишеней сегодня стало возможным понимание

молекулярных основ формирования нейроиммуноэндокринных расстройств при СД и создание новых лекарственных средств для лечения этого заболевания.

В настоящее время понимание дефектов инсулиновой сигнализации, инсулиновой секреции, высвобождения глюкозы печенью и функции адипоцитокинов при СД II типа, а также оценка эффектов новых сахароснижающих лекарственных средств происходит благодаря развитию биомоделирования и протеомных методов анализа биологических образцов лабораторных животных [10].

Для биомоделирования СД II типа используются традиционные животные – крысы и мыши. В каждой стране разведение и содержание лабораторных животных осуществляется в соответствии с руководством, изданным в данной стране, напри-

мер, в США такое руководство издается Национальным институтом здоровья. Экспериментальные процедуры осуществляются в соответствии с рекомендациями Комитетов о содержании и применении лабораторных животных [26].

В России руководства, методические указания, посвященные разведению, содержанию и контролю инбредных линий мышей и крыс, проведению гнотобиотических экспериментов, в настоящее время находятся в стадии восстановления и развития. Тем не менее, в нашей стране накоплен большой опыт по применению биомоделей во всех областях медико-биологических исследований [4].

В таблице представлены основные биомодели для исследования молекулярных звеньев развития СД II типа и разработки новых лекарственных средств.

Таблица

**Основные биомодели для исследования молекулярных звеньев развития СД II типа и разработки новых лекарственных средств (биомодели представлены The Jackson Laboratory, США)**

№	Ген/аллель	Биомодель
1	–	AKR/J
2	–	ALR/LtJ
3	–	ALS/LtJ
4	–	C57BL/6J
5	–	C57BLKS/J
6	–	CBA/CaJ
7	–	NON/LtJ
8	–	NONcNZO10/LtJ
9	–	NZL/LtJ
10	–	TALLYHO/JngJ
11	Ay	B6.Cg-Ay/J
12	Ay	KK.Cg-Ay/J
13	HD	B6CBA-Tg(HDexon1)62Gpb/1J
14	Lep <sup>ob</sup>	B6.V-Lep <sup>ob</sup> /J
15	Lepr <sup>db</sup>	B6.Cg-m +/+ Lepr <sup>db</sup> /J
16	Lepr <sup>db</sup>	BKS.Cg-m +/+ Lepr <sup>db</sup> /J
17	Ucp2 <sup>tm1Lowl</sup>	B6.129S4-Ucp2 <sup>tm1Lowl</sup> /J
18	CD80	B6.Cg H2g7-Tg(Ins2-CD80)3B7Flv/LwnJ
19	CD80	C.Cg-Tg(Ins2-CD80)3B7Flv/Lwn
20	CD80	NOR.Cg-Tg(Ins2-CD80)3B7Flv/LwnJ
21	GFP GH1	NOD/LtJ-Tg(Ins1-EGFP/GH1)14Hara/HaraJ

Продолжение

22	GP	B6.C-Tg(Ins2-GP)34-20Olds/Mv
23	Gpi1b	NOD.B6-(Gpi1-D7Mit346)/LtJ
24	HA	B10.Cg-H2d Tg(Ins2-HA)165Bri/ShrmJ
25	HA	C.Cg-Tg(Ins2-HA)165Bri/ShrmJ
26	HA	NOD.Cg-Tg(Ins2-HA)165Bri/ShrmJ
27	Igh-6 Igh-V	NOD-Tg(Igh-6/Igh-V281)3Jwt/JwtJ
28	Ins2	NOD-Tg(H2-Ea-Ins2)1Wehi/WehiJ
29	Ins2	NOD-Tg(Ins2*Y16A)1Eil/GseJ
30	Ins2	NOD-Tg(Ins2*Y16A)3Eil/GseJ
31	Mbtps1 <sup>tm1Jdh</sup>	STOCK Mbtps1tm1Jdh/J
32	OV	C57BL/6-Tg(Ins2-OV)307Wehi/WehiJ
33	Ppard <sup>tm1Rev</sup>	B6.129S4-Ppardtm1Rev/J
34	Prkcq <sup>tm1Litt</sup>	B6.129P2-Prkcqtm1Litt/J
35	Ptpcr D1Mit262	NOD.C-(Ptpcr-D1Mit262)/WehiJ
36	Tcra Tcrb	CBy.Cg-Thy1a Tg(TcraCl4, TcrbCl4)1Shrm/ShrmJ
37	Tcra Tcrb	NOD.Cg-Tg(TcraTcrbNY8.3)1Pesa/DvsJ

Рассмотрим основные экспериментально-биологические модели СД II типа, которые позволили с помощью современных технологических платформ для экспериментальной фармакологии обнаружить перспективные молекулы-мишени для создания инновационных сахароснижающих лекарственных средств.

Мыши-гомозиготы со спонтанной мутацией по диабету (*Lep<sup>r</sup><sup>db</sup>*) характеризуются развитием ожирения к 3-4 месяцу жизни, увеличением уровня инсулина в плазме крови к 10-14 дню жизни, увеличением уровня глюкозы в крови на 4-8 неделе, а также полифагией, полидипсией и полиурией. Мыши-гомозиготы *Lep<sup>r</sup><sup>db</sup>* выращены при температуре 23 °С и специальном световом режиме – 12 часов между 6 часами утра и 6 часами вечера [25].

В связи со стерильностью гомозигот *Lep<sup>r</sup><sup>db</sup>* наличие у них мутации *m* (*misty*) связано с умеренным изменением окраски. Меланоциты у мышей *m/m* имеют дендритическую форму, демонстрируют замедленную пролиферацию в культуре клеток и имеют большее содержание мелатонина. Меньшее количество меланобластов было обнаружено в первичной культуре клеток мышей *m/m*. В возрасте 2-5 недель *m/m*

мышы были меньше, чем в контроле. В возрасте 35 дней они отличаются от контрольных мышей меньшей длиной, сниженным на 15% весом, меньшей массой жировой ткани.

Данная линия мышей характеризуется нормальным содержанием тромбоцитов, серотонина и содержанием аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), увеличенным временем кровотечения и уменьшенным уровнем аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) в тромбоцитах [27].

У мышей-гетерозигот *Lep<sup>r</sup><sup>db/+</sup>* наблюдаются нормальные значения веса, уровня глюкозы и инсулина крови при повышенной метаболической эффективности. Ферменты стероидной сульфотрансферазы, интенсивно экспрессирующиеся у мышей *Lep<sup>r</sup><sup>db</sup>*, являются модификаторами гендерных различий у мышей [16].

Основными характеристиками, обнаруженными у мышей линии *C57BLKS*, являются неконтролируемое увеличение глюкозы в крови, острое поражение инсулин-продуцирующих β-клеток поджелудочной железы с наступлением смерти через 10 месяцев. Введение экзогенного инсулина не эффективно и увеличивает активность ферментов глюконеогенеза [14].

У мышей – гомозигот *C57BLKS-Lep<sup>db</sup>* наблюдаются периферическая нейропатия, поражение миокарда, а также снижение регенерационных возможностей. Самки этой линии демонстрируют уменьшение размеров матки и массы яичников, снижение продукции гормонов яичников и гиперциполипидемию в их гранулезном слое и эпителии эндометрия [11].

Перспективным направлением в изучении механизмов развития СД II типа является исследование митохондриального протеома [18].

Большинство экспериментальных протеомных исследований посвящено изучению механизма действия инсулина и патофизиологии инсулиновой резистентности. Клеточная линия *3T3-L1* фибробластов мышей с ожирением была детально исследована, так же как и адипоцитарный фенотип при лечении инсулином. Например, исследование методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (*2DPAGE*) <sup>32</sup>P-белков клеточной линии *3T3-L1* до и после преципитации антикальмодулиновыми антителами выявило, что инсулин не стимулирует фосфорилирование кальмодулина в условиях, в которых он стимулирует фосфорилирование других белков [6]. С помощью *2DPAGE* получены клеточные белки, вовлеченные в процесс дифференцировки этих клеток [22].

Методом *2DPAGE* было показано, что инсулин стимулирует фосфорилирование множества белков в *3T3-L1* клетках, входящих в состав инсулиновых рецепторов и способствующих проявлению киназной активности этих рецепторов [17].

Разделение белков адипоцитов семилетних тощих крыс и крыс с ожирением методом *2DPAGE* с последующей лазерной денситометрией выявило уменьшение концентрации цитозольного белка с молекулярной массой 28 кДа в двух биообразцах жировой ткани, печени и белой жировой ткани [19]. С помощью микросеквенирования белок был идентифицирован как карбо-

ангидраза III. Было показано, что уменьшение активности карбоангидразы III происходило вследствие супрессии гиперинсулинемии токсином β-клеток поджелудочной железы. Авторы установили, что именно карбоангидраза III уменьшает уровень гиперинсулинемии. Некоторые лаборатории, которые также проводили микросеквенирование белков адипоцитов, показали, что происходит увеличение экспрессии жировой пируваткарбоксилазы при прогрессировании ожирения [20].

Белки адипоцитов являются сегодня перспективными мишенями для создания новых лекарственных средств для лечения ожирения и инсулинорезистентности при СД II типа [19].

В течение последних 5 лет на фармацевтическом рынке России появились новые фармакотерапевтические группы сахароснижающих лекарственных средств, механизм действия которых, а также спектр фармакодинамических эффектов остается неизученным. Наиболее интересными из них являются группа меглитинидов (репаглинид) и группа тиазолидиндионов (розиглитазон, пиоглитазон), разработанные на основе обнаруженных биомишеней в организме экспериментальных биомоделей и анализа биообразцов пациентов с СД II типа.

Другие исследования, связанные с применением агонистов рецепторов, активируемых пероксисомальным пролифератором (*PPAR*), продемонстрировали различные белковые профили в тканях при различных моделях диабета. Например, агонист *PPAR* рецепторов *WY14,643*, который способствует нормализации уровня триглицеридов в плазме крови и устранению гипергликемии у мышей с ожирением (*ob/ob mice*), способствовал экспрессии 14 белков клеток печени, выявленной методом *2DPAGE* с последующей идентификацией масс-спектрометрическим методом. Все белки являются компонентами патологического метаболического пути пероксисо-

мальных жирных кислот [9]. Одновременно было показано, что активность ацетил-КоА-оксидазы, представляющей собой пероксисомальный бифункциональный белок, и 3-кетоацилтиолазы регулируются агонистом *PPAR* рецепторов *WY14,643*. Вместе с тем показано, что *WY14,643* индуцирует бета-оксидацию пероксисомальных жирных кислот в печени мышей.

*PPAR* — ядерный рецептор для тиазолидиндионов — лекарственных средств, относящихся к группе сенситаيزеров рецепторов к инсулину у пациентов с СД II типа. У пациентов с СД II типа, страдающих парциальной врожденной липодистрофией и острыми метаболическими дефектами с ранним началом диабета, гиперлипидемией и гипертензией, обнаружена мутация в *Pparg* гене. Линии мышей с различными мутациями в *Pparg* гене позволили определить их значение в возникновении мутационного синдрома. Был создан аллель *Pparg<sup>ldi</sup>* для замены внутреннего гена *Pparg*. Аллель способствует возникновению липодистрофии, дислипидемии и острой инсулиновой недостаточности.

Генетическая деконволюция аллеля *Pparg<sup>ldi</sup>* определяет две детерминанты, которые формируют два фенотипа: *tTA* белок (тетрациклинконтролируемый трансактиватор), вызывающий умеренную липодистрофию и метаболические расстройства, и белок *Flag-Pparg1* (тетрациклинрегулируемый белок), вызывающий острые проявления липодистрофии и метаболических расстройств.

Анализ адипоцитов мышей с *Pparg<sup>ldi</sup>* продемонстрировал 20-кратное увеличение экспрессии хемокина *Cxcl 10*. Лимфотропная функция *Cxcl 10*, извлеченного из жировой ткани мышей с *Pparg<sup>ldi</sup>*, обнаружила постоянную *FlagPPARγ*-зависимую лимфоцитарную инфильтрацию. Эти находки связаны с ролью *PPARγ* рецепторов в регуляции воспаления при СД II типа в жировой ткани и формировании метаболических изменений. В этом плане *PPAR* -рецеп-

торы могут способствовать возникновению метаболических эффектов тиазолидиндионов (розиглитазон, пиоглитазон), а также возникновению противовоспалительной реакции в жировой ткани посредством регуляции хемокиновой экспрессии.

Розиглитазон, селективный агонист *PPARγ* рецепторов, продемонстрировал аналогичные изменения у мышей с ожирением (модель *C57BL/6J lep/lep*). При этом такого эффекта не наблюдалось у тощих мышей [9, 23]. В других исследованиях агонист *PPARγ* рецепторов устранял толерантность к глюкозе у мышей модели *lep/lep*, но не вызывал существенных изменений у тощих мышей. Розиглитазон увеличивает экспрессию белка карбокси-пептидазы В как у мышей модели *lep/lep*, так и у тощих мышей, обеспечивая инсулиновый процессинг.

Наиболее интересными являются исследования, включающие анализ молекулярных механизмов глюкозоиндуцируемых изменений в  $\beta$ -клетках островков поджелудочной железы мышей линии *C57BL/6J*. Протеом  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы обнаруживает существенные динамические изменения под влиянием изменения концентрации глюкозы, отражающие увеличивающийся синтез инсулина, мобилизацию гранул инсулина и формирование ответа  $\beta$ -клеток на стресс. Исследование этих изменений необходимо для понимания процесса повреждения в клетках островков поджелудочной железы в гипергликемическом состоянии и разработки биотаргетных лекарственных средств.

У мышей линии *C57BL/6J* островки поджелудочной железы были изолированы и подвергались экспозиции 1 ммоль/л глюкозы в течение 24 ч. Белковый профиль был получен с помощью технологии *2DPAGE*. Идентификация белков выполнена на основе пептидного масс-финггерпринта с применением *MALDI-TOF* масс-спектрометрии (*Bruker Reflex IV, USA*) в программе *Mascot Search (Matrix Science, London, UK)*.



В качестве биомоделей СД II типа применяются *ob/ob* модели мышей и *ККА<sup>Y</sup>*-мыши. Эти модели также позволили исследовать глюкозоиндуцируемую экспозицию белков в  $\beta$ -клетках островков поджелудочной железы с помощью технологии *2DPAGE* с дальнейшей визуализацией белков и их идентификацией.

В настоящее время с помощью биомоделей получена информация о влиянии генетических мутаций на развитие различных форм ожирения и их связи с формированием гипергликемии [29].

В частности, показано, что высокоаффинный рецептор для лептина *OB-R* участвует в сигнальном пути на уровне жировой ткани. В исследовании Чен (*Chen H.*) с соавт. идентифицирован альтернативный транскрипт, кодирующий форму рецептора *OB-R* с длинным интрацеллюлярным доменом. Мыши линии *db/db* продуцируют альтернативный транскрипт с *106 nt* вставкой, которая определяет формирование N-терминального домена. Найдена *G→T* точечная мутация в геномном сиквенсе *OB-R* у мышей линии *db/db*. Установлено, что длинный интрацеллюлярный домен *OB-R* инициирует интрацеллюлярную сигнальную трансдукцию и ведет к формированию острого фенотипа ожирения у мышей линии *db/db* [7].

Моноклональные аутоантитела для гормона тимулина (*FTS-Zn*) были обнаружены в клеточных лизатах селезенки диабетических мышей линии *db/db* и миеломных клетках. Культуральные супернатанты *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали биологическую активность синтетического и естественно-го гормона (антитимулина) и связывание его с эпителиальными клетками [8, 21, 24, 30].

Таким образом, анализ существующих исследований продемонстрировал возможности применения биомоделирования для изучения молекулярного патогенеза СД II типа и поиска новых мишеней для разработки биотаргетных лекарственных средств.

## Литература

1. Дедов И.И., Сунцов Ю.И., Кудрякова С.В., Рыжкова С.Г. Эпидемиология инсулинзависимого сахарного диабета // *Кардиология*, № 3, с. 47-55, 1998.
2. Сарвилина И.В., Макляков Ю.С., Каркищенко Н.Н. Хронофармакологические подходы к лекарственной профилактике хронической сердечной недостаточности при сахарном диабете типа 1 // *Вестник РАМН*, № 4, с. 127-133, 2002.
3. Сарвилина И.В., Макляков Ю.С., Каркищенко Н.Н. Диабетическая нефропатия: новые возможности фармакологической коррекции // *Проблемы эндокринологии*, № 3, с. 8-14, 2003.
4. Бландова З.К., Малашенко А.М., Крышклина В.П., Семенов Х.Х., Шмидт Е.Ф. Правила разведения инбредных лабораторных животных: Методические указания / АМН СССР, НИЛ экспериментально-биологических моделей. — М. 1979.
5. Ahmed M., Bergsten P. Glucose-induced changes of multiple mouse islet proteins analysed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry // *Diabetologia*, No. 48., pp. 477-485, 2005.
6. Blakeshear P., Haupt D. Evidence against insulin-stimulated phosphorylation of calmodulin in 3T3-L1 adipocytes // *J. Biol. Chem.*, vol. 264, pp. 3854-3858, 1989.
7. Chen H., Charlat O., Tartaglia L. et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice // *Cell.*, vol. 84, No. 3, pp. 491-495, 1996.
8. Dardenne M., Savino W., Bach J. Autoimmune mice develop antibodies to thymic hormone: production of anti-thymulin monoclonal autoantibodies from diabetic (*db/db*) and B/W mice // *J. Immunol.*, vol. 133, No. 2, pp. 740-743, 1984.
9. Edvardsson U., Alexandersson M., Brockenhuus von Lowenhielm H. et al. A proteome analysis of livers from obese (*ob/ob*) mice treated with the peroxisome proliferator WY14, 643 // *Electrophoresis*, vol. 20, pp. 935-942, 1999.
10. Fischer D., Elofsson A., Rice D., Eisenberg D. Assessing the performance of fold recognition methods by means of a comprehensive benchmark // *Pac. Symp. Biocomput.*, pp. 300-318, 1996.
11. Garris D., Garris B., Novikova L., Lau Yu. Structural, metabolic and endocrine analysis of

- the diabetes (db/db) hypogonadal syndrome: relationship to hypophyseal hypercytolipidemia // *Cell and Tissue Research*, vol. 319, No. 3, pp. 501-512, 2005.
12. *Guillausseau P.J.* Сахарный диабет MODY и генетические аспекты сахарного диабета 2 типа: новые представления // *Метаболизм*, т. 4, № 25, с. 6, 2005.
  13. *Hayden M., Tyagi S., Kerklo M., Nicoll M.* Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease // *JOP. J. Pancreas (online)*, vol. 6, No. 4, pp. 287-302, 2005.
  14. *Hummel K., Dickie M., Coleman D.* Diabetes, a new mutation in the mouse // *Science*, vol. 153, No. 740, pp. 1127-1128, 1966.
  15. *Korc M.* Diabetes mellitus in the era of proteomics // *Molecular & Cellular Proteomics*, vol 2, No. 6, pp. 399-404, 2002.
  16. *Leiter E., Chapman H.* Obesity-induced diabetes (diabesity) in C57BL/KsJ mice produces aberrant trans-regulation of sex steroid sulfotransferase genes // *J. Clin. Invest.*, vol. 93, No. 5, pp. 2007-2013, 1994.
  17. *Levenson R., Blackshear P.* Insulin-stimulated protein tyrosine phosphorylation in intact cells evaluated by giant two-dimensional gel electrophoresis // *J. Biol. Chem.*, No. 264, pp. 19984-19993, 1989.
  18. *Lopez M., Kristal B., Chernokalskaya E. et al.* High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation // *Electrophoresis*, No. 21, pp. 3427-3440, 2000.
  19. *Lynch C., Brennan W., Vary T. et al.* Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats // *Am. J. Physiol.*, vol. 264, pp. E621-E630, 1993.
  20. *Lynch C., McCall K., Billingsley M. et al.* Pyruvate carboxylase in genetic obesity // *Am. J. Physiol.*, No. 262, pp. E608-E618, 1992.
  21. *Mandel M., Mahmoud A.* Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db) // *J. Immunol.*, vol. 120, No. 4, pp. 1375-1377, 1978.
  22. *Sadowski H., Wheeler T., Young D.* Characterization of initial responses to the inducing agents and changes during commitment to differentiation // *J. Biol. Chem.*, vol. 267, pp. 4722-4731, 1992.
  23. *Sanchez J., Converset V., Nolan A. et al.* Effect of rosiglitazone on the differential expression of diabetes-associated proteins in pancreatic islets of C57Bl/6 lep/lep mice // *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, pp. 509-516, 2002.
  24. *Serreze D., Leiter E., Kuff E. et al.* Molecular mimicry between insulin and retroviral antigen p73. Development of cross-reactive autoantibodies in sera of NOD and C57BL/KsJ db/db mice // *Diabetes*, vol. 37, No. 3, pp.351-358.
  25. *Sviderskaya E., Novak E., Swank R., Bennett D.* The murine misty mutation: phenotypic effects on melanocytes, platelets and brown fat // *Genetics*, No. 148, pp. 381-390, 1998.
  26. The Fifth World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. Conference report // *ATLA*, No. 33, pp. 119-125, 2005.
  27. *Truett G., Heeger P., Mynatt R. et al.* Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (Hot-SHOT) // *Biotechniques*, No. 29, pp.52-54, 2000.
  28. WHO [World Health Organization]. World Health Report. 1997.
  29. *Wolff G.L.* Obesity as a Pleiotropic Effect of Gene Action // *J. of Nutrition*, No. 6, pp. 1897S-1901S, 2007.
  30. *Yoon J., Leiter E., Coleman D. et al.* Genetic control of organ-reactive autoantibody production in mice by obesity (ob) diabetes (db) genes // *Diabetes*, vol. 37, No. 9, pp.1287-1293, 1988.

#### SEARCHING FOR NEW TARGETS FOR HYPOGLYCAEMIC DRUG DEVELOPMENT BASED ON BIOMODELING OF DIABETES MELLITUS TYPE II AND PROTEOM TECHNOLOGIES

**I.V. Sarvilina, Yu.S. Maklyakov, A.V. Krishtopa, V.N. Karkischenko**  
*South Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don*  
*Rostov State Medical University, Rostov-on-Don*  
*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

The main experimental biomodels of the diabetes mellitus type II discussed here allow revealing the pathway of disease and finding the perspective biomolecules for hypoglycaemic drug development by means of modern technological platforms for molecular diabetology and experimental pharmacology.

**Key words:** diabetes mellitus, proteomic analysis, biomodel.

## Особенности системы биотрансформации лекарственных средств в фетоплацентарном комплексе

Е.А. Сокова

*Институт клинической фармакологии ФГУ «НЦЭСМП» Росздравнадзора, Москва*

В аналитическом обзоре представлены и обсуждаются молекулярные механизмы эволюции экспрессии ферментов I и II фазы системы биотрансформации ксенобиотиков у плода и в плаценте. В настоящее время понимание и знание метаболизма лекарственных средств в материнско-плацентарно-плодном комплексе, факторов, оказывающих влияние на эти процессы, имеет первостепенное значение в оценке соотношения польза/риск применения лекарственных средств как для материнского организма, так и для плода на протяжении всей беременности.

**Ключевые слова:** беременность, плацента, плод, биотрансформация, цитохром P-450, лекарственное средство.

На сегодняшний день, данные многочисленных экспериментальных и клинических исследований показали первостепенную роль метаболизма лекарственных средств (ЛС) в фармакокинетических процессах, определяющую индивидуальный фармакологический ответ [1, 2, 3, 5]. Достижения молекулярной медицины позволили доказать наличие в организме человека «системы биотрансформации и транспортеров ЛС», звенья которой (ферменты метаболизма и различные транспортеры ЛС) осуществляют предотвращение проникновения ксенобиотиков, снижение фармакологической активности и облегчение их выведение из конкретной биологической системы. Во время беременности «система биотрансформации и транспортеров ЛС» приобретает трехуровневый характер, функционируя в материнско-плацентарно-плодном компартменте в соответствии со степенью биологической зрелости [21, 27, 34, 57]. При этом вклад фетоплацентарного метаболизма в гестационную фармакокинетику не велик [3]. «Слабым» звеном в этой системе является плод, метаболизм которого протекает медленнее, чем у взрослых, в связи с отсутствием или низкой экспрессией большинства изоферментов СУР450 микросомального окисления ЛС (табл. 1).

### I фаза метаболизма ЛС у плода

Несмотря на то, что исследования I фазы метаболизма ЛС у плода проводятся давно, наши знания об экспрессии различных изоферментов СУР далеки от полноты. Активность ферментов, участвующих в микросомальном окислении ЛС, обнаруживается уже в конце первого триместра беременности, однако они более активны в отношении эндогенных веществ. Органами биотрансформации ксенобиотиков у плода в порядке убывания значимости являются надпочечники, печень, поджелудочная железа и половые железы. В процессе метаболизма некоторые ЛС окисляются до эпоксидов, обуславливающих в большинстве случаев тератогенное действие ЛС. Концентрация цитохрома P-450 в надпочечниках выше, чем в печени. Разные изоферменты цитохрома P-450 приобретают функциональную активность в различные сроки внутриутробного развития плода, что служит причиной неодинаковой окислительной способности в отношении различных ЛС, относящихся иногда к одной группе веществ. Содержание цитохрома P-450 в печени плода составляет 30-60% от соответствующих значений в печени взрослого человека. При рождении содер-

жание СУР начинает постепенно увеличиваться, достигая взрослого уровня к 10 годам жизни [21, 27]. Однако наблюдаются значительные различия в экспрессии генов трех семейств СУР, задействованных в метаболизме ксенобиотиков, а также различия среди 24 изоферментов СУР, которые кодируются этими генами (табл. 1).

Таблица 1  
Активность и экспрессия СУР  
I фазы метаболизма ЛС у плода [21]

Ген	Триместр беременности		
	1	2	3
<i>CYP1A1</i>	+	+	?
<i>CYP1B1</i>	?	±?	?
<i>CYP1A2</i>	-	-	-
<i>CYP2A</i>	-	-	-
<i>CYP2B6</i>	-	-	?
<i>CYP2C</i>	-	-	-
<i>CYP2D6</i>	-	±	±
<i>CYP2E1</i>	?	+?	+?
<i>CYP2J</i>	?	+	?
<i>CYP3A7</i>	+	+	+
<i>CYP3A4/3A5</i>	-	-	-

Обозначения: + активность или белок определен; - не определена активность белка; ? - не определен; ± - активность или белок определен, но исследована только в одной фракции исследованных образцов; +? - противоречивые данные.

### Семейство СУР1

Три представителя СУР1 – СУР1А1, СУР1А2, СУР1В1 – необходимы для метаболического распределения полициклических ароматических углеводородов, ароматических аминов, эстрадиола и некоторых ЛС. В ряде исследований [36, 63] была продемонстрирована активность СУР1А1 в 8 из 10 образцов печени эмбриона на 7–9-й неделе гестации и наличие экспрессии СУР1А1 на более поздних сроках гестации (11–20-я неделя) [50]. Аналогичные результаты были получены в исследовании [30], в котором обнаружили СУР1А1 мРНК в печени, легких и надпочечниках плода и ее

отсутствие в почках между 6-й и 12-й неделями, 8-й и 21-й неделей, 11-й и 17-й неделями гестационного срока соответственно. Авторы показали, что экспрессия СУР1А1 мРНК снижается с возрастом, а у взрослого человека вообще отсутствует.

**СУР1В1** экспрессия и ее роль в прокарциногенном метаболизме представляет значительный интерес. Однако только в двух исследованиях была исследована экспрессия СУР1В1 во время онтогенеза. Hakola J. и соавт. [18] сообщили о СУР1В1 мРНК экспрессии в печени плода (12–19-я неделя гестации) только в трех из шести исследованных образцов. В более раннем исследовании [50] не обнаружена СУР1В1 мРНК в печени плода, в то время как экстрапеченочная экспрессия была продемонстрирована в почках, головном мозге, надпочечниках и легких плода [18].

СУР1А2, в противоположность СУР1А1 и СУР1В1, не играет роли в метаболизме ксенобиотиков у плода. Большинство исследователей не смогли определить экспрессию СУР1А2 в печени плода иммунологическим и ПЦР-методами во время фетального и неонатального периодов [50, 54, 63]. И только в возрасте 1 года содержание СУР1А2 достигает 50% уровня взрослого.

### Семейство СУР2

**СУР2** является самым разнообразным среди семейств СУР, содержащим 8 изоферментов. К настоящему моменту в печени плода не обнаружено экспрессии ни одного из изоферментов СУР2А [14, 22, 50], а также СУР2В6 от 11-й до 24-й недели гестации. У человека известно четыре члена семейства генов СУР2С – СУР2С8, СУР2С9, СУР2С18 и СУР2С19. Имеются противоречивые данные по поводу экспрессии СУР2С в печени плода. Большинство авторов считают, что экспрессия СУР2С активируется при рождении. Однако, в работе Koukouritaki S.B. и соавт. [24] впервые было показано наличие экспрес-

сии CYP2C9 и CYP2C19 у плода на протяжении гестационного периода (рис. 1, 2).

Исследователи отметили, что содержание CYP2C9 и CYP2C19 в различных образцах печени плода подвержено значительной вариабельности (рис. 3).

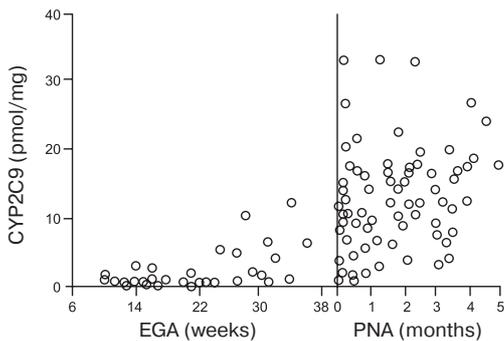


Рис. 1. Развитие экспрессии CYP2C9 у плода на протяжении гестационного периода и в первые 5 месяцев после рождения [24]

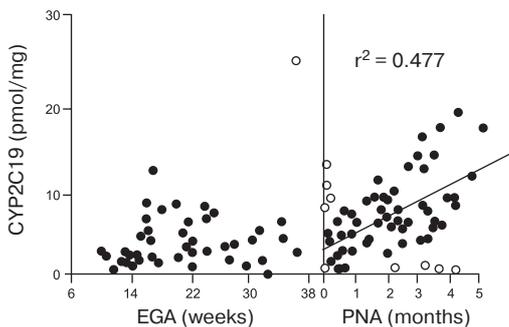


Рис. 2. Развитие экспрессии CYP2C9 и CYP2C19 у плода на протяжении гестационного периода и в первые 5 месяцев после рождения [24]

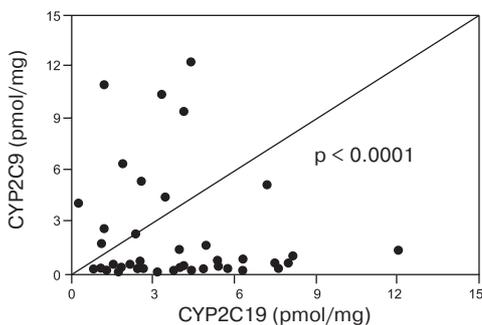


Рис. 3. Вариабельность содержания CYP2C9 и CYP2C19 в различных образцах печени плода [24]

Авторы показали, что по мере увеличения гестационного срока содержание и активность CYP2C9 и CYP2C19 постепенно нарастают.

Ladona M.G. и соавт. [25], базируясь на невозможности определения О-деметилирования декстрометорфана, предполагают отсутствие экспрессии CYP2D6 в печени плода, хотя имеются данные о наличии белка CYP2D6 и мРНК в печени плода после 30 недели гестации, но только в 30% исследованных образцов, содержание которых составляет 5% от взрослого уровня [58]. В единственном исследовании [12] была обнаружена экспрессия CYP2D6 в головном мозге плода. Содержание CYP2D6 белков значительно возрастает после рождения, достигая 50-75% от уровня взрослого человека в течение неонатального периода. Как считает большинство исследователей, CYP2D6 у плода, так же как у взрослых, является генетически самым полиморфным, что может приводить к токсическим эффектам ЛС, являющихся его субстратами.

CYP2E1 активно участвует в метаболизме этанола, нитрозаминов, кофеина, некоторых анестетиков. В ряде исследований обнаружен постоянный уровень CYP2E1, начиная с 16-й и до 24-й недели гестации, но на уровне 10-30% от взрослого.

Не так давно был открыт CYP2J2, экспрессированный в значительном количестве в сердце, желудочно-кишечном тракте, почках, печени и легких человека [62]. Этот изофермент катализирует окисление ретиноевой и арахидоновой кислот в биологически активные вещества [47]. Исследования продемонстрировали также наличие экспрессии CYP2J2-белка в печени и слизистой оболочке носа плода в период от 13-й до 18-й недели гестации, причем его уровень соответствовал взрослому [14].

### Семейство CYP3

Доклинические и клинические исследования последних лет показали, что CYP3A7 является доминирующим изо-

ферментом в печени плода и экспрессирован преимущественно у плода [55]. В то же время активность CYP3A4 у плода слабая и возрастает к моменту рождения, достигая 30-40% от уровня активности взрослого после первого месяца жизни. Экспрессия CYP3A4 транскрипционно активируется в течение 1-й недели после рождения, одновременно с этим экспрессия CYP3A7 снижается. Shao J. и соавт. [49] определяли количественно равновесную мРНК в экспрессии 6 изоферментов CYP 450 и 11 изоферментов глутатион-S-трансфераз в гемопоэтических клетках печени плода во втором триместре беременности. Была обнаружена низкая экспрессия изоферментов CYP 450 (CYP1A1, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5), а CYP1A2 и CYP3A7 не были найдены.

#### II фаза метаболизма ЛС у плода

Реакции II фазы метаболизма ЛС обеспечивают снижение фармакологической активности или детоксикацию, облегчение их выведения из конкретной биологической системы. Данные по активности ферментов II фазы метаболизма ЛС у плода представлены в табл. 2.

Таблица 2  
II фаза метаболизма ЛС у плода [27]

Ген	Триместр беременности		
	1	2	3
GSTA1/A2	±	±	±
GSTM	±	±	±
GSTP1	±	±	±
NAT2	±	±	±
UGT1A1	-	-	-
UGT1A3	?	±	±
UGT1A6	-	-	-
UGT2B7	?	±	±
UGT2B17	?	±	±
EPHX1	±	±	±
EPHX2	?	±	±
SULT1A1	?	±	±
SULT1A3	?	±	±
SULT2A1			±

Обозначения см. в табл. 1.

#### Глутатион-S-трансфераза

Глутатион-S-трансфераза (GST) – семейство ферментов катализирует конъюгацию с глутатионом большого количества ксенобиотиков, в результате чего происходит детоксикация и облегчение их выведения.

У человека известно 13 представителей GST, принадлежащих к 5 различным классам: α(GSTA1-GSTA4), μ(GSTM1-GSTM5), ρ(GSTP1), q(GSTT1 и GSTT2), z(GSTZ1). Strange R.S. и соавт. [56] определили экспрессию GSTA1 (182,4-247,2 pmol/mg цитозольный протеин) и GSTA2 (14,2-31,2 pmol/mg цитозольный протеин) в печени у плода, начиная с 10-й недели гестации, причем уровень экспрессии GSTA1 и GSTA2 возрастал в 1,5-4 раза соответственно, достигая взрослого уровня к 2 годам жизни, а экспрессия GSTM была на более низком уровне (1,3-2,4 pmol/mg микросомальный белок) [56]. При рождении экспрессия GSTM возрастает в 5 раз. Высокий уровень экспрессии GSTP1 наблюдался в образцах печени плода, начиная с 10-й до 22-й недели гестации (18,0-25,2 pmol/mg цитозольный белок), с постепенным ее снижением во 2-м и 3-м триместрах беременности. Печеночная GSTP1, определяемая в неонатальном периоде (5,0 pmol/mg цитозольный белок), во взрослом состоянии не обнаружена. В более позднем исследовании van Lieshout и соавт. [59] обнаружили экспрессию GSTA и GSTP1 у одного плода с 8-й недели гестации. В исследовании оба фермента идентифицировались в печени, пищеварительном тракте, надпочечниках и мозговых тканях, в то время как GSTP1 был обнаружен только в поджелудочной железе, легких и почках плода.

Shao J. и соавт. [49] обнаружили несколько изоферментов GST, включая hGSTM1, hGSTM2, hGSTM4 и hGSTP1, содержание которых в стволовых гемопоэтических клетках плода было гораздо выше по сравнению с содержанием в печени, за исключением hGSTA4 и α-класса GST.

### *N-ацетилтрансфераза*

N-ацетилтрансфераза (NAT) играет важную роль в метаболизме противотуберкулезных препаратов. Ацетилирование, осуществляющееся NAT эволюционно, является одним из ранних механизмов адаптации, как реакция, необходимая для синтеза жирных кислот, стероидов, функционирования цикла Кребса. Выделено два изофермента N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2). К настоящему моменту известен генетический полиморфизм NAT2, который ассоциирован с рядом заболеваний [19].

Rasifici G.M. и соавт. [35] изучили активность NAT1 в тканях плода между 11-й и 25-й неделями гестации. Относительная активность (от 0,7 до 1,9 nmol/min/mg) обнаружена в печени, надпочечниках, почках, легких и кишечнике плода, при этом очевидной ассоциации между активностью и сроком гестации не наблюдалось.

### *УДФ-глюкуроилтрансфераза*

Глюкуронирование является наиболее важной реакцией II фазы метаболизма лекарственных средств и представляет собой конъюгацию с субстратом УДФ-глюкуроновой кислоты, катализируется 2 семействами УДФ-глюкуроилтрансфераз (UGT), включающих более 20 изоферментов. Изофермент UGT1A1, осуществляющий глюкуронирование билирубина, в печени плода отсутствует; экспрессия запускается только при рождении, и активность достигает взрослого уровня к 3-6 месяцам постнатального периода.

Активность UGT1A3 обнаружена в печени плода на уровне 30% от взрослого уровня [6]. Что касается остальных изоферментов UGT, то UGT1A6 — основной в глюкуронировании ацетаминофена — у плода отсутствует, начиная постепенно функционировать при рождении и достигая взрослого уровня к 10 годам жизни. Отсутствие изофермента UGT2B у плода связано с развитием синдрома Грея у новорожденных.

Известно, что изофермент UGT2B7 экспрессирован на уровне от 10 до 20% от взрослого в период 15-27-й недели гестации, достигая взрослого уровня к 2-6 месяцам после рождения. Наконец, UGT2B17 — важный изофермент в метаболизме андрогенных стероидов — присутствует в печени плода на уровне 3% от взрослого. Недостаточность глюкуроилтрансферазной системы у плода частично компенсируется более ранним включением сульфатазной активности, а также экспрессией и активностью плацентарных UGT.

### *Эпоксид гидролаза*

Реакции водной конъюгации катализируются ферментами эпоксид гидролазами (EPHX) и играют важную роль в детоксикации и биоактивации большого количества ксенобиотиков (например, алифатических эпоксидов, ПАУ). У человека выделено две изоформы эпоксид гидролазы — EPHX1 и EPHX2.

Omicinski C.J. и соавт. [27] сообщили о наличии печеночной активности EPHX1 у плода уже с 7,5-й недели гестации (30 pmol/min/mg S9 белка), которая возрастала линейно к 22-й неделе гестации (290 pmol/min/mg S9 белка). Активность EPHX1 на 22-й неделе гестации составляла половину таковой от активности взрослого человека. Была обнаружена корреляция между EPHX1-активностью и уровнем белка. В то же время корреляция с уровнем мРНК отсутствовала, что дало основания предположить наличие множественных регуляторных механизмов ее активации. В легких плода активность EPHX1 составляла 16 pmol/min/mg S9 белка и наблюдалась с 12-й недели гестации. Фактически, EPHX1-экспрессия в легких приближалась к таковой у взрослого.

Изофермент EPHX2 также экспрессирован у плода, начиная с 14-й недели гестации, при этом активность его не меняется до 27-й недели.

### Сульфотрансфераза

К настоящему моменту известно около 40 изоферментов сульфотрансферазы (SULT), которые катализируют сульфатную конъюгацию значительного количества эндогенных и экзогенных веществ (гормоны щитовидной железы, катехоламины и др.). Была продемонстрирована высокая активность SULT1A3, катализирующая реакции сульфатирования фенольных моноаминов (дофамина, норадреналина, серотонина) в печени и почках плода с 18-й до 25-й недели гестации.

Активность SULT2A1, участвующего в биоактивации канцерогенов в печени плода, обнаружена в печени плода только после 25-й недели гестации, при этом в надпочечниках она была в 5 раз выше, а в почках составила всего 10% от активности в печени [23, 27, 44].

### Внепеченочный метаболизм лекарственных средств у плода

Вклад внепеченочных тканей в общий объем метаболизма ЛС у плода человека значительно больше, чем соответствующий вклад внепеченочных тканей у взрослого человека. Основной обмен ксенобиотиками между матерью и плодом происходит главным образом через плаценту. Развитие плаценты начинается в первую неделю беременности путем дифференцировки трофобласта, ведущего свое происхождение от поверхностного клеточного слоя оплодотворенной яйцеклетки.

В течение беременности плацента претерпевает функциональные изменения, что обеспечивает возможность обмена веществ между плодом и матерью. Было показано, что плацента морфологически и функционально выполняет для плода роль органа, ответственного за транспорт, метаболизм и экскрецию ЛС (в связи с незрелостью этих систем во время внутриутробного развития плода) [57].

### Метаболизм ЛС в плаценте

Цитохром Р-450 (СУР) представляет собой группу ферментов, участвующих в синтезе и катаболизме стероидных гормонов, метаболизме большого количества ЛС и токсических веществ. Плацентарные изоферменты СУР содержатся в эндоплазматическом ретикулуме трофобластных клеток [40]. Данные по экспрессии и активности СУР представлены в табл. 2.

Таблица 2

### Экспрессия и активность цитохрома Р-450 (СУР) в плаценте женщин в первом триместре и в конце беременности [57]

Изоферменты СУР		1-й триместр	Конец беременности
СУР1	1A1	+ abc	+ abc
	1A2	+ a	- ab
	1B1	+ a	
СУР2	2A6	- a	- a
	2A7	- a	- a
	2A13	- a	- a
	2B6	- a	- a
	2B7	- a	- a
	2C	+ a	- a
	2D6	+ a, -c	+ a, -c
	2E1	+ ab, -/+c	+ a, -/+bc
	2F1	+ a	+ a
	СУР3	3A3	? + a, -b
	3A4	+ ab	+ a, -/+b
	2A5	+ ab	+ a, -/+b
	3A6	+ ab	+ a, -b
	3A7	+ ab	-/+ab
СУР4	4B1	+ a	+ ab

Обозначения: a – мРНК, b – иммуногистохимия/протеин, c – активность, + определен; – неопределен; ? – неизвестно.

Тип и количество экспрессированного СУР варьирует в зависимости от периода гестации и здоровья матери [29]. В целом, оказалось, что большинство изоферментов СУР экспрессированно в первом триместре беременности [17]. Было высказано предположение, что во время ранней стадии развития и роста плода, когда суще-

ствуется наибольшая вероятность воздействия тератогенов, экспрессия генов СYP максимальна, а в конце беременности она может быть выключена.

Разнообразие материнских факторов и факторов внешней среды может влиять на уровни ферментов, метаболизирующих ЛС в плаценте. Метаболизм ксенобиотиков в плаценте нарушен у матерей, которые принимают наркотики, курят, принимают алкоголь, подвергаются воздействию загрязненного воздуха, принимают «радиоактивную» пищу [10, 20, 32].

#### **Семейство цитохрома P-450 CYP1**

В плаценте было определено три изофермента семейства CYP1: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1. Хорошо известно, что CYP1A задействован в биоактивации многих веществ, таких, как полициклические ароматические углеводороды, которые оказывают нежелательное действие на плод [38, 40]. Активность мРНК CYP1A1 была обнаружена в течение всей беременности [16, 17], в то время как плацентарная активность мРНК CYP1A2 – только в первом триместре беременности, причем CYP1A экспрессирован в большей степени в плаценте молодых матерей. Хотя экспрессия мРНК CYP1B1 наблюдается в плацентарных тканях на протяжении всей беременности, влияние этого изофермента на общую ксенобиотико-метаболизирующую способность плаценты незначительна [18]. В исследованиях [10, 42, 43] было обнаружено, что компоненты табачного дыма индуцируют CYP1A плаценты в различной степени в зависимости от стадии беременности. Выявлена индукция плацентарной активности CYP1A при курении, особенно CYP1A1, которая выражена в большей степени в конце беременности [15, 37, 50], причем она остается в течение нескольких недель после прекращения курения. Последние данные показали, что алкоголь и компоненты табачного дыма являются синергистами в повышении плацентарной активности CYP1A [10].

#### **Семейство цитохрома P-450 CYP2**

Изоферменты цитохрома P-450 2A, 2B, 2C, 2D, 2E обнаружены в плаценте не были. Более того, мРНК CYP2A и CYP2B не были определены в плаценте на протяжении всей беременности [17, 22]. Rasheed A и соавт. [45] не обнаружили в норме изофермент CYP2E1 в плаценте на ранних стадиях развития беременности, а у беременных женщин, употреблявших алкоголь, идентифицировали наличие CYP2E1 в плаценте, выраженное в различной степени. При этом наличие CYP2E1 в плаценте коррелировало с уменьшением размера головы у новорожденных детей. В исследованиях ряда авторов [10, 17] было также показано участие плацентарного CYP2E1 в метаболизме алкоголя в плаценте. Уровень изофермента CYP2E1, так же как и уровень CYP1A1 в плаценте, подвержен значительной индивидуальной вариабельности [60].

#### **Семейство цитохрома P-450 CYP3**

Семейство CYP3 в количественном и качественном отношении – самое представительное в печени. Однако, несмотря на наличие CYP3A белка и мРНК в плаценте человека, значимой активности изоферментов CYP3A обнаружено не было [17, 28, 39].

#### **Реакция II фазы метаболизма ЛС в плаценте**

##### **УДФ-глюкуронилтрансфераза**

Глюкуронирование является самой распространенной реакцией II фазы метаболизма ЛС и катализируется семейством ферментов – УДФ-глюкуронилтрансферазами (UGT) – путем конъюгации глюкуроновой кислоты с ЛС-субстратами и их метаболитами [26]. Эту конъюгацию принято рассматривать как реакцию детоксикации, в результате которой образуются более гидрофильные и более доступные для экскреции конъюгаты.

Известно 2 семейства (UGT1 и UGT2) и более 20 изоформ UGT. Было показано,

что UGT присутствуют в плаценте на протяжении всего периода гестации и, возможно, играют главную роль в плацентарной метаболической активности [9, 10, 11].

Последние исследования [9] показали наличие мРНК экспрессии 6 изоформ (UGT2B) в синцитии плаценты, которая выражена на протяжении всей беременности [8, 10, 11]. Например, Schenker S. и соавт. [48] обнаружили, что 17% оланзапина подвергается глюкуронированию и за счет этого перемещается через плаценту более медленно, чем сам лекарственный препарат. Однако наблюдается высокая межличностная вариабельность в экспрессии и активности плацентарной UGT. В исследовании Collier A. и соавт. [10] было продемонстрировано снижение плацентарной активности UGT при курении и приеме алкоголя.

#### **Глутатион- S-трансфераза**

Процесс конъюгации глутатиона с биологически активными субстратами в плаценте протекает активно на протяжении всей беременности и осуществляется ферментами — глутатион-S-трансферазами (GST), которые могут играть ключевую роль в защите плода от кислородного голодания и воздействия электричества [28, 33, 37]. При этом активность ферментов, осуществляющих этот процесс в плаценте, может быть, скорее всего, отнесена к метаболизму гормонов, нежели к процессу детоксикации ксенобиотиков [37].

#### **Эпоксид гидролаза**

Эпоксид гидролаза присутствует в различных органах организма, катализируя превращение эпоксидов в трансглюколи или трансгидродиоли. Только одна форма эпоксид гидролазы была обнаружена в плаценте человека, начиная с 8-9-й недели гестации [31, 34, 41]. В результате реакций I фазы метаболизма ЛС ряд ароматических углеводов образуют эпоксиды, которые могут быть ковалентны с ДНК и бел-

ком, что может явиться причиной токсичности этих соединений. Хорошо известно, что эпоксидные производные фенитоина и вальпроата обладают свойством вызывать врожденные пороки развития у плода, однако активность плацентарных эпоксид гидролаз мало влияет на нежелательные исходы воздействия препарата.

#### **Сульфотрансфераза**

Реакциям сульфатирования в плаценте, катализируемых сульфотрансферазами, подвергаются некоторые стероидные гормоны, катехоламины, более 90% дофamina [46] существует в крови в сульфатированной форме, при этом включение сульфотрансфераз в плацентарный метаболизм ЛС изучено мало. У человека известно 10 генов, каждый из которых кодирует 2 различных изофермента сульфотрансферазы [13]. Оказалось, что многие из этих изоферментов сульфотрансферазы экспрессированны в плаценте в различной степени [4, 7, 51]. Сравнительные экспериментальные данные плацентарного сульфатирования салбутамола, фенотерола и дофamina [52] позволяют предположить, что этот путь биотрансформации для некоторых лекарственных средств является главным.

#### **Заключение**

Трехуровневый характер «системы биотрансформации и транспортеров ЛС» обеспечивает функционирование материнско-плацентарно-плодного компартмента в соответствии со степенью биологической зрелости. Отсутствие или низкая экспрессия изоферментов CYP450 микросомального окисления ЛС объясняет более медленный механизм метаболизма ЛС у плода. Несмотря на то, что исследования метаболизма ЛС у плода проводятся давно, наши знания об экспрессии различных изоферментов I и II фаз далеки от полноты. Практически все жирорастворимые ксенобиотики проникают через плаценту. Известно, что большое количество ксенобиотиков, в том

числе и ЛС, вызывают нежелательные эффекты – внутриутробную смерть развивающегося эмбриона и плода, ВПР, функциональные нарушения. Установлено, что ряд ксенобиотиков являются нетоксичными, но после ферментных превращений превращаются в токсичные промежуточные продукты. Известно, что изоферменты цитохрома Р-450 катализируют окислительный метаболизм большого количества веществ, включая протератогены, проканцерогены и промутагены. В отличие от животных, в печени плода человека обнаружена метаболическая активность СYP1A1, СYP1B1, СYP2C8, СYP2D6, СYP2E1, СYP3A4, СYP3A5, СYP3A7 после 8-й недели гестации, а также в период органогенеза.

В конце первого триместра беременности обнаруживается активность ферментов микросомального окисления ЛС, но только относительно эндогенных веществ. Причиной неодинаковой окислительной способности различных ЛС является различная функциональная активность изоферментов цитохрома Р-450 в зависимости от внутриутробного развития плода. Тератогенное действие ЛС обусловлено окислением некоторых ЛС до эпоксидов. Органы биотрансформации ксенобиотиков у плода (в порядке убывания значимости) – надпочечники, печень, поджелудочная железа и половые железы. Установлено наличие экспрессии с началом органогенеза, но она ограничена узким спектром ферментов. Некоторые ферменты экспрессированы только в печени плода, например СYP3A7 является плод-специфическим изоферментом.

Воздействие ксенобиотиков на плод в значительной степени модулируется метаболической способностью матери и плаценты, которая морфологически и функционально выполняет для плода роль органа, ответственного за транспорт, метаболизм и экскрецию ЛС.

Хорошо известно, что во время развития человека происходят существенные изменения фармакокинетики. Доказано, что

эти изменения влияют на различия в терапевтической эффективности и токсической чувствительности к ксенобиотикам. Метаболизм во многом детерминирует фармакокинетику. К настоящему моменту онтогенез изменений экспрессии ферментов, метаболизирующих ЛС во многом известен, однако предиктивных знаний для понимания терапевтического режима дозирования и прогнозирования токсичности ЛС для плода недостаточно. Особенно перспективным является изучение генетических различий в экспрессии ферментов, метаболизирующих ЛС и контролирующих их механизмов [24, 61].

В настоящее время является очевидным то, что понимание и знание метаболизма и транспорта ЛС в материнско-плацентарно-плодном комплексе, факторов, оказывающих влияние на эти процессы, имеет важное значение в оценке пользы/риска применения ЛС как для материнского организма, так и для плода на протяжении всей беременности.

### Литература

1. *Кукес В.Г.* Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М.: Реафарм, 2004.
2. *Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г.* Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 248 с., 2007.
3. *Anderson G.D.* Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach // *Clin. Pharmacokinet.* – 44(10):989-1008, 2005.
4. *Bernier F., Leblanc G., Labrie F. et al.* The structure of human estrogen and aryl sulphotransferase gene: two mRNA species issued from a single gene // *J. Biol. Chem.* – 269: 28200-5, 1994.
5. *Briggs G.G., Freeman R.K., Yaffe S.J.* A reference guide to fetal and neonatal risk. Drugs in pregnancy and lactation. Seventh Edition – *Lippincott Williams & Wilkins.* – Philadelphia, 2005.

6. Burchell B., Coughtrie M., Jackson M. et al. Development of human liver UDP-glucuronosyltransferase // *Dev. Pharmacol. Ther.* —13: 70-7, 1998.
7. Cappiello M., Giuliani L., Rane A. et al. Dopamine sulphotransferase is better developed than p-nitrophenol sulphotransferase in human fetus // *Dev. Pharmacol. Ther.*, 83-8, 1991.
8. Collier A.C., Tingle M.D., Keelan J.A. et al. A highly sensitive fluorescent microplate method for the determination of UDP-glucuronosyltransferase activity in tissues and placental cell lines // *Drug Metab. Dispos.*, 28: 1184-6, 2000.
9. Collier A.C., Ganley N.A., Tingle M.D. et al. UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term // *Biochem. Pharmacol.*, 63: 409-19, 2002.
10. Collier A.C., Tingle M.D., Paxton J.W. et al. Metabolizing enzyme localisation and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption // *Hum. Reprod.*, 17:2564-72, 2002.
11. Ganley N. The expression and localisation of uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B subfamily in human placenta tissue [M.Sc. thesis]. — *Auckland: University of Auckland*, 2001.
12. Gilham D.E., Cairns W., Paine M.I.J. et al. Metabolism of MPTP by cytochrome P4502D6 and the demonstration of 2D6 mRNA in human foetal and adult brain by in situ hybridization // *Xenobiotica*, 27: 111-25, 1997.
13. Glatt H., Boeing H., Engelke C.E. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects // *Mutat. Res.*, 482: 27-40, 2001.
14. Gu J., Su T., Chen Y. et al. Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: Potential roles in developmental toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165: 158-162, 2000.
15. Gurtoo H.L., Williams C.I., Gottlieb K. et al. Population distribution of benzo(a)pyrene metabolism in smokers // *Int. J. Cancer*, 31: 385-95, 1983.
16. Hakkola J., Pasanen M., Hukkanen J. et al. Expression of xenobiotic-metabolising cytochrome-P450 forms in human full-term placenta // *Biochem. Pharmacol.*, 51: 403-11, 1996.
17. Hakkola J., Raunio H., Purkunen R. et al. Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy // *Biochem. Pharmacol.*, 52:379-83, 1996.
18. Hakkola J., Pasanen M., Pelkonen O. et al. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah-receptor ligands in human placenta and cultured cells // *Carcinogenesis*, 18:391-7, 1997.
19. Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J. et al. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9:29-42, 2000.
20. Hincal F. Effects of exposure to air pollution and smoking on the placental aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity // *Arch. Environ. Health*, 41:377-83, 1986.
21. Hines R.N., McCarver D.G. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, February 1, 300(2):355-360, 2002.
22. Koskela S., Hakkola J., Hukkanen J. et al. Expression of CYP2A genes in human liver and extrahepatic tissues // *Biochem Pharmacol.*, 57:1407-13, 1999.
23. Koukouritaki S.B., Simpson P., Yeung C.K. et al. Human hepatic flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression // *Pediatr. Res.*, 50: 1-7, 2002.
24. Koukouritaki S.B., Manro J.R., Marsh S.A. et al. Developmental Expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308:965-974, 2004.
25. Ladona M.G., Lindström B., Thyr C. et al. Differential foetal development of the O- and N-demethylation of codeine and dextromethorphan in man // *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 32:295-302, 1991.
26. Mackenzie P., Owens I., Burchell B. et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence // *Pharmacogenetics*, 7:255-69, 1997.
27. McCarver D.G., Hines R.N. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, February 1, 300(2):361-66, 2002.
28. McRobie D.J., Glover D.D., Tracey T.S. Effects of gestational and overt diabetes on human

- placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase // *Drug Meta.b Dispos.*, 26:367-71, 1998.
29. Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J. et al. The P450 superfamily update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature // *DNA Cell Biol.*, 12:1-51, 1993.
  30. Omiecinski C.J., Redlich C.A., Costa P. Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction // *Cancer Res.*, 50:4315-432, 1990.
  31. Omiecinski C.J., Aicher L., Swenson L. Developmental expression of human microsomal epoxide hydrolase // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 269:417-23, 1994.
  32. Paakki P., Stockmann H., Kantola M. et al. Maternal drug abuse and human term placental xenobiotic and steroid metabolising enzymes *in vitro* // *Environ. Health Perspect.*, 108:141-5, 2000.
  33. Pacifici G.M., Rane A. Glutathione S-transferase in the human placenta at different stages in pregnancy // *Drug Metab. Dispos.*, 9:472-5, 1981.
  34. Pacifici G.M., Rane A. Epoxide hydroxylase in human placenta at different stages in pregnancy // *Dev. Pharmacol. Ther.*, 6: 83-93, 1983.
  35. Pacifici G.M., Bencini C., Rane A. Acetyltransferases in humans: development and tissue distribution // *Pharmacology*, 32:283-91, 1986.
  36. Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics // *In Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Klaassen C.D. ed.)*, pp. 113-186, McGraw-Hill, New York: 1996.
  37. Pasanen M., Pelkonen O. Xenobiotic and steroid-metabolising monooxygenases catalysed by cytochrome P450 and glutathione S-transferase conjugations in the human placenta and their relationships to maternal cigarette smoking // *Placenta*, 11:75-85, 1990.
  38. Pasanen M., Pelkonen O. The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta // *Crit. Rev. Toxicol.*, 24:211-29, 1994.
  39. Pasanen M., Helin-Martikainen R.L., Pelkonen O. et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy impairs the activity of human placental xenobiotic and steroid metabolising enzymes *in vitro* // *Placenta*, 18:37-41, 1997.
  40. Pasanen M. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 38:81-97, 1999.
  41. Pelkonen O., Vähäkangas K., Kärki N.T. et al. Genetic and environmental regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase in man: studies with liver, lung, placenta, and lymphocytes // *Toxicol. Pathol.*, 12:256-60, 1984.
  42. Pelkonen O., Arvela P., Kärki N.T. 3,4-benzo(a)pyrene and N-methylalanine metabolising enzymes in the immature human fetus and placenta // *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 30:385-95, 1971.
  43. Pelkonen O., Jouppila P., Kärki N.T. Effect of maternal cigarette smoking in 3,4-benzo(a)pyrene and N-methylalanine metabolism in human fetal liver and placenta // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23:29-37, 1972.
  44. Price N.T., Jakson V.N., Halestrap A.P. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past // *Biochem. J.*, 329:321-8, 1998.
  45. Rasheed A., Hines R.N., McCarver D.G. Variation in human placental CYP2E1: potential risk factor for growth retardation associated with intrauterine alcohol exposure // *Alcoholism*, 21(3):53, 1997.
  46. Ratge D., Kohse K.P., Steegmuller U. et al. Distribution of free and conjugated catecholamines between plasma, platelets and erythrocytes: different effects of intravenous and oral catecholamine administration // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257:232-8, 1991.
  47. Scarborough P.E., Ma J., Qu W., Zeldin D.C. P450 subfamily CYP2J and their role in the bioactivation of arachidonic acid in extrahepatic tissues // *Drug Metab. Rev.*, 31:205-234, 1999.
  48. Schenker S., Yang Y., Mattiuz E. et al. Olanzapine transfer by human placenta // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26:691-7, 1999.
  49. Shao J., Stapleton P.L., Lin Y.S., Gallagher E.P. Cytochrome P450 and glutathione S-transferase mRNA expression in human fetal liver hematopoietic stem cells // *Drug Metab. Dispos.*, 35(1):168-75, 2007.
  50. Shiverick K.T., Salafia C. Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects // *Placenta*, 20:265-72, 1999.
  51. Sodha R.J., Glover V., Sandler M. Phenol-sulphotransferase in human placenta // *Biochem. Pharmacol.*, 32:1655-7, 1983.

52. *Sodha R.J., Schneider H.* Sulphate conjugation of beta2-adrenoceptor stimulating drugs by platelet and placental phenol sulphotransferase // *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 17:106-8, 1984.
53. *Sonnier M., Cresteil T.* Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver // *Eur. J. Biochem.*, 251:893-98, 1998.
54. *Shimada T., Yamazaki H., Mimura M. et al.* Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs // *Drug Metab. Dispos.*, 24:515-22, 1996.
55. *Stevens J.C.* New perspectives on the impact of cytochrome P450 3A expression for pediatric pharmacology // *Drug Discov. Today*, May; 11(9-10):440-5, 2006.
56. *Strange R.C., Howie A.F., Hume R. et al.* The developmental expression of alpha-, mu- and pi-class glutathione S-transferases in human liver // *Biochim. Biophys. Acta*, 993:186-90, 1989.
57. *Syme M.R., Paxton J.W., Keelan J.A.* Drug transfer and metabolism by the human placenta // *Clin. Pharmacokinet.*, 43 (8):487-514, 2004.
58. *Treluyer J.-M., Jacqz-Aigrain E., Alvarez F., Cresteil T.* Expression of CYP2D6 in developing human liver // *Eur. J. Biochem.*, 202:583-88, 1991.
59. *van Lieshout E.M., Knapen M.F., Lange W.P. et al.* Localization of glutathione S-transferases alpha and pi in human embryonic tissues at 8 weeks gestational age // *Hum. Reprod.*, 13:1380-6, 1998.
60. *Vieira I., Pasanen M., Raunio H. et al.* Expression of CYP2E1 in human lung and kidney during development and in full-term placenta: a differential methylation of the gene is involved in the regulation process // *Pharmacol. Toxicol.*, 83:183-7, 1998.
61. *Ward R.M.* Drug therapy of the fetus // *J. Clin. Pharmacol.*, 33:780-9, 1993.
62. *Wu S., Moomaw C.R., Tomer K.B. et al.* Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart // *J. Biol. Chem.*, 271:3460-8, 1996.
63. *Yang H.-Y.L., Namkung M.J., Juchau M.R.* Expression of functional cytochrome P4501A1 in human embryonic hepatic tissues during organogenesis // *Biochem. Pharmacol.*, 49:717-26, 1995.

## PARTICULARITIES OF HUMAN DRUG-METABOLIZING SYSTEM IN FETOPLACENTAL COMPLEX

E.A. Sokova

*Institute of Clinical Pharmacology FGE «NCESMP» Roszdravnadzor, Moscow*

This review summarizes our current understanding of phase I, II drug-metabolizing enzymes developmental expression in the human, highlights areas of further study, and also discusses molecular mechanisms likely responsible for developmental and tissue-specific expression patterns of both phase I and phase II enzymes in fetoplacental complex. Obviously, the effective and safe drug therapy during pregnancy requires a thorough knowledge of human drug-metabolizing system development in fetoplacental complex.

**Key words:** pregnancy, fetus, placenta, biotransformation, drug, cytochrom P450, drug-metabolizing enzymes.



## БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

### Мононуклеарная фракция клеток костного мозга мышей линии B10.GFP нормализует углеводный обмен у мышей линии C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> с моделью сахарного диабета II типа

О.И.Степанова, Н.А.Онищенко\*, Э.Х.Абдрашитова, Е.А.Степанова\*,  
Л.А.Конопленко, Т.В.Галахова, Т.Б.Бескова, В.А.Зайденов\*, Х.Х.Семенов

*Научный Центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

*\*ФГУ НИИ Трансплантологии и искусственных органов Росздрава, Москва*

Цель нашего исследования заключается в восстановлении нарушенных рецептор–зависимых взаимодействий и коррекции иммунного дисбаланса у мышей линии C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> с моделью сахарного диабета II типа. Для получения терапевтического эффекта применялась мононуклеарная фракция клеток костного мозга (ККМ) от здоровых доноров. Донорами ККМ служили мыши линии B10.GFP с геном зеленого белка. ККМ этих мышей использовали не только для коррекции СД, но и как маркеры для выявления присутствия трансплантированных клеток в организме реципиентов. ККМ доноров вводили однократно либо в хвостовую вену в количестве 1,5 млн., либо внутрибрюшинно в количестве 4,5–5 млн. По результатам нашего исследования был получен регресс клинических проявлений сахарного диабета у мышей db/db за счет регуляции иммунитета и торможения признаков системной воспалительной реакции. Был достигнут продолжительный терапевтический эффект в коррекции СД у реципиентов при введении большей дозы. Установлено, что большая доза ГККМ, введенная внутрибрюшинно, способна, пролонгированно снижать в крови содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина, при этом было отмечено отсутствие мацерации кожных покровов, снижение аппетита и частоты мочеиспускания, исчезновение полиурии. Однако введение большей дозы удерживало снижение углеводного обмена только в течение двух месяцев.

**Ключевые слова:** сахарный диабет II типа, стволовые клетки костного мозга, мононуклеарная фракция, регенерация, реципиент, трансплантация.

Сахарный диабет (СД) является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, приводящих к глубокой инвалидизации и гибели людей трудоспособного возраста, как в экономически развитых, так и в развивающихся странах. По статистике ВОЗ, в 2002 году в мире насчитывалось около 151 млн. человек, больных СД I и II типа, причем по прогнозам ВОЗ численность таких больных к 2010 году достигнет 221 млн., а к 2020 году — 300 млн. человек. Полагают, что особенно выраженный рост заболеваемости СД в наступающем тысячелетии будет иметь СД II типа в

связи с прогрессирующим эпидемическим распространением в человеческой популяции факторов, предрасполагающих к его развитию: атеросклероза, проатерогенных метаболических синдромов и эндокринных нарушений [17].

По данным эпидемиологического исследования ЭПОХА–ХСН [11], в Европейской части России в 2002 г. насчитывалось более 4,2 млн. больных СД II типа, а к 2010 г. их численность достигнет 6,6 млн. человек.

Несмотря на определенные достижения последних лет, современная медикаментозная терапия СД по-прежнему не способна

надежно препятствовать возникновению и прогрессированию клинических проявлений СД и его осложнений. Поэтому поиск и разработка новых подходов к лечению СД остается актуальной проблемой современной медицины (диабетологии, терапии и кардиологии) [3, 11, 12].

Успехи клеточной биологии последних десятилетий создали научные и практические предпосылки для развития новой области медицины — клеточной трансплантации. Благодаря трансплантации фетальных островковых клеток поджелудочной железы появилась возможность возмещения у больных СД I типа отсутствующих клонов специализированных бета-клеток, а также активизации в сохранившихся клетках органа собственного резерва регенерации и пролиферации [15, 18, 19]. Из-за этических и правовых проблем получения аллогенного фетального донорского материала для клеточной терапии стали использовать преимущественно ксеногенный фетальный и неонатальный донорский материал. Однако ксеногенный донорский материал используют в клинической практике ограниченно из-за опасности переноса инфекции и развития аллергических реакций. С разработкой учения о стволовых клетках появилась возможность более эффективной регуляции липидного и углеводного обмена в организме с помощью стволовых клеток костного мозга [4, 7, 8, 10, 13, 25, 26, 27]. Применение стволовых клеток костного мозга может оказаться особенно перспективным для лечения СД II типа, при котором инсулинорезистентная гипергликемия обусловлена конформационным изменением структуры мембран клеток, в условиях дислипидемии и эндокринных расстройств. Можно считать, что коррекция мембранной патологии должна стать главным направлением регуляции углеводного обмена при лечении СД II типа [3, 5].

СД II типа, как любая хроническая патология, развивается в организме на фоне

прогрессирующей дисфункции иммунной системы, сопровождающейся нарушением цитокиновой и пептидной регуляции межклеточных и надклеточно-внутриклеточных взаимодействий, т.е. нарушением информационных механизмов клеточной адаптации и регенерации [6, 16, 17].

В этой связи, для лечения СД II типа представляется наиболее перспективным использование мононуклеарной гемопоэтической фракции гемопоэтических стволовых клеток костного мозга содержит значительное количество прогениторных клеток, лимфоидного ряда различной степени зрелости. Эти клетки способны не только мигрировать, но и, профилируя, индуцировать регенерацию клеток, поврежденных паренхиматозных органов, выделяя в процессе своей жизнедеятельности регуляторные пептиды и факторы репаративной и физиологической регенерации, которые восполняют дефицит регуляционных и информационных сигналов [1, 2, 4, 9, 14].

**Целью** настоящего исследования является изучение возможности восстановления регуляции углеводного обмена в организме при СД II типа за счет нормализации иммунозависимых межклеточных и клеточно-внутриклеточных взаимодействий путем введения активных прогениторных клеток мононуклеарной фракции аллогенного КМ здоровых доноров.

#### **Материалы, методы и исследования**

Опыт проводили на мышах линии C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> (db//db) в возрасте 4 месяцев, у которых была создана генетическая модель СД II типа. Эти мыши несут рецессивный ген leptin receptor — LEPR<sup>db</sup> — (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома), который в гомозиготном состоянии вызывает диабет, обусловленный снижением рецептор-опосредованной чувствительности клеток организма к эндогенному инсулину. В результате развивается гипергликемия, полиурия, глюкозурия, дегрануляция бета-клеток в островках поджелудоч-

ной железы и аномальное ожирение. Следствием гипергликемии является развитие микроангиопатий, активация системной воспалительной реакции и развитие иммунного дисбаланса, который усугубляет рецептор-зависимые нарушения в организме.

Для восстановления нарушенных рецептор-зависимых взаимодействий и коррекции иммунного дисбаланса у мышей-реципиентов нами была использована моноклеарная фракция клеток костного мозга (ККМ) здоровых доноров.

Донорами ККМ служили четырехмесячные трансгенные мыши линии B10.GFP с геном зеленого белка. Мыши B.10GFP получены от скрещивания мышей C57BL/10SnY и мышей линии C57BL/6-TgN (ACTbEGFP)1Osb-Jackson Laboratory. ККМ этих мышей использовали для коррекции клинических проявлений СД и выявления присутствия трансплантированных ККМ в организме реципиентов.

Забор клеток костного мозга проводили у мышей посмертно. Иссекали бедренную кость вместе с суставами и очищали их от мышц. Далее кость обрабатывали в 70%-ом спирте, вскрывали суставы и с помощью шприца вымывали ККМ раствором Хенкса (без  $Ca^{+2}$  и  $Mg^{+2}$ ). Выделенную суспензию клеток центрифугировали вместе с Ficoll-P (плотность 1,077) для градиентного разделения в течение 5 мин при 1500 об/мин и температуре 22 °С. Полученную интерфазу клеток моноклеарной фракции ресуспендировали в питательной среде DMEM и повторно центрифугировали в течение 5 мин. при 1500 об/мин. Удаляли надосадочную жидкость путем отсасывания, а клеточный осадок, содержащий гемопоэтические и стромальные ККМ, ресуспендировали в ростовой среде DMEM, содержащей 25мМ NEPES, 0,58 г/л глутамина, 100 мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали в 6-луночных плашках при +37 °С в  $CO_2$ -инкубаторе, атмосфере с 5%  $CO_2$  и 95% влажности в течение 3 суток. Подсчет

очищенных донорских гемопоэтических клеток костного мозга (ГККМ) проводили на 3 день инкубации перед введением их реципиентам (рис. 1).

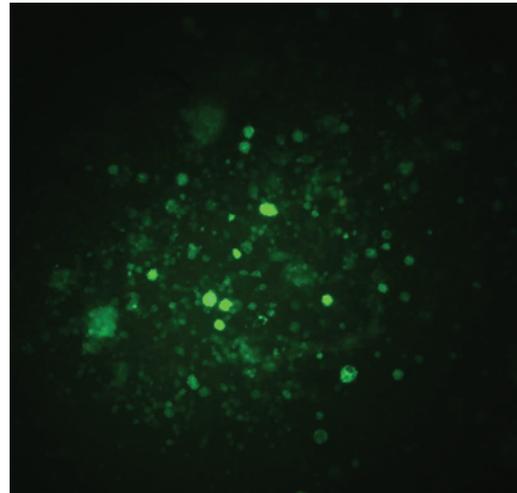


Рис. 1. Трехсуточная культура моноклеарных ККМ мышей доноров B10.GFP с геном зеленого белка в ростовой среде: а – люминисцентная микроскопия; б – фазоконтрастная микроскопия (ув.  $\times 100$ ).

ГККМ вводили однократно либо в хвостовую вену в количестве 1,5 млн. клеток, либо внутривенно в количестве 4,5-5 млн. клеток

У мышей db/db – реципиентов и контрольной группы (без введения клеток КМ) измеряли вес, содержание глюкозы, глико-

зилированного гемоглобина и показатели липидного обмена в цельной крови. Все биохимические исследования крови проводили после голодной диеты длительностью от 16 часов и более. Глюкозу определяли с помощью стандартных тест-полосок на глюкометре Ассу-СНЕК (Швейцария). Содержание гликированного гемоглобина определяли на приборе Nycocard REDER II (ФРГ) методом боратного аффинного анализа. Уровень общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и низкой плотности (ЛПНП) в цельной крови определяли на приборе Cholestech LrDx (США), работающего по принципу фотометрии в отраженном свете (измеряли количество света, отраженного от реакционной поверхности).

Результаты клеточной терапии оценивали по отклонению фактического значения содержания глюкозы от исходного (в процентах), вычислением линий тренда в программе MS Excel по методу наименьших квадратов, были получены два уравнения для линий тренда:

$$y_1 = 0,0001x^4 - 0,0171x^3 + 0,6627x^2 - 8,5905x + 14,345; R^2 = 0,5327$$

при введении меньшей дозы 1,5 млн. ККМ;

$$y_2 = 0,00007x^4 - 0,00811x^3 + 0,34657x^2 - 6,24940x + 9,53191; R^2 = 0,45382$$

при введении большей дозы 4,5-5 млн. ККМ, где  $R^2$  – коэффициенты достоверности аппроксимации.

Об изменении состояния иммунной системы в контрольной и опытной группах судили по динамике морфологических изменений в селезенке при окраске гематоксилин–эозином, в печени – по окраске на жир Суданом III.

Статистическую обработку результатов измерения липидного профиля, гликозилированного гемоглобина и веса животных контрольной и опытной групп производили с использованием статистического пакета Biostat; для определения достоверности различий между сравниваемыми группами использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферони. Различия считали достоверным при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Из рис. 2 видно, что содержание глюкозы у реципиентов после применения клеточной терапии снизилось на 16-й день после трансплантации с 17,3 ммоль/л до 9,0 ммоль/л при введении 1,5 млн. клеток и с 30,9 ммоль/л до 11,2 ммоль/л при введении 4,5-5 млн. клеток.

Было отмечено, что уровень глюкозы у мышей-реципиентов при внутрибрюшинном введении большей дозы ГККМ про-

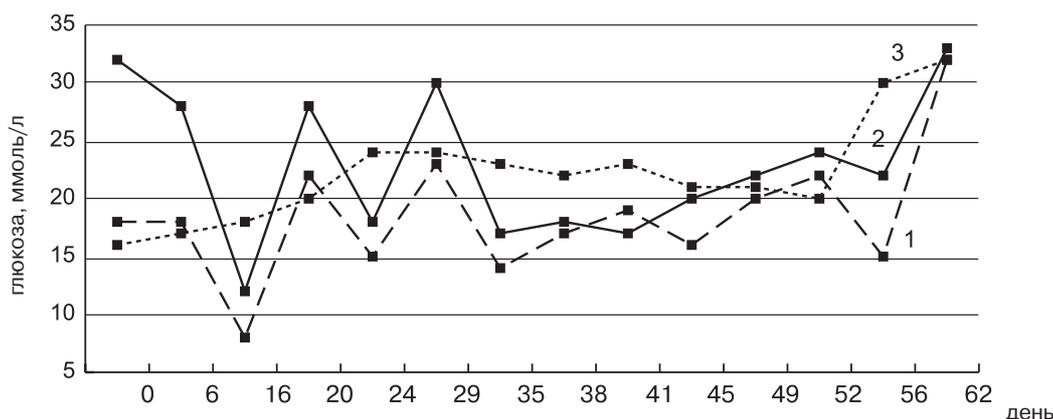


Рис. 2. Динамика изменения уровня глюкозы у мышей с СД II типа: 1 – в/в 1,5 млн. и 2 – 4,5 млн. (на фоне введения ККМ); 3 – контроль

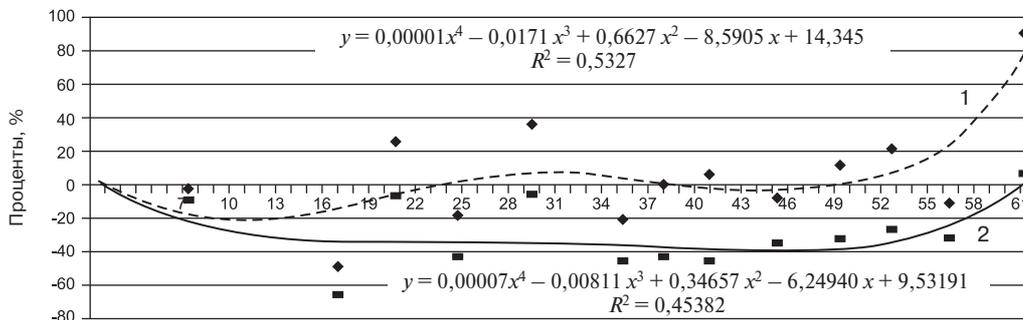


Рис. 3. Линии тренда снижения уровня глюкозы у мышей на фоне введения ККМ (1 – в/в 1,5 млн. и 2 – в/б 4,5 млн.)

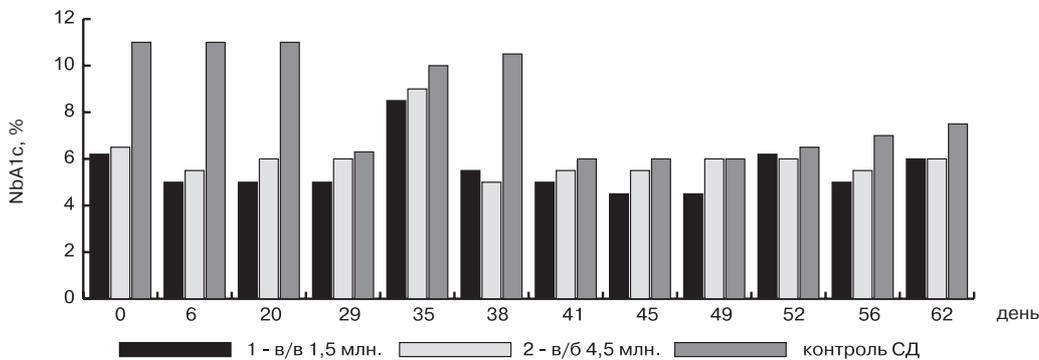


Рис. 4. Изменения содержания гликозилированного гемоглобина у мышей с СД II типа на фоне введения ККМ и без введения клеток, где  $p_{1,2} < 0,05$ ;  $p_{1,3} < 0,05$ ;  $p_{2,3} < 0,05$

лонгированно снижался до 56-го дня; при внутривенном введении меньшей дозы снижение уровня глюкозы наблюдали лишь до 35-го дня.

Рассчитанные линии тренда и коэффициенты достоверности аппроксимации  $R^2$  свидетельствуют о том, что при введении большей дозы донорских клеток имеет место более выраженный терапевтический эффект снижения глюкозы, чем при введении меньшей дозы клеток (рис. 3).

Исследование содержания гликозилированного гемоглобина у экспериментальных животных после введения ГККМ показало, что с 38-го дня его уровень снизился с 6,4% до 5,5% при введении меньшей дозы клеток и с 6,5% до 5,3% при введении большей дозы. При этом уровень ГККМ удерживался в пределах нормы до конца эк-

сперимента (62 дня), в контрольной группе этот показатель составил 10% (рис. 4).

За период исследования отмечено, что в контрольной группе мышей вес неуклонно увеличивался, тогда как в экспериментальной группе животных при введении большей дозы ККМ за аналогичный период вес не изменялся. В той группе экспериментальных животных, где доза вводимых донорских клеток была меньшей, снижение веса наблюдали только в течение 24 дней, затем вес увеличился (это видно из рис. 5).

В группах мышей, получивших терапию ГККМ, было отмечено также отсутствие мацерации кожных покровов в области холки и снижение диуреза у реципиентов (отсутствие влажных опилок с аммиачным запахом), тогда как все эти признаки наблюдались в контрольной группе.

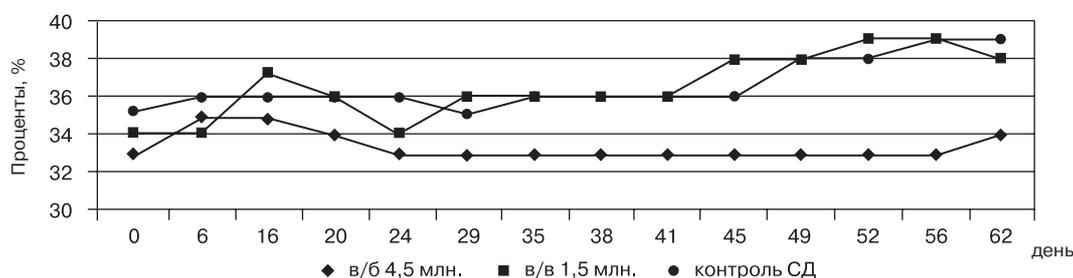


Рис. 5. Динамика изменения веса мышей с СД II типа на фоне введения ККМ и без введения клеток, где  $p_{1,2} < 0,05$ ;  $p_{1,3} < 0,05$ ;  $p_{2,3} < 0,05$

При исследовании липидного профиля у мышей линии C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> (гомо- и гетерозиготных), а также у мышей линии C57BL/10 выявлено, что уровень общего холестерина, триглицеридов, ЛПВП и ЛПНП не изменялся по мере увеличения сроков наблюдения, оставаясь таким же, как у здоровых мышей (см. табл. 1).

Нормальные значения показателей липидного обмена в крови у контрольных мышей db/db не доказывают отсутствия нарушений жирового обмена у этих животных. Гистологическое исследование печени, выполненное нами на 75-е сутки от начала эксперимента, позволило установить резко выраженную жировую дистрофию ткани печени мышей с СД II типа в контрольной группе и полное отсутствие признаков жировой дистрофии печени при введении ГККМ мышам с СД II типа. Полученные данные позволяют нам высказать предположение, что у мышей db/db имеют место нарушения не только углеводно-

го, но и жирового обмена; отсутствие сдвигов в исследуемых параметрах липидов крови у мышей СД II типа следует, очевидно, рассматривать как результат участия печени в адаптационно-приспособительных реакциях организма, обеспечивающей поглощение липидов из циркулирующей крови и поддержание жизненно важных параметров метаболизма липидов в физиологически допустимых пределах. Следствием этого является развитие жировой дистрофии печени. Введение ГККМ, очевидно, активизирует работу адаптационных механизмов у мышей с СД II типа и нормализует жировой обмен, увеличивая клиренс липидов печени из организма.

Поскольку под влиянием ГККМ в большей дозе (4,5-5 млн. клеток) нормализация углеводного обмена поддерживалась более 60 дней, нам предстояло ответить на вопрос: связано ли это с сохраняющейся жизнедеятельностью трансплантированных клеток? Было установлено, что в криосре-

Таблица 1

Средние значения липидного профиля разных линий мышей

Линия мышей	Возраст (мес.)	Общий холестерин (ммоль/л (ХС))	ЛПВП, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л (ТГ)	ЛПНП, ммоль/л
C57BL/KsLEPR <sup>db/db</sup> гомозиготы	2-6	3,23±0,41*	1,54±0,53*	0,74±0,19*	1,14±0,56**
C57BL/KsLEPR <sup>db/+</sup> гетерозиготы	2-6	3,02±0,29*	1,24±0,40*	0,89±0,27*	1,16±0,58**
C57BL/10	2-6	2,98±0,28*	1,96±0,38*	0,75±0,26**	0,7±0,35**

\* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p > 0,05$

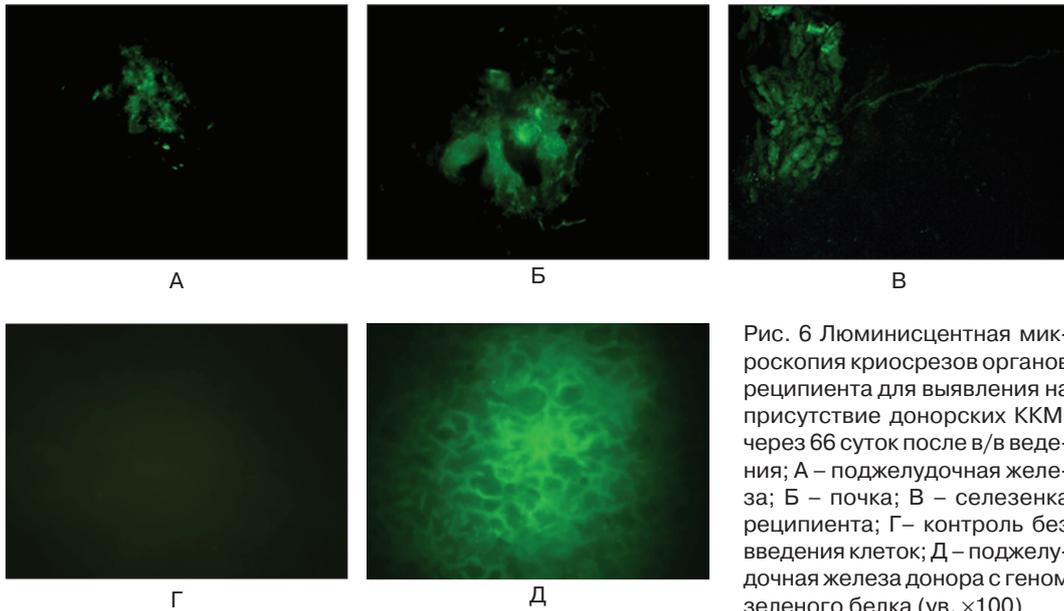


Рис. 6 Люминисцентная микроскопия криосрезов органов реципиента для выявления на присутствие донорских ККМ, через 66 суток после в/в введения; А – поджелудочная железа; Б – почка; В – селезенка реципиента; Г – контроль без введения клеток; Д – поджелудочная железа донора с геном зеленого белка (ув.  $\times 100$ )

зах из органов, исследованных на 66-е сутки после в/в введения ГККМ, эти клетки не погибают, а сохраняют свою жизнедеятельность, мигрируя в разные органы, в том числе в поджелудочную железу и селезенку, стимулируя участие этих органов в регенерации. Так как донорами клеток были мыши B10.GFP с геном зеленого белка, выявить эти клетки при люминисцентной микроскопии не составило особого труда (рис. 6).

Поскольку известно, что СД II типа развивается и прогрессирует в условиях иммунной дисрегуляции иммунодефицита, представлялось важным оценить состояние иммунитета в организме мышей с СД II типа и динамику его изменений под влиянием клеточной терапии. Из рис. 7 видно, что при СД II типа в селезенке развивается явление гиперплазии и исчезает рисунок фолликулов по сравнению со здоровыми мышами (рис. 7 А и Б). Под действием ГККМ в ткани селезенки формируются крупные лимфоидные фолликулы (рис. 7 В), наблюдается интенсивная бластотрансформация (рис. 7 Г) лимфоидных клеток в селезенке, что свидетельствует о восста-

новлении структуры селезенки как иммунокомпетентного органа и восстановления ее иммунорегуляторной активности.

По результатам проведенного нами исследования можно сделать вывод, что регресс клинических проявлений сахарного диабета у мышей db/db происходит за счет активизации механизмов регуляции иммунитета, повышающего возможности адаптивно-приспособительных реакций. Продолжительный терапевтический эффект, заключающийся в коррекции показателей углеводного обмена у животных с СД II типа, был достигнут при введении ГККМ в количестве 4,5-5 млн., а не при введении 1,5 млн. клеток. Между тем даже введение большей дозы стабилизировало показатель углеводного обмена на сниженном уровне только в течение 2 месяцев.

Очевидно, что для получения долговременного терапевтического эффекта необходимо, чтобы масса биологической активности донорского материала была не просто большой, но и чтобы ее было достаточно для продуцирования собственного резерва регенерации поврежденного органа [19, 21, 22, 23, 24]. Мы полагаем, что для

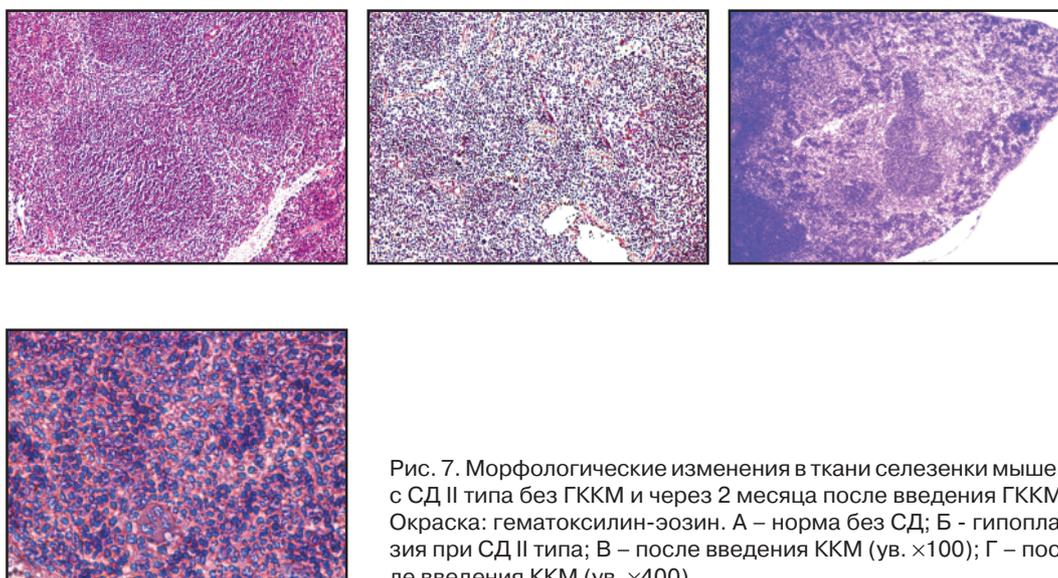


Рис. 7. Морфологические изменения в ткани селезенки мышей с СД II типа без ГКМ и через 2 месяца после введения ГКМ. Окраска: гематоксилин-эозин. А – норма без СД; Б - гипоплазия при СД II типа; В – после введения ККМ (ув.  $\times 100$ ); Г – после введения ККМ (ув.  $\times 400$ )

получения стабильного и выраженного терапевтического эффекта необходимо проводить многократные введения КМ и общая доза клеток должна быть оптимальной для стимуляции собственного резерва регенерации.

Также в ходе исследовательской работы нами была проведена проверка на гистосовместимость мышей для определения вида трансплантации. Проверка на гисто-

совместимость мышей линий db//db и B10.GFP проводилась методом реципрокной изотрансплантации кожи. Всего было использовано 9 животных (две группы из 3 самцов и 6 самок) в возрасте 2-3 месяцев. Результаты, приведенные в табл. 2., говорят об отсутствии гистосовместимости, так как трансплантаты, пересаженные с одной линии на другую, отторгаются по типу острой реакции (срок наблюдения – 2 месяца).

Таблица 2

Результаты проверки на гистосовместимость мышей BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> и B10.GFP

Линия, донор	Линия, реципиент	Количество трансплантатов	Прижилось	Отторглось по типу острой реакции	Отторглось по техническим причинам *
B10.GFP	BL/KsLEPR <sup>db/+</sup>	12	0	10	2
BL/KsLEPR <sup>db/+</sup>	B10.GFP	6	0	6	0
BL/KsLEPR <sup>db/+</sup>	BL/KsLEPR <sup>db/+</sup>	8	5	0	3

\* – животные генотипа db//db после снятия повязки усиленно чешутся, видимо испытывая сильный зуд и срывают ещё не вполне прижившиеся трансплантаты, особенно расположенные латеральнее (более доступные). Оставлять же повязку на более длительный срок нецелесообразно, так как отторжение в ряде случаев начинается уже с 8-го дня. Была разработана особая повязка с прозрачным пластиковым окошком, надеваемая после снятия обычной. Однако ввиду относительной сложности ее изготовления она не может быть применена массово.

Введение ККМ от мышей-доноров B10.GFP мышам-реципиентам BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> это – аллотрансплантация.

### Выводы

- Модель СД II типа на мышах линии C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> является адекватной моделью для изучения эффектов клеточной терапии, так как она воспроизводит нарушения углеводного и липидного обмена и моделирует дисфункцию иммунной системы.
- Бóльшая доза (4,5-5 млн. клеток) мононуклеарной фракции ККМ, содержащая большее количество прогениторных клеток с высокой биорегуляторной активностью, при внутрибрюшинном введении способна пролонгированно снижать содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина в крови и вес животного, то есть имеет более выраженный терапевтический эффект, чем меньшая доза ГККМ (1,5 млн.) введенная внутривенно.
- Нормализация углеводного обмена имеет параллелизм с нормализацией регуляторных функций иммунной системы.
- Мононуклеарная фракция ККМ от мышей линии B10.GFP может быть использована для маркировки донорских клеток, а также для выявления путей миграции клеточных трансплантатов в организме реципиента и особенностей их взаимодействия с клетками окружающих тканей.
- Под влиянием мононуклеарной фракции ККМ донора B10.GFP с геном зеленого белка наблюдалась регенерация лимфоидных фолликулов в селезенке мышей-реципиентов. При этом происходит нормализация структуры и функции селезенки на фоне стабилизации клинических признаков у реципиента (снижение веса, уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина, исчезновение морфологических проявлений жировой дистрофии в печени реципи-

ента), что свидетельствует об отсутствии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) в организме реципиента при введении аллогенных ККМ.

*Авторы выражают признательность директору лаборатории Osb-Jackson А.В. Червонскому за мышей, любезно предоставленных нам для работы.*

### Литература

1. Бабаева А.Г. Единство и противоположность цитогенетической активности лимфоцитов и их антителообразующей функции при воспалительных процессах в органах // *Бюлл. exper. биол. мед.*, № 11, с. 484-490, 1999.
2. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. – М.: Медицина, 1985.
3. Балаболкин М.И. Сахарный диабет. – М.: Медицина, 1994.
4. Берсенева А.В., Крашенинников М.Е., Кобозева Л.П., Аврамов П.В. Клеточная и пептидная терапия ранних стадий атерогенеза // *Вестн. трансплантол. и искусств. органов*, № 3-4, с. 89-90, 2002.
5. Зайчик А.Ш., Гурилов Л.П. Инсулинонезависимый сахарный диабет (ИНСД) // *Основы патохимии*. – С-Пб: ЭЛБИ-СПБ, 2001.
6. Зотиков Е.А., Бабаева А.Г., Порешина Л.П. Клеточный химиризм и химиризм клетки при трансплантации костного мозга. – М.: Хризостом, 2003.
7. Кухарчук А.П., Радченко В.В., Сирман В.М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. – Киев: ООО КРС-Мед. технологии, 2004.
8. Лишук В.А. Жизнеспособность: принципы управления репарацией // *Валеология*, № 3, с. 4-9, 2000.
9. Лишук В.А., Мосткова Е.В. Механизмы самовосстановления // *Валеология*, № 2, с. 7-21, 2002.
10. Лишук В.А., Мосткова Е.В. Стволовые клетки: исследования и практика // *Валеология*, № 2, с. 4-16, 2003.
11. Мареев В.Ю., Беленков Ю.Н. Хроническая сердечная недостаточность и инсулиннезависимый диабет: случайная связь или закономерность? // *Тер. архив*, №10, с. 5-11, 2003.
12. Никишова М.С. Коррекция процессов перекисного окисления липидов у больных сахарным диабетом типа 2 при различных ви-

- дах лечения, включающих антиоксидантную терапию / Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2005.
13. Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. Современные представления о биологии стволовых клеток костного мозга и крови в аспекте их клинического применения // *Вестн. трансплантол. и искусств. органов*, № 4, с. 50-55, 2004.
  14. Онищенко Н.А. Пептидная биорегуляция восстановительных процессов в поврежденных органах // *Вестн. трансплантол. и искусств. органов*, № 3-4, с. 87-93, 2001.
  15. Онищенко Н.А. Инфузия регуляторных пептидов селезенки, трансплантация стволовых клеток костного мозга как два подхода к восстановительному лечению поврежденных органов // *Вестн. трансплантол. и искусств. органов*, № 3, с. 91-92, 2002.
  16. Хавинсон В.Х., Кветковой И.М. Пептидные биорегуляторы ингибируют апоптоз // *Бюлл. экспер. биол. мед.* Т.130, с. 657-659, 2000.
  17. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Южаков В.В. и др. Пептидергическая регуляция гемостаза. – СПб.: Наука, 2003.
  18. Шумаков В.И., Скалецкий Н.Н. Регуляция углеводного обмена и коррекция его нарушений при сахарном диабете // *Очерки по физиологическим проблемам трансплантологии и искусственных органов / Под ред. акад. В.И. Шумакова.* Тула: Репреникс, 1998.
  19. Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы. – М.: КАНОН, 1995.
  20. Эйдельман С. Перспективы диагностики и лечения сахарного диабета // *Эндокринология / под ред. Лавина М.: Практика, 1999.*
  21. Chen J., Sanberg P.R., Li Y. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficit after stroke in rats // *Stroke* 32, pp. 2682-2688, 2001.
  22. Ende N., Chen R., Redd A.S. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, pp. 168–171, 2004.
  23. Ende N. The Berashis cell: a review. Is it similar to the embryonic stem cell? // *J. Med.* 31, pp. 113–129, 2000.
  24. Ende N., Chen R., Mack R. NOD/LtJ type I diabetes in mice and the effect of stem cells derived from human umbilical cord blood // *J. Med.*, No 33, pp. 181-187, 2002.
  25. Hammad Samar M., Otvos James D., Lyons Timothy J. Lipoprotein subclass profiles of hyperlipidemic diabetic mice measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Metabolism.* Vol. 52, No 7, pp. 916-921, 2003.
  26. Hess D., Li L., Martin M., Sakano S. et al. Bone marrow – derived stem cells initiate pancreatic regeneration // *Nature Biotechnology.* Vol. 21, 7, 763-769, 2003.
  27. Morshead C.M., Benveniste P., Iscove N.N., van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations // *Nat. Med.* 8:268–273, 2002.

**MONONUCLEAR BONE MARROW FRACTION OF B10.GFP MICE NORMALIZES THE CARBOHYDRATE METABOLISM IN C57BL/KSLEPR<sup>DB/+</sup> MICE WITH DIABETES**

**O.I.Stepanova, N.A.Onischenko, E.Kh.Abdrashitova, E.A.Stepanova, L.A.Konoplenko, T.V.Galahova, T.B.Beskova, V.B.Zaidenov, H.H.Semenov**

*Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Scientific Research Institute of Transplantology and Artificial Organs, Moscow*

The aim of our study was to restore the immune imbalance in C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> mice with diabetes. We used transgenic B10.GFP mice as donors. Mononuclear bone marrow fraction (BMF) of B10.GFP mice was used for diabetes correction and detection of transplanted cells in recipients. Bone marrow cells (BMC) were injected (single dosing) intravenously or intraperitoneally. The regress of clinical implications was observed due to immune regulation and inhibition of inflammatory response. The prolonged therapeutic effect was achieved. It was noticed that BMC were able to reduce blood glucose level and appetite. The absence of polyuria and skin maceration were observed. However, the BMC injection normalized the carbohydrate metabolism within several months.

**Key words:** type II diabetes, bone marrow cells, mononuclear bone marrow fraction, recipient, transplantation.



## Влияние генотипа на экспрессию гена $Kit^{W-Y}$ в раннем эмбриогенезе у мышей линии WR

Н.Ю.Сахарова<sup>1,2</sup>, А.М.Малашенко<sup>2</sup>, А.А.Смирнов<sup>1</sup>, Ю.А.Ковалицкая<sup>3</sup>,  
Е.Ф.Вихлянцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

<sup>2</sup> Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

<sup>3</sup> Пущинский государственный университет

Исследовали влияние аллеля  $Kit^{W-Y}$  на репродуктивную способность и ранний эмбриогенез мышей линии WR. Было показано, что аллель  $Kit^{W-Y}$  несколько снижает фертильную способность самцов, но, по-видимому, не влияет на самок и на развитие доимплантационных эмбрионов *in vitro*. Замечено, что эмбрионы, полученные от скрещивания гетерозиготных мышей между собой, развиваются быстрее, чем контрольные. Гибель гомозиготных особей, о которой свидетельствует соотношение новорожденных детенышей, различающихся по фенотипу в основном происходит в постимплантационный период.

**Ключевые слова:** мутации *c-kit* гена, эмбриогенез мышей.

Нами было исследовано проявление аллеля  $Kit^{W-Y}(W^Y)$  мутации  $Kit^W$  (dominant spotting) *c-kit* гена в раннем эмбриональном развитии мышей линии WR. Эта линия была выведена в НИЛ биомоделей РАМН Светлые Горы (в настоящее время ГУ НЦБМТ) от скрещивания самок линии 129ReY(129), родственной линии 101/HY, и самца линии C57BL/6 (B6), гетерозиготного по мутантному гену  $W$  (dominant spotting Yurglovo) [12]. Современный символ этой мутации  $Kit^{W-Y}$ .

Линия WR высокочувствительна к кластогенному эффекту мутагенов (так же как линии 129 и 101) и характеризуется сильной депигментацией гетерозигот (по сравнению с линией B6), а также высокой долей гетерозиготных особей, имеющих черные пятна, т.е. участки с нормальной пигментацией волос. Причина высокой неустойчивости гена  $Kit^{W-Y}$  на генотипе WR неясна. Было высказано предположение, что ослабление экспрессии этого гена (ревер-

сия) может быть вызвано рекомбинацией, как это было показано для гена  $W^{ci}$ , где реверсии составляют 3% [13]. Однако это не может объяснить высокую частоту реверсий в случае гена  $Kit^{W-Y}$ , так как она обнаруживается у более чем 20% особей. Вероятно, гены-модификаторы эффекта гена  $Kit^{W-Y}$  линии WR унаследованы от линии 129, обладающей рядом необычных характеристик – склонностью к образованию тератом семенника, очень высокой радиорезистентностью [1], а также тем, что клетки внутренней клеточной массы бластоцисты у мышей этой линии являются наиболее пригодными для получения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши [15]. Линия 129 несет нонсенс-мутацию гена ДНК-полимеразы- $\beta$ , который экспрессируется только в клетках мозга, но абсолютно неэффективен в семенниках [3].

Линия WR поддерживается скрещиванием гетерозигот между собой. В каждом помете наблюдается расщепление, что

приводит к появлению сибсов генотипа  $+/Kit^{W-Y}$  ( $WR-+/W^Y$ ) и  $+/+$  ( $WR-+/+$ ). Они различаются по фенотипу. Мыши  $WR-+/+$  характеризуются черной окраской шерсти, а у мышей  $WR-+/Kit^{W-Y}$  наблюдается сильное ослабление пигментации с встречающимися черными пятнами (рис. 1, 2).

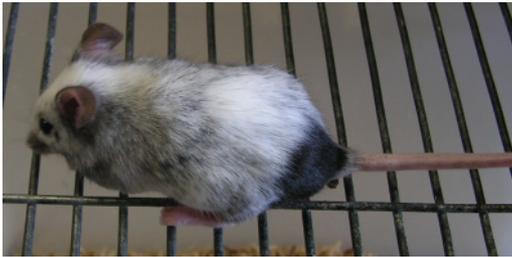


Рис. 1



Рис. 2

Мутация  $Kit^W$ , помимо того, что она изменяет окраску шерсти и нарушает кровотообразование, влияет на репродуктивные способности мышей. Многочисленные аллели этой мутации различаются по пенетрантности, экспрессивности и по мишеням своего действия [10]. Известно, что некоторые мутации, летальные для одних линий мышей, наносят лишь незначительные повреждения мышам, имеющим другой генотип [14]. Ранее мы исследовали проявление аллеля  $Kit^{W-Y}$  в доимплантационном развитии мышей линии C57BL/6JY. Было показано, что этот аллель отрицательно влияет на гаметогенез, оплодотворение и снижает жизнеспособность ранних эмбрионов в условиях *in vitro* [4].

**Целью** настоящей работы было исследование влияния генотипа WR на экспрес-

сию того же аллеля в доимплантационный период развития. Для определения жизнеспособности зародышей мышей в пренатальный период онтогенеза, несущих мутацию  $Kit^{W-Y}$  на генотипе WR, мы оценивали соотношение новорожденных детенышей, различающихся по фенотипу, состояние эмбрионального материала, находившегося в яйцеводах на 2-й день беременности, и развитие полученных зародышей *in vitro*.

### Материалы и методы

В опытах были использованы мыши линии WR/Y с генотипом  $aa, +/Kit^{W-Y}$ , различающиеся по фенотипу: черные с генотипом  $aa (+/+)$  и гетерозиготы  $+/Kit^{W-Y}$ , характеризующиеся ослабленной пигментацией. В первой серии опытов детенышей получали при различных вариантах скрещивания гетерозиготных мышей:  $(+/+ \times +/Kit^{W-Y})$ ,  $(+/Kit^{W-Y} \times +/+)$  и  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$ . Как только появлялась разница в окраске детенышей (в среднем, через неделю после рождения), подсчитывали количество детенышей разного фенотипа.

Во второй серии опытов исследовали соотношение развивающихся эмбрионов и неоплодотворенных или неразвивающихся после оплодотворения яйцеклеток, полученных при промывании яйцеводов самок на 2-й день после спаривания. В этой серии использовали следующие варианты скрещивания мышей:  $(+/+ \times +/Kit^{W-Y})$ ,  $(+/Kit^{W-Y} \times +/+)$ ,  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  и  $(+/+ \times +/+)$ .

В третьей серии опытов исследовали развитие *in vitro* 2-клеточных зародышей, полученных от скрещивания между собой гетерозиготных мышей  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  и мышей, несущих дикий аллель  $kit$ -гена  $(+/+ \times +/+)$ .

Для вымывания и культивирования эмбрионов использовали модифицированную среду Виттена [2]. Культивирование проводили при 37°C и 5% содержании  $CO_2$  в атмосфере в течение 72 ч. Каждые 24 ч

Таблица 1

**Расщепление по фенотипу в потомстве мышей, несущих аллель Kit<sup>W-Y</sup>**

Вид скрещивания	Количество новорожденных	Из них	
		+/Kit <sup>W-Y</sup>	+/+(WR)
+/+ × +/Kit <sup>W-Y</sup>	483	232 (с черным пятном – 20,6%)	251
+/Kit <sup>W-Y</sup> × +/+	204	99	105
+/Kit <sup>W-Y</sup> × +/Kit <sup>W-Y</sup>	161	107	54

определяли количество развивающихся зародышей и стадии, на которых они находились, с помощью инвертированного микроскопа МБИ-13 (Россия).

**Результаты и обсуждение**

**Первая серия. Расщепление по фенотипу детенышей, несущих аллель Kit<sup>W-Y</sup>**

Анализ полученных результатов, приведенных в табл. 1, показывает, что при скрещивании самок +/+ с самцами +/Kit<sup>W-Y</sup> детеныши с мутантной окраской составляют 58,3%, а с черной («дикий») – 41,7%; при скрещивании самок +/Kit<sup>W-Y</sup> с самцами +/+ – 48,0% и 52,0%, соответственно. При скрещивании гетерозиготных мышей между собой мутантные детеныши составляют 66,5% и «дикие» – 33,5%.

Таким образом, обратное скрещивание гетерозиготных мышей с «дикиими» независимо от того, кто был носителем мутации, самец или самка, приводит в потомстве к расщеплению по фенотипу в соотношении, близкому к 1:1 (1,0:1,08 и 1,0:1,1, соответственно). Это показывает, что все гетерозиготные особи выживают, т. е. в гетерозиготном состоянии исследуемая мутация не нарушает пренатального развития.

При скрещивании гетерозиготных мышей между собой – (+/Kit<sup>W-Y</sup> × +/Kit<sup>W-Y</sup>) соотношение мутантных и «диких» мышат составляет 1,98:1,0 (то есть, 2:1). Согласно закономер-

ностям менделевского расщепления, при выживании всего потомства следовало бы ожидать другого соотношения, а именно 3:1. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что одна четверть мышат, несущих мутантный ген, погибает в пренатальном периоде онтогенеза. Приведенные выше результаты обратного скрещивания говорят о том, что все гетерозиготные детеныши выживают. Следовательно, погибают до рождения только гомозиготные особи.

**Вторая серия. Состояние яйцеклеток на 2-й день после спаривания**

Как показывают наши данные (табл. 2), при всех вариантах скрещивания часть яйцеклеток в яйцеводах остается неоплодотворенной или после оплодотворения не приступает к дроблению и погибает на ста-

Таблица 2

**Состояние яйцеклеток на 2-й день после оплодотворения у мышей, несущих аллель Kit<sup>W-Y</sup>**

Вид скрещивания	Количество полученных яйцеклеток	Неразвившиеся яйцеклетки	
		Кол-во	%
+/+ × +/Kit <sup>W-Y</sup>	224	90*	40,2
+/Kit <sup>W-Y</sup> × +/+	142	44	30,1
+/Kit <sup>W-Y</sup> × +/Kit <sup>W-Y</sup>	140	54*	38,6
+/+ × +/+ (WR × WR)	211	58	27,5

\* Значения достоверны по отношению к контролю (WR × WR), p < 0,05

дии зиготы. Больше всего неразвивающихся яйцеклеток наблюдается при скрещивании самок  $+/+$  с самцами  $+/Kit^{W-Y}$  (40,2%) и гетерозиготных мышей между собой (38,6%). Эти значения достоверны по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ). При скрещивании самок  $+/Kit^{W-Y}$  с самцами  $+/+$  гибель яйцеклеток меньше и составляет 30,1%, что близко к показателю их гибели в случае скрещивания между собой мышей  $+/+$  (27,5%).

Эти результаты позволяют предположить, что мутация  $Kit^{W-Y}$  на генотипе WR в большей степени нарушает оплодотворяющую способность сперматозоидов, чем жизнеспособность яйцеклеток. Возможно, этим объясняется тот факт, что доля неразвивающихся яйцеклеток при скрещивании мутантных самцов как с мутантными, так и с «дикими» ( $+/+$ ) самками одинакова.

Результаты наблюдений зародышей, полученных из яйцеводов на 2-й день беременности представлены в табл. 3. Согласно литературным данным [6], в это время в яйцеводах зародыши находятся на стадии 2 бластомеров. Наши эксперименты показали, что большее количество полученных эмбрионов находилось на стадии 2 бластомеров, однако, часть зародышей была на стадиях 4 и 8 бластомеров.

В группах ( $+/+ \times +/Kit^{W-Y}$ ), ( $+/Kit^{W-Y} \times +/+$ ) и ( $+/+ \times +/+$ ) количество 2-клеточных зародышей было почти одинаковым – 90,3%, 86,7% и 85,7%. В группе ( $+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y}$ ) доля 2-клеточных зародышей составила 72,1% от общего количества развивающихся зародышей.

На стадии 4 бластомеров в группе ( $+/+ \times +/Kit^{W-Y}$ ) было 5,2% зародышей. В группах ( $+/Kit^{W-Y} \times +/+$ ) и ( $+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y}$ ) этот показатель составлял 10,2% и 11,6%. В контрольной группе ( $+/+ \times +/+$ ) на этой стадии находилось 14,4% зародышей.

На стадии 8 бластомеров больше всего оказалось зародышей в группе ( $+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y}$ ) – 16,3%, что достоверно выше по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ). В группах ( $+/+ \times +/Kit^{W-Y}$ ) и ( $+/Kit^{W-Y} \times +/+$ ) таких зародышей было гораздо меньше – 4,5% и 3,1%. В группе ( $+/+ \times +/+$ ) среди 153 зародышей был обнаружен лишь один 8-клеточный.

Эти данные показывают, что зародыши мышей линии WR на 2-й день после спаривания составляют гетерогенную группу. Часть зародышей по своему развитию явно опережают других. Проблема гетерохронии в период дробления детально обсуждена в нашей предыдущей работе, посвященной исследованию особенностей проявления аллелей  $Kit^{W-V}$  и  $Kit^{W-Y}$  в раннем эмбриогенезе.

Таблица 3

Распределение жизнеспособных зародышей по стадиям развития на 2-й день после оплодотворения

Вид скрещивания	Количество жизнеспособных зародышей	Стадия 2 бластомеров		Стадия 4 бластомеров		Стадия 8 бластомеров	
		Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
$+/+ \times +/Kit^{W-Y}$	134	121	90,3	7*	5,2	6*	4,5
$+/Kit^{W-Y} \times +/+$	98	85	86,7	10	10,2	3	3,1
$+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y}$	86	62*	72,1	10	11,6	14*	16,3
$+/+ \times +/+$ (WR $\times$ WR)	153	130	85	22	14,4	1	0,7

\* Значения достоверны по отношению к контролю (WR  $\times$  WR),  $p < 0,05$

незе мышей [7]. Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что эта особенность аллеля  $Kit^{W-Y}$  сохраняется и в раннем развитии мышей линии WR. Наибольшее количество зародышей (27,9%), опережающих в своем развитии остальных, было обнаружено в группе  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$ .

Следует отметить, что у зародышей в группе  $(+/+ \times +/+)$ , также обнаружена тенденция к более быстрому переходу на стадию 4 бластомеров (14,4% случаев). Можно предположить, что это связано с тем, что при создании линии WR была использована линия C57BL/6- $W^Y/+$  и, возможно, какая-то модификация аллеля  $Kit^{W-Y}$ , не влияющая на окраску шерсти, но определяющая временные параметры дробления, сохранилась в геноме мышей WR. Кроме того, исследование цитогенетического эффекта тиюТЭФ (химического мутагена) показало, что по чувствительности к тиюТЭФ мыши WR генотипов  $+/+$  и  $+/Kit^{W-Y}$  очень близки друг к другу. Было высказано предположение, что необычная чувствительность линии WR- $+/+$  связана с тем, что в процессе ее выведения были отобраны гомозиготы по генам, повышающим чувствительность к тиюТЭФ, унаследованным от линий 129 и B6 [5]. Возможно, что это родство определяет и общую тенденцию к более быстрому развитию. Оба высказанных предположения требуют дальнейшей проверки.

### Третья серия. Развитие *in vitro* 2-клеточных зародышей мышей линии WR

В этой серии были использованы зародыши, полученные от скрещивания между собой гетерозиготных мышей  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$ . Контролем служили зародыши группы  $(+/+ \times +/+)$ . Результаты наблюдений представлены в табл. 4.

Через 24 ч культивирования продолжили свое развитие в подопытной группе 100% зародышей, и в контрольной группе – 95,8%. В обеих группах наблюдались зародыши на стадии 4 или 8 бластомеров. Однако распределение по стадиям было различным. Зародыши в группе  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  в достоверно большем числе случаев (70,9%) достигли более поздних стадий (стадии 8 бластомеров) по сравнению с контрольной группой, в которой большинство зародышей находились на стадии 4 бластомеров (67%). Кроме того, следует отметить, что в группе  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  большее количество 8-клеточных зародышей приступило к компактизации, т.е. к первичной морфологической дифференцировке на внешние и внутренние клетки.

Через 48 ч развитие продолжили в группе  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  91,1% зародышей и в группе  $(+/+ \times +/+)$  – 80% от первоначального их количества. Во время наблюдения зародыши в обеих группах находились

Таблица 4

Развитие *in vitro* зародышей мышей, несущих аллель  $Kit^{W-Y}$

Вид скрещивания	Количество 2 клеточных зародышей	Культивирование		
		24 ч	48 ч	72 ч
$+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y}$	79	4 бл – 23* 6-8 бл - 56*	8 бл – 2 морулы 48 ранние бластоцисты – 22*	Бластоцисты – 68
$+/+ \times +/+$ (WR $\times$ WR)	100	4 бл – 67 6-8 бл – 28	8 бл – 5 морулы – 64 ранние бластоцисты – 11	Бластоцисты – 64

\*значения достоверны по отношению к контролю (WR  $\times$  WR),  $p < 0,05$

также на разных стадиях развития, в основном на стадии многоклеточной морулы. В обеих группах были обнаружены ранние бластоцисты. Анализ распределения зародышей по стадиям показывает, что зародыши в подопытной группе несколько опережают по развитию зародышей в контрольной группе, но это опережение статистически недостоверно. Так, на стадиях поздней (компактной многоклеточной) морулы в группе  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  было 60,7% зародышей, а ранних бластоцист – 27,8%, в группе  $(+/+ \times +/+)$  морулы составляли 64% зародышей, а ранние бластоцисты 11%.

Через 72 ч культивирования основным показателем успешного развития было достижение зародышами стадии бластоцисты, последней стадии доимплантационного периода эмбриогенеза. В группе  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  этой стадии достигли 86,1% зародышей, а в группе  $(+/+ \times +/+)$  – 64%.

Таким образом, наблюдения за развитием *in vitro* дают возможность считать, что присутствие аллеля  $Kit^{W-Y}$  не снижает жизнеспособности зародышей WR и их потенциала развития. Так как группа  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  помимо зародышей дикого и гетерозиготного типа содержала и гомозиготных зародышей, то можно думать, что изучаемый мутантный аллель на генотипе WR не оказывает отрицательного действия на раннее эмбриональное развитие не только в гетерозиготном, но и в гомозиготном состоянии в противоположность тому, что наблюдается в случае зародышей, несущих аллель  $Kit^{W-Y}$  на генотипе C57BL/6 [4]. Наши данные также показывают, что зародыши в группе  $(+/Kit^{W-Y} \times +/Kit^{W-Y})$  быстрее достигают стадий 8-бластомеров, компактной морулы и бластоцисты, чем зародыши контрольной группы. Это подтверждает наши предположения о влиянии аллеля  $Kit^{W-Y}$  на временные параметры дробления. Можно думать, что у ранних зародышей мышей WR, несущих аллель  $Kit^{W-Y}$ , ускоряется прохождение периода дробле-

ния. Аналогичное ускорение было показано и для мышей C57BL/6 [4].

Наши наблюдения также позволяют предположить, что у самцов WR аллель  $Kit^{W-Y}$  вызывает нарушение оплодотворяющей способности сперматозоидов, так как независимо от того, несет ли самка этот аллель или нет, количество неразвивающихся яйцеклеток на 2-й день после спаривания с гетерозиготными самцами больше, чем при аналогичном спаривании с самцами, несущими дикий аллель. Сравнение с данными, полученными на мышах C57BL/6 [4], показывает, что аллель  $Kit^{W-Y}$  по-разному влияет на фертильные способности мышей с разным генотипом. У гетерозиготных мышей WR отрицательное действие этого аллеля проявляется гораздо слабее, чем у мышей C57BL/6.

Такой же вывод следует из сравнения развития *in vitro* зародышей мышей WR и C57BL/6. В условиях культивирования зародыши, полученные от гетерозиготных мышей C57BL/6, проявляют пониженную жизнеспособность по сравнению с контрольными зародышами. По-видимому, в этом случае прекращают развитие, в основном, гомозиготные зародыши [4]. В случае мышей WR развитие зародышей с аллелем  $Kit^{W-Y}$  не отличается от развития контрольных зародышей.

В заключение следует сказать, что мыши, несущие мутации, сходные с человеческими, представляют собой удобные модели для изучения сложных генетических взаимодействий, которые определяют проявление наследственных болезней. Известно, что фенотипическое проявление мутаций, определяющих некоторые формы рака, в значительной степени зависят от основного генотипа [8]. Генотип мышей влияет и на проявление мутации в гене рецептора эпидермального фактора роста, необходимым для регуляции эмбрионального развития. Показано, что в зависимости от генотипа мышей мутация в этом гене прекращает развитие на разных стадиях [16].

В этом отношении исследования по влиянию генотипа на фенотипическое проявление мутации  $Kit^W$  и его аллелей очень нужны, так как известно, что такая же мутация есть и у человека [9]. Важность  $c-kit$ -гена определяется тем, что он участвует в процессах, связанных с делением, дифференцировкой и миграцией клеток. Некоторые его аллели способствуют малигнизации клеток крови [14]. В последнее время большое внимание обращается на значение мутаций в этом гене и в гаметогенезе [11]. Полученные нами данные о проявлении аллеля  $Kit^{W-Y}$  у мышей WR важны для изучения сложных генетических взаимодействий, которые определяют проявление мутаций в  $c-kit$ -гене в зависимости от основного генотипа.

#### Литература

1. Бландова З.К., Вахрушева М.П., Малашенко А.М. и др. Пятнистые стерильные самцы – новая мутация Dominant Spotting в 5 хромосоме мыши // *Генетика*. 1986. Т. 22. С.1025-1032.
2. Березовская О.П., Межевикина Л.М., Веприцев Б.Н. Метод культивирования ранних эмбрионов линейных мышей // *Онтогенез*. 1986. Т.17. №5. С.553-555.
3. Генинг Л.Б., Макарова А.В., Малашенко А.М., Тарантул В.З. Фальшивая нота ДНК-полимеразы- $\beta$  в ансамбле сторожей генома млекопитающих // *Биохимия*. 2006. Т.71. № 2. С. 201-207.
4. Коломиец О.Л., Л.Ф. Курило, Малашенко А.М., Сахарова Н.Ю., Чеботарева Т.А. Изучение эффектов мутантного гена *dominant spotting-Yurlovo* ( $Kit^{W-Y}$ ) на сперматогенез, раннее эмбриональное развитие и плодовитость мышей линии C57BL/6JY // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 10. С. 1377 – 1386.
5. Малашенко А.М., Суркова Н.И. Новая линия WR- высокочувствительная к цитогенетическому эффекту тиротифина // *Цитология и генетика*. 1979. Т.13. № 5. С. 387-391.
6. Прайт Х. Эксперименты с предимплантационными эмбрионами мышей. Биология развития млекопитающих. Методы. – М.: Мир, 1990. С. 27-647.
7. Сахарова Н.Ю., Малашенко А.М., Вихлянцева Е.Ф., Ковалицкая Ю.А. Влияние аллелей  $Kit^{W-Y}$  и  $Kit^{W-Y}$  мутации dominant spotting на продолжительность стадий дробления и жизнеспособность ранних эмбрионов мышей // *Биомедицина*. № 3, 2006.
8. Dietrich W.F., Lander E.S., Smith J.E. et al. Genetic Identification of *Mom-1*, a Major Modifier Locus Affecting Min-Induced Intestinal Neoplasia in the Mouse // *Cell*. 1993. V. 75. P. 631-639.
9. Fleishman R.A., Saltman D.L., Stastny V. et al. Deletion of *c-kit* protooncogene in the human developmental defect piebald trait // *PNAS*. 1991. V. 90. P. 10885–10889.
10. Green M.C. Catalog of mutant genes and polymorphic loci // Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse/ Second ed. Eds. Lyon M.F., Searle A.G. Oxford; N.Y.: Univ Press. Oxford. 1989. P.12-403.
11. Kissel H., Timochina I., Hardy M.P. et al. Point mutation in *Kit* receptor tyrosine kinase reveals essential roles for *kit* signalling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other *Kit* responses // *EMBO J*. 2000. V. 12. P. 1312-1326.
12. Malashenko A. Yurlovo W – Suggested Symbol  $W^Y$  // *Mouse New Letters*. 1976. No. 37. P. 61.
13. Panthier J.J., Guenet J.L., Condamine H. et al. Evidence for mitotic recombination in  $W^{ei}/+$  heterozygous mice // *Genetics*. 1990. V. 125. P. 175-182.
14. Pearson H. Surviving a knockout blow // *Nature*. 2002. V. 415. P. 9-8.
15. Seong E., Saunders T.L., Stewart C.L. et al. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question // *Trends Genet*. 2004. V. 20. P. 59-62.
16. Threadgill D.W., Dlugosz A.A., Hansen L.A. et al. Target disruption of mouse EFGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype // *Science*. 1995. V. 269. P. 230 – 234.

**THE EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT OF MICE WR BEARING ALLELE  $KIT^{W-Y}$**

**N.Yu.Sakharova, A.M.Malashenko, A.A.Smirnov, Yu.A.Kovalitskaya, E.F.Vikhlyantseva**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino*

*Research Center for Biomedical Technology of RAMS, Moscow*

*Pushchino State University*

The allele  $Kit^{W-Y}$  influence on reproductive ability and early embryonic development of mice WR was investigated. It was shown that allele  $Kit^{W-Y}$  slightly reduced the male fertility and had no apparent effect on female fertility and viability of preimplantation embryos. The embryos, derived from mating between heterozygous females and males, developed *in vitro* more quickly than control ones. The relation between new-born mice-cubs with different phenotype showed that the homozygous embryo mortality occurred in postimplantation period for the most part.

**Key words:** c-kit gene mutation, mice embriogeneze.



## Цитогенетический анализ антимутагенного действия комплекса витаминов «Пиковит» при индукции мутации у лабораторных мышей цехумом

Н.А.Пирцхелани, А.Г.Пирцхелани, Р.Гахокидзе, С.Цквитаиа, Г.Д.Капанадзе

*Тбилисский государственный медицинский университет, Республика Грузия*

*Тбилисский государственный университет, Республика Грузия*

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

На лабораторных мышах изучено антимутагенное и антицитотоксическое действие комплекса витаминов «Пиковит» при индукции мутации пестицидом цехумом. В работе применены цитологические и генетические методы исследования. Цехум характеризуется мутагенным и цитотоксическим действием. Пероральное введение животным цехума (доза 1/2 и 1/5 ЛД<sub>50</sub>) вызывает достоверное ( $p < 0,001$ ) повышение количества структурных нарушений хромосом (фрагментация и лизис хромосом), геномных мутаций (триплоидия, тетраплоидия), патологических митозов (К-митоз, слипание хромосом) и нарушение интерфазных ядер (полное ядро). «Пиковит» характеризуется выраженным антимутагенным и антицитотоксическим действием. Он в 2,5 раза уменьшает частоту мутагенных и цитотоксических эффектов цехума.

**Ключевые слова:** цехум, пиковит, митозы, хромосомы, мыши.

В настоящее время в сельском хозяйстве широко используются пестициды — средства борьбы с вредителями и болезнями растений. За последнее время установлена цитогенетическая активность многих пестицидов [1, 3, 4]. 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 аномалий, патологических митозов и нарушений интерфазных ядер при воздействии цехумом на клетки мышей, а также определение степени защитной роли комплекса витаминов «Пиковит».

### Материалы и методы

Из пестицидов был использован цехум, который вводили мышам перорально (доза 1/2 и 1/5 ЛД<sub>50</sub>). В качестве антимутагена был использован комплекс витаминов «Пиковит» (доза терапевтическая). Исследования проведены на 20 разнополых нелинейных мышах весом 20–25 г. Хромосомные препараты из костного мозга животных готовились по методу Форда и Воллама [6].

### Результаты и обсуждение

Опыты показали, что цехум вызывает как структурные нарушения хромосом, геномные мутации, патологические митозы, так и нарушения интерфазных ядер (см. табл.). Из структурных нарушений хромосом чаще наблюдали лизис хромосом, чем хромосомные фрагменты, из геномных мутаций — чаще триплоидные клетки, чем

тетраплоидные, а из патологических митозов – чаще полые метафазы и слипание хромосом, чем К-метафазы.

Известно, что генетический аппарат клетки, который подвергается тяжелым нарушениям (фрагментация, лизис и слипание хромосом, К-метафаза, полая метафаза, полая интерфаза), в дальнейшем элиминируется [2], т.е. имеет место цитотоксическое действие, что является показателем как мутагенного, так и общетоксического действия.

Целью наших исследований также было выявление и изучение таких веществ, которые выражено уменьшают нарушение генетического аппарата и токсическое воздействие цехума. Для этого нами был использован комплекс витаминов «Пиковит». Из данных таблицы видно, что при отдельном влиянии цехума на животных частота аномалии хромосом достигала 8,0%, патологических митозов – 8,5%, а нарушение интерфазных ядер – 2,6%. На фоне «Пиковита» этот показатель соответственно уменьшился до 3,27, 3,2 и 1,2%, т.е. данный антимуутаген уменьшает мутагенное и цитотоксическое действие цехума

приблизительно в 2,5 раза. Полученные результаты хорошо согласуются с наблюдениями многих других авторов [1, 4, 5].

Таким образом, полученные нами данные убедительно доказали, что для лечебно-профилактических целей необходимо использовать антимуутагены, что особенно перспективно в случаях, когда человек контактирует с вредными веществами.

### Выводы

1. Пестицид цехум характеризуется мутагенным действием. Введение цехума вызывает у лабораторных мышей достоверное повышение частоты структурных нарушениях хромосом и геномных мутации ( $p < 0,001$ ).
2. Под влиянием цехума возрастает количество как патологических митозов, так и нарушений интерфазных ядер, что является показателем цитотоксических свойств цехума.
3. Антимуутагенным, протекторным действием обладает препарат «Пиковит». На фоне комплекса витаминов вредный цитогенетический эффект цехума уменьшается в среднем в 2,5 раза.

Таблица

Антимуутагенное и антицитотоксическое действие комплекса витаминов «Пиковит» в условиях индукции мутации цехумом

Варианты	Кол-во животных	Доза, мг/кг	Кол-во использованных метафаз	Структурные нарушения хромосом (% ± ст.ом)	Геномные мутации (% ± ст.ом)	Патологические митозы (% ± ст.ом)	Число нарушений интерфазных ядер	P
Цехум (1/2 ЛД <sub>50</sub> )	5	1175	350	5,51±1,5	2,5±0,9	8,5±1,5	2,6±0,8	<0,001
Цехум (1/5 ЛД <sub>50</sub> )	5	470	400	2,4±0,3	2,0±0,3	5,6±0,4	1,8±0,5	<0,001
Цехум+пиковит	5	1175	450	2,2±0,3	1,24±0,1	3,2±0,7	1,2±0,1	0,001
Контроль	5		500	0,8±0,3	0,2±0,1	3,2±0,6	0,1	

### Литература

1. Бичикашвили Н.И. Изучение мутагенного действия пестицидов на хромосомы белых мышей // *Автореф. ... канд. наук*, 2003.
2. Михайлова Г.Р., Горшунова А.П. Влияние вируса осповакцины на хромосомы животных // *Сб. молек. мех. генет. процессов. – М., с.304-308, 1980.*
3. Пилинская М.А., Куриный А.И. Первичная оценка цитогенетической активности пестицидов // *Цитология и генетика*, № 6, с. 41-48, 1980.
4. Пирцхелани А.Г. Мутагенное действие некоторых химических факторов и проблема защиты генетического аппарата // *Автореф. ... докт. наук*, 1994.
5. Пирцхелани Н.А., Пирцхелани А.Г., Капанадзе Г.Д., Мамаладзе Н.В. Цитогенетический анализ антимутагенного действия  $\alpha$ -токоферола и глюкозы при индукции мутации героином // *Биомедицина*, № 2, с.113-116, 2006.
6. Ford C., Wollam D. A study of the mitotic chromosomes of mice of the strong a line // *Exp.Cell.Res.*, No. 32, p. 320-326, 1963.

### CITOGENETIC ANALYSIS OF ANTIMUTAGENIC ACTION OF “PICOVIT” VITAMIN COMPLEX WHEN INDUCING MUTATIONS IN LABORATORY MICE BY CECHUM

N.Pirtskhelani, A. Pirtskhelani, R.Gakhokidze, C.Ckuitaia, G.Kapanadze

*Tbilisi Medical State University, Republic of Georgia*

*Tbilisi State University, Republic of Georgia*

*The Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

The ten-day administration of cechum induced high incidence of structural aberrations of chromosomes (multiple fragments, lyses), genomic mutations (triploidy, tetraploidy), pathologic mitosis (hollow metaphase, K-mitosis, adhesion of chromosomes) and deterioration of interphase nuclei (hollow nucleus). Experiments have shown that «Picovit» vitamin complex exerted highly effective antimutagenic and anticytotoxic action. «Picovit» decreased incidence of the mutagenic and cytotoxic effects of cechum by about 2,5 times.

**Key words:** cechum, «Picovit», mitosis, chromosome, mice.



## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

### Разработка теоретических основ метода косвенного спектрофотометрического детектирования с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии

В.А.Злобин, Н.Н.Каркищенко, В.А.Павлов, А.А.Жиров, Г.В.Назаров

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Разработка нового подхода к определению следовых количеств физиологически активных веществ (ФАВ), основой которого будет являться их косвенное детектирование, базирующееся на регистрации изменения структурного состояния среды. Данный подход позволит проводить детектирование ФАВ в тех концентрациях, в которых прямое детектирование анализируемых соединений невозможно из-за их малого содержания. Приводится теоретическое описание процессов.

**Ключевые слова:** модификатор, опиаты, химический потенциал, теоретическое описание.

За последние 10-15 лет в научной литературе появилось огромное количество сообщений о значительном биологическом эффекте разнообразных химических соединений, находящихся в живой клетке или в организме в концентрациях значительно ниже «обычной» – физиологической. Так, только в базе данных MEDLINE за 1994-2006 гг. можно найти более 1000 ссылок на публикации по этой теме. Наблюдаемые эффекты воздействий сверхмалых концентраций (СМК) физиологически активных веществ (ФАВ) часто лежат в интервале концентраций  $10^{-6}$ - $10^{-19}$  М, и зачастую сравнимы (а иногда даже и превосходят) по величине эффекты тех же воздействий в «обычных», физиологических, дозах. Наличие такого биологического эффекта ФАВ обуславливает необходимость осуществления контроля их содержания. Однако прямое детектирование веществ в концентрациях примерно от  $10^{-6}$  М и ниже обычно сопряжено со значительными трудностями, связанными с недостаточной чувствительностью существующих методов анализа.

Проблема снижения предела обнаружения ФАВ в различных матрицах, как правило, решается традиционными способами, такими, как использование специфичных высокочувствительных детектирующих систем, проведение предварительного концентрирования проб, либо путем химической модификации анализируемых соединений с целью последующего детектирования образующихся дериватов. Однако использование этих способов не всегда позволяет достичь требуемых пределов обнаружения ФАВ, в особенности содержащихся в СМК. В связи с этим, актуальны исследования, направленные на поиск и разработку новых подходов, которые позволяют обнаруживать ФАВ, содержащиеся в следовых количествах.

Результаты экспериментальных исследований с применением методов физико-химического анализа показывают, что разбавление ФАВ до предельных концентраций приводит к существенным изменениям физических свойств окружающего их раствора вследствие значительного измене-

ния структурного состояния водной среды. В связи с этим, для определения следовых количеств ФАВ наиболее перспективными могут быть методы анализа, чувствительные к изменениям структурного состояния исследуемой системы. Совокупность таких методов позволит разработать новый подход к определению следовых количеств ФАВ, основой которого будет являться их косвенное детектирование, базирующееся на регистрации изменения структурного состояния среды.

Такой подход позволит проводить детектирование ФАВ в тех концентрациях, в которых прямое детектирование анализируемых соединений невозможно из-за их малого содержания.

Обоснование наиболее перспективных методов определения следовых количеств наркотических анальгетиков проведено нами в работе [1]. Анализ свойств изучаемых соединений показал, что наиболее перспективными методами определения содержания их следовых количеств являются использование микромасштабной колонной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением ее обращенно-фазового варианта и косвенного спектрофотометрического детектирования. При этом газохроматографическое определение препаратов этого ряда сопряжено с трудностями, связанными с деструкцией анализируемых соединений в системе ГХ и небольшой их летучестью.

Однако недостаточная изученность теоретических основ метода косвенного спектрофотометрического детектирования в видимой области спектра в настоящее время ограничивает его широкое применение.

**Цель исследования:** разработка теоретических основ метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с косвенным спектрофотометрическим детектированием.

**Выводы.** Результаты проведенных нами исследований [1] показывают, что в системе ВЭЖХ с косвенным спектрофотометри-

ческим детектированием наиболее вероятным механизмом сорбции является тот, в котором удерживание сорбата определяется его распределением между подвижной и жидкой стационарной фазами. При этом жидкую стационарную фазу, образованную граничным слоем, можно рассматривать как часть объемной фазы, но находящейся под воздействием поля поверхностных сил. В связи с этим модификатор подвижной фазы (ПФ) будет распределяться между подвижной и жидкой стационарной фазами изучаемой системы ВЭЖХ.

На основании вышеизложенного для системы ВЭЖХ с косвенным спектрофотометрическим детектированием в видимой области спектра нами предложена модель, представленная на рис. 1.

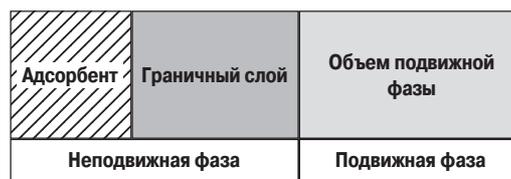


Рис. 1. Модель системы ВЭЖХ с косвенным спектрофотометрическим детектированием в видимой области спектра

В соответствии с положениями термодинамики неравновесных процессов, распределение вещества между соприкасающимися фазами зависит от величины химических потенциалов его молекул в этих фазах.

Известно, что химический потенциал компонента термодинамической системы в данной ее фазе определяется как частная производная  $(\partial G / \partial n_i)_{T,p,n_j}$ , где  $G$  — энергия Гиббса фазы,  $n_i$  — число молей  $i$ -го компонента,  $T$  — температура,  $p$  — давление,  $n_j$  — число молей всех остальных компонентов.

Ранее нами выявлена способность операторов воздействовать на структуру граничного слоя раствора, находящегося у поверхности адсорбента. При изменении структуры фазы (к которой можно отнести граничный слой) будет изменяться и энергия

Гиббса этой фазы, что в свою очередь вызовет изменение химического потенциала модификатора ПФ, находящегося в граничном слое. Это и будет являться причиной появления сигнала в исследуемой нами системе.

Данный вывод основывается на том, что при введении сорбата в хроматографическую систему, в которой установлено динамическое равновесие красителя между подвижной и неподвижной фазами, изменяется структура граничного слоя неподвижной фазы и химический потенциал растворенного в нем красителя. Процесс установления равновесия вызовет изменение количества красителя находящегося в ПФ и, следовательно, появление детектируемого сигнала. При этом возможен перенос компонента против градиента концентраций, что не может быть объяснено механизмом сорбции, основанным на взаимодействии сорбат – адсорбент.

Перенос молекул модификатора из одной фазы в другую является процессом, протекающим во времени. В связи с этим с целью математического описания происходящих процессов необходимо решить задачу кинетики сорбции модификатора в изучаемой системе.

Согласно современным классическим представлениям [2, 3], подход к решению задачи кинетики адсорбции хроматографируемых соединений из растворов состоит в представлении адсорбции в виде последовательного двухстадийного процесса. Первая стадия заключается в диффузии (молекулярной или конвективной) из объема раствора к поверхностному слою, вторая — в переходе (в соответствии с ленгмюровской кинетикой) в поверхностный слой, сопровождающимся накоплением вещества в слое. Процесс переноса сорбата из объема раствора в поверхностный слой, как правило, описывается реакцией первого порядка со всеми присущими ей характеристиками (константой прямой и обратной реакции, энергией активации и др.). Одна-

ко недостатком такого подхода является отсутствие критериев однозначного выбора кинетического уравнения адсорбции. Единственным критерием правильности полученного кинетического уравнения является его превращение в условиях равновесия в уравнение изотермы адсорбции. При описании одного и того же процесса различными кинетическими вариантами изотермы адсорбции будут различны и значения входящих в эти уравнения характеристик. Это значительно снижает практическую ценность результатов экспериментальных исследований, так как затрудняет изучение механизма происходящих в системе процессов.

В связи с этим для решения задачи кинетики сорбции модификатора из растворов ПФ в методе косвенного спектрофотометрического детектирования нами предлагается использовать диффузионный подход без применения кинетических уравнений. При этом кинетические характеристики будут выражены коэффициентом диффузии модификатора вместо коэффициентов скорости адсорбции и десорбции в случае применения кинетических уравнений.

Исходя из предложенной выше модели системы ВЭЖХ, распределение модификатора в хроматографической системе будет происходить между объемом раствора и граничным слоем.

Как известно, «движущей силой» диффузии является разность химических потенциалов. Исходя из этого, сорбцию модификатора можно рассматривать как процесс выравнивания его химического потенциала в объеме раствора и в граничном слое при его различных начальных значениях.

В условиях сорбционного равновесия химический потенциал модификатора ПФ в любой точке раствора, включая и граничный слой, будет равен

$$\mu(x) = \mu^0(x) + RT \ln a(x) = \text{const}, \quad (1)$$

где  $\mu(x)$  и  $\mu^0(x)$  — химический потенциал модификатора ПФ в точке с координатой  $x$

соответственно в данном (с активностью  $a(x)$ ) и стандартном (с активностью 1) состояниях.

Используя уравнение (1) для двухслойной модели раствора, сравним граничный слой ( $0 < x < h$ ,  $a(x) = a_0$ ,  $\mu^0(x) = \mu_1^0$ ) с объемом раствора ( $h < x < \mu$ ,  $a(x) = a_\mu$ ,  $\mu^0(x) = \mu_2^0$ ), где  $h$  – толщина граничного слоя. Исходя из того, что в условиях равновесия значения химического потенциала модификатора ПФ во всех частях раствора одинаковы, получаем

$$\mu_2^0 - \mu_1^0 = \ln \frac{a_0}{a_\infty} = \ln \frac{c_0}{c_\infty} + \ln \frac{\gamma_1(c_0)}{\gamma_2(c_\infty)}, \quad (2)$$

где  $\gamma_1(c_0)$  и  $\gamma_2(c_\mu)$  – коэффициент активности модификатора ПФ в граничном слое при концентрации  $c_0$  и в объеме раствора при концентрации  $c_\mu$  соответственно.

Представим уравнение (2) в виде

$$\ln K = \mu_2^0 - \mu_1^0 = -\ln \frac{\gamma_1(c_0)}{\gamma_2(c_\infty)}, \quad (3)$$

где  $K = c_0/c_\infty$  – константа распределения.

При введении в систему ВЭЖХ анализируемой смеси в условиях динамического хроматографирования активность (концентрация) модификатора ПФ будет отличаться от равновесной. Следовательно, и химический потенциал модификатора ПФ в этих условиях будет зависеть не только от координаты, но и от времени

$$\mu(x, t) = \mu^0(x) + RT \ln a(x, t) \neq \text{const}, \quad (4)$$

Используем уравнение (4) для областей раствора, расположенных на расстоянии  $x$  ( $a(x, t) = a_1(x, t)$ ,  $\mu^0(x) = \mu_1^0$ ,  $\mu(x, t) = \mu_1(x, t)$ ) и бесконечно удаленных ( $a(x, t) = a_\infty$ ,  $\mu^0(x) = \mu_2^0$ ,  $\mu(x, t) = \mu_2(\mu, t)$ ) от поверхности адсорбента, и вычитая одно уравнение из другого, получаем

$$\mu_2(\infty, t) - \mu_1(x, t) = \mu_2^0 - \mu_1^0(x) + \ln \frac{a_\infty}{a_1(x, t)}. \quad (5)$$

Из уравнений (5) и (3) для неравновесного граничного слоя следует

$$\mu_2(\infty, t) - \mu_1(x, t) = \ln K + \ln \frac{c_\infty}{c_1(x, t)} + \ln \frac{\gamma_1(c_0)}{\gamma_1(c_1(x, t))}, \quad (6)$$

где  $\gamma_1(c_1(x, t))$  – коэффициент активности

модификатора ПФ в граничном слое при его концентрации  $c_1(x, t)$ . В случае идеального граничного слоя из уравнения (6) получим

$$\mu_2(\infty, t) - \mu_1(x, t) = \ln K + \ln \frac{c_\infty}{c_1(x, t)}, \quad (7)$$

Таким образом, концентрация модификатора ПФ в объеме раствора в любой момент времени может быть выражена через разность динамических химических потенциалов в граничном слое и в объеме раствора.

Согласно термодинамике необратимых процессов градиент химических потенциалов создает поток молекул (в нашем случае модификатора), величину которого можно вычислить из уравнения

$$J = -\alpha \nabla \mu(x, t), \quad (8)$$

где  $J$  – поток молекул модификатора;  $\alpha$  – коэффициент массопроводности.

Найдем баланс числа молекул модификатора, входящих и выходящих из произвольного объема  $V$  в единицу времени. Число молекул, входящих в объем в единицу времени, можно вычислить с использованием уравнения (9):

$$Q = -\oint J dS, \quad (9)$$

где интеграл берется по поверхности, окружающей объем  $V$ . Знак минус означает, что поток направлен внутрь объема.

При этом изменение числа молекул в объеме  $V$  равно  $\int \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} dV$ . Приравнявая изменение числа молекул в объеме к числу молекул, в него приходящих, имеем

$$\int \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} dV = -\oint J dS. \quad (10)$$

Преобразовывая интеграл правой части уравнения (10) с использованием теоремы Остроградского-Гаусса [4], получим

$$\int \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} dV = -\int \text{div} J dV. \quad (11)$$

Ввиду произвольности объема, выраже-

ние (11) можно представить в виде

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = -\text{div}J \quad (12)$$

или

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = \text{div}[\alpha \nabla \mu(x,t)] \quad (13)$$

Пренебрегая зависимостью коэффициента массопроводности от химического потенциала и считая  $\alpha = \text{const}$ , можно записать

$$\text{div} \alpha \nabla \mu(x,t) = \alpha \text{div} \nabla \mu(x,t) \quad (14)$$

Учитывая, что  $\text{div} \nabla \mu(x,t) = \frac{\partial^2 \mu(x,t)}{\partial x^2}$  [3],

получим

$$\text{div} \alpha \nabla \mu(x,t) = \alpha \text{div} \nabla \mu(x,t) \quad (15)$$

Как известно [6]  $\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial \mu(x,t)}{\partial t} \frac{\partial c}{\partial \mu}$ , и

$\alpha \frac{\partial \mu}{\partial c} = D$ , где  $D$  – коэффициент диффузии.

На основании этого уравнение (15) можно преобразовать к виду

$$\frac{\partial \mu(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \mu(x,t)}{\partial x^2} \quad (16)$$

Соотношение (16) по форме аналогично второму закону Фика, описывающему процесс массопереноса во времени. Исследуя с помощью полученного уравнения процесс изменения (выравнивания) химического потенциала модификатора в хроматографической системе, можно по уравнению (7) определить концентрацию модификатора в граничном слое и, следовательно, величину динамической сорбции  $\Gamma$ :

$$\Gamma = \int_0^h [c_1(x,t) - c_\infty] dx. \quad (17)$$

Как известно, явления массопереноса описываются уравнениями параболического типа [5]. Поставим краевую задачу о выравнивании химического потенциала в объеме раствора и граничном слое при со-

ответствующих значениях коэффициентов  $D$  и  $\alpha$ :

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial \mu_1(x,t)}{\partial t} &= D_1 \frac{\partial^2 \mu_1(x,t)}{\partial x^2}, 0 < x < h \\ \frac{\partial \mu_2(x,t)}{\partial t} &= D_2 \frac{\partial^2 \mu_2(x,t)}{\partial x^2}, h < x < +\infty \end{aligned} \right\} 0 < t < +\infty \quad (18)$$

$$\mu_1(x,0) = \mu_0; \mu_2(x,0) = \mu_0 + \ln K \quad (19)$$

$$\alpha_1 \frac{\partial \mu_1(h,t)}{\partial x} = \alpha_2 \frac{\partial \mu_2(h,t)}{\partial x} \quad (20)$$

$$\mu_1(h,t) = \mu_2(h,t) \quad (21)$$

$$\frac{\partial \mu_1(0,t)}{\partial x} = \frac{\partial \mu_2(\infty,t)}{\partial x} = 0$$

$$\text{или } \mu_2(\infty,t) = \mu_0 + \ln K \quad (22)$$

Условие (19) соответствует изменению химического потенциала на величину  $\ln K$  при  $x = h$  в начальный момент времени. Граничное условие (20) характеризует равенство потоков модификатора с обеих сторон границы раздела фаз при  $x = h$ . Условие (22) характеризует отсутствие потока в соприкасающуюся фазу и неизменность химического потенциала модификатора в растворе на значительном удалении от поверхности.

Краевая задача о выравнивании химического потенциала в объеме раствора и граничном слое (18)-(22) аналогична задаче о нагревании пластины, приведенной в соприкосновение с полубесконечным телом, рассмотренной в работе. Решением этой задачи в случае граничного слоя будет уравнение (23):

$$\frac{\mu_1(x,t)}{\ln K} = \frac{1}{1 + K_E} \sum_{n=1}^{\infty} (-z)^{n-1} \times \left\{ \text{erfc} \frac{(2n-1) - x/h}{2\sqrt{Fo_1}} + \text{erfc} \frac{(2n-1) + x/h}{2\sqrt{Fo_1}} \right\}, \quad (23)$$

где

$$K_E = \frac{K_\alpha}{\sqrt{K_D}}; K_\alpha = \frac{\alpha_1}{\alpha_2}; K_D = \frac{D_1}{D_2}; z = \frac{1 - K_E}{1 + K_E};$$

$Fo_1 = \frac{D_1 t}{h^2}$  – число Фурье для граничного слоя;  $n$  – номер члена ряда.

Используем значение  $\mu_1(x, t)$  для определения динамической адсорбции  $\Gamma$ . Учитывая, что  $\alpha \frac{\partial \mu}{\partial c} = D$  и  $\frac{\partial \mu}{\partial c} = 1/c$ , получим, что  $\alpha_i = D_i \cdot c_i$ . Следовательно, в условиях равновесия для граничного слоя  $\alpha_1 = D_1 \cdot c_1$  и объема раствора  $\alpha_2 = D_2 \cdot c_\infty$ . Используя полученные соотношения, выполним преобразования:

$$K_\alpha = \frac{\alpha_1}{\alpha_2} = \frac{D_1 \cdot c_0}{D_2 \cdot c_\infty} = \frac{D_1}{D_2} K = K_D \cdot K \quad (24)$$

$$K_E = \frac{K_\alpha}{\sqrt{K_D}} = \frac{K_D \cdot K}{\sqrt{K_D}} = K \sqrt{K_D} \quad (25)$$

Значение коэффициента  $K$  при этом может изменяться от 1 (в начальный момент, когда в системе при отсутствии анализируемой пробы установлено динамическое равновесие модификатора) до равновесного значения при наличии в системе анализируемого соединения.

Принимая, что  $\mu_0 = 0$ , из уравнений (7) и (22) получаем

$$c_1(x, t) = c_\infty \exp \mu_1(x, t). \quad (26)$$

Учитывая, что

$$\Gamma_0 = (c_0 - c_\infty)h = c_\infty h(K - 1), \quad (27)$$

из уравнений (17) и (26) следует

$$\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_0} = \frac{1}{(K - 1)h} \int_0^h (\exp \mu_1(x, t) - 1) dx, \quad (28)$$

где  $\Gamma_0$  – равновесная сорбция;  $\theta$  – относительная степень заполнения граничного слоя сорбента молекулами модификатора.

С учетом уравнений (23) и (25) преобразуем уравнение (28) к виду:

$$\theta = \frac{1}{(K - 1)h} \int_0^h \left[ K \frac{1}{1 + K \sqrt{K_D}} \sum_{n=1}^{\infty} (-z)^{n-1} \left\{ \operatorname{erfc} \frac{(2n-1)-x/h}{2\sqrt{Fo_1}} + \operatorname{erfc} \frac{(2n-1)+x/h}{2\sqrt{Fo_2}} \right\} - 1 \right] dx.$$

Уравнение (29)

Полученное уравнение позволит описывать сорбцию модификатора ПФ в исследуемой хроматографической системе.

При этом кинетической характеристикой модификатора ПФ является его коэффициент диффузии в граничном слое (поперек слоя)  $D_1$ . Используя полученные соотношения, по экспериментальным значениям параметров сорбции можно рассчитать значения величин  $D_1$  и  $h$ , характеризующих структурные и пространственные свойства граничного слоя.

Для оценки влияния опиагов на процессы, происходящие вблизи границы раздела фаз, была разработана компьютерная программа *NB (turbo Pascal 6.0)*, реализующая расчет сорбционных кривых по уравнению (29). При этом по экспериментальным значениям параметров сорбции с использованием уравнения (27) рассчитывалась толщина граничного слоя, затем с использованием метода наименьших квадратов вычислялась величина коэффициента диффузии молекул красителя в этом слое так, чтобы сумма квадратов расчетной и экспериментальной зависимости  $\theta$  была минимальной.

Результаты вычислений для пика соответствующего времени удерживания фентанила, представлены на рис. 2.

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что для пика со временем удерживания, соответствующего по времени удерживания фентанилу, с увеличением содержания анализируемого соединения, коэффициент диффузии в граничном слое и его толщина уменьшаются. Известно, что коэффициент диффузии молекул в жидкости обратно пропорционален вязкости этой жидкости. Из этого следует, что происхо-

дящие с увеличением содержания фентанила изменения, наблюдаемые на рис. 2, связаны с уменьшением толщины граничного слоя и ростом его вязкости.

Аналогичный эффект проявляется, в частности, в граничном плавлении льда. Этот известный эффект можно наблюдать в строго цилиндрических тонких капиллярах с молекулярно гладкой поверхностью. При приближении температуры к точке плавления столбики льда становятся легкоподвижными в связи с образованием у поверхности лед-кварц незамерзающей водной прослойки, обладающей свойствами вязкой ньютоновской жидкости. При понижении температуры скорость сдвига столбиков льда падает в связи с уменьшением толщины незамерзающих прослоек и ростом их вязкости, что является свидетельством усиления структурных эффектов.

Таким образом, наблюдаемые с увеличением содержания фентанила в хроматографической системе явления происходят вследствие усиления вблизи границы раздела фаз структурных эффектов, аналогичных тем, которые могут наблюдаться в водных системах вблизи границы раздела фаз при понижении температуры.

#### Литература

1. Злобин В.А., Букреева Л.П., Кузнецов П.Е. и др. Использование ВЭЖХ в анализе опиатов с применением косвенного спектрофо-

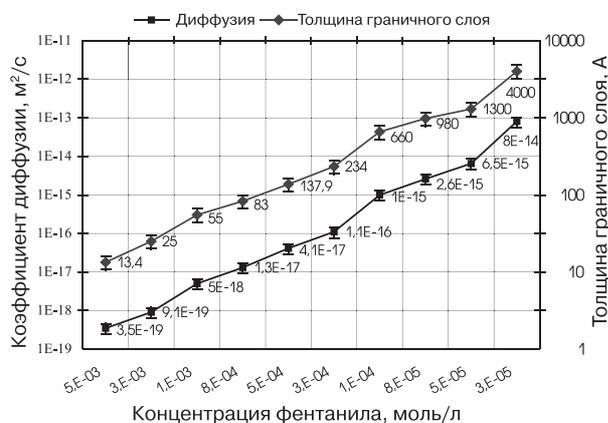


Рис. 2. Изменение толщины граничного слоя и коэффициента диффузии в этом слое для молекул красителя в зависимости от содержания фентанила (для пика, соответствующего по времени удерживания фентанилу)

мометрического детектирования // *Химико-фармацевтический журнал*, 2000, т.34, № 5, с. 55-56.

2. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А. и др. Аналитическая хроматография. — М.: Химия, 1993.
3. Киселев А.В., Пошкус Д.П., Яшин Я.И. Молекулярные основы адсорбционной хроматографии. — М.: Химия, 1986.
4. Арфкен Г. Математические методы в физике. — М.: Атомиздат, 1970.
5. Будак Б.М., Самарский А.А., Тихонов А.Н. Сборник задач по математической физике. — М.: Наука, 1972.
6. Левин В.Г. Физико-химическая гидродинамика. — М.: Физматгиз, 1959.

#### THEORETICAL BASIS FOR A METHOD OF INDIRECT SPECTRUM PHOTOMETRIC DETECTION USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

V.A. Zlobin, N.N. Karkischenko, V.A. Pavlov, A.A. Zhironov, G.V. Nazarov

Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

We introduce a new theoretical basis for detection of physiologically active matters (PAM) in the trace quantities by indirect detection of changes in environmental structure. This method allows detecting PAM in very small concentrations which are not detectable by any other methods.

**Key words:** modifier, opiates, chemical potential, theoretical description.



## Новый программный продукт для клинической фармакологии

Ю.В.Горшкова, А.В.Трегубов, И.В.Сарвилина

*Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону*

В лаборатории информации и стандартизации в области биомедицинских и лекарственных технологий Южного научного центра РАН разработан программный продукт «Регистрация побочных реакций на лекарственные препараты». Эта компьютерная программа должна способствовать учету побочных реакций лекарственных средств на территории России, внедрению и мониторингу действия информационного стандарта лекарственного средства, нацеленного на качественное лекарственное обеспечение населения нашей страны, особенно ее регионов.

**Ключевые слова:** побочные эффекты, лекарственные средства, программный модуль, многопользовательский режим, интерфейс, информационно-диагностическая база.

Проблема регистрации и изучения побочных реакций (ПР) очень актуальна, так как по данным Всемирной организации здравоохранения у каждого 20-го больного прием лекарственных средств (ЛС) сопровождается ПР, а в стационаре они возникают у каждого 3-го пациента. В 0,5% случаев ПР представляют опасность для жизни, а в 0,25% случаев они приводят к летальному исходу [2, 3, 4]. При рациональной фармакотерапии ПР можно избежать у 80% больных [5].

В России задача регистрации ПР до сих пор не решена. В 2004 году Федеральным центром по контролю побочных действий лекарств Минздрава РФ и Центром клинической фармакологии РУДН разработан бумажный бланк «Извещение о побочных реакциях лекарственных средств» [1]. В Южном научном центре Российской академии наук (ЮНЦ РАН, г. Ростов-на-Дону), который является центральным научным учреждением РАН в Южном Федеральном Округе, была создана лаборатория информации и стандартизации в области

биомедицинских и лекарственных технологий, одним из направлений деятельности которой стала комплексная оценка эффективности и безопасности применения ЛС у человека, в том числе разработка универсальной компьютерной базы данных по регистрации ПР ЛС.

Важными предпосылками для проведения этих исследований явилось то, что на базе новейшего высокотехнологичного оборудования для хромато-масс-спектрометрии, спектрофотометрии и электрофотических методов исследования выполняются фундаментальные и прикладные работы в области фармаконадзора с консультативной помощью для научных и медицинских работников, а также пациентов. Ключевым моментом в работе лаборатории информации и стандартизации в области биомедицинских и лекарственных технологий ЮНЦ РАН является междисциплинарный подход при решении задач научных исследований в области фармаконадзора с участием высококвалифицированных сертифицированных специалистов: терапев-

тов, клинических фармакологов, клинических фармакокинетиков, медицинских генетиков, специалистов по лабораторной диагностике. Контроль результатов исследований осуществляется с использованием международных правил качественной лабораторной практики (GLP), стандартов метрологии и аттестованных методов пробоподготовки биологических материалов, с использованием новейших компьютерных технологий и программ.

На основе проводимых в лаборатории исследований в области фармацевтической протеомики, популяционной фармакокинетики, фармакогеномики с освоением, внедрением и разработкой новых информационных технологий, была разработана технологическая платформа для популяционной фармакокинетической/ фармакодинамической модели лекарственного средства:

- 1) оценка фармакодинамических эффектов лекарственного средства и регистрация побочных эффектов;
- 2) проведение *in vitro* теста на растворимость лекарства, оценка фармацевтической эквивалентности лекарства на основе ИК-Фурье спектроскопии;
- 3) терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) на основе экстракции лекарства из биоматериала и хромато-масс-спектрометрического исследования концентрации лекарственного средства в крови пациента с последующим применением D-оптимальной стратегии анализа;
- 4) идентификация значений базовых фармакокинетических параметров (константы абсорбции, константы элиминации, объема распределения), построение фармакокинетической /фармакодинамической модели (программа USC\* PACK PC Collection, BOXES и ADAPT PC Collection, США) на основе оценки фармакодинамических эффектов;
- 5) оптимизация и персонализация терапии с учетом корреляционных взаимо-

связей индивидуальных фармакокинетических параметров и зарегистрированных ПР.

На базе представленной платформы выполняется ТЛМ для следующих групп ЛС: бронходилататоры, сердечные гликозиды, гиполипидемические ЛС, антибактериальные ЛС, противогрибковые ЛС, противоопухолевые ЛС, антиаритмические ЛС, сахароснижающие ЛС, ЛС для заместительной гормональной терапии, антиагреганты, иммунодепрессанты, антиконвульсанты, противопаркинсонические ЛС. Проведение этих исследований способствует диагностике и профилактике возникновения ПР на ЛС.

Результаты научных и лабораторных исследований, а также данные о пациентах, получивших консультативную помощь в лаборатории информации и стандартизации в области биомедицинских и лекарственных технологий ЮНЦ РАН, вносятся в единую компьютерную базу данных, которая была разработана сотрудниками лаборатории с учетом имеющегося научного оборудования и используемых методов исследований. Составной частью этой программы является разработанный нашей лабораторией программный продукт «Регистрация побочных реакций на лекарственные препараты», который представляет собой универсальный инструмент по регистрации ПР ЛС, может работать автономно и являться самостоятельным программным модулем для создания единого реестра ПР ЛС.

Программный продукт «Регистрация побочных реакций на лекарственные препараты» является оптимально усовершенствованной электронной версией «Извещение о побочных реакциях лекарственных средств». Его внедрение должно способствовать учету ПР ЛС, находящихся как на различных фазах клинических испытаний, так и на стадии широкого применения, а также созданию и внедрению в практику информационного стандарта лекарствен-

ного средства, что является единственным выходом из ситуации неудовлетворительного лекарственного обеспечения населения нашей страны, особенно ее регионов.

Программный продукт можно использовать как в лечебно-профилактических учреждениях, региональных департаментах здравоохранения и социальной защиты, так и в качестве медицинской информационной системы для научных исследований, включающей базу данных.

Научными направлениями деятельности, которые возможно развивать с использованием разработанной программы «Регистрация побочных реакций на лекарственные препараты», являются ТЛМ, диагностика причин ПР, анализ взаимодействия лекарственных препаратов, токсикология, фармакогеномика, исследование биоэквивалентности лекарственных средств.

Разработанный программный продукт включает перечень вопросов, позволяющих провести предварительное определение степени достоверности причинно-следственной связи и необходимое кодирование информации о побочных действиях лекарственных средств.

При создании программы был применен объектно-ориентированный подход, проведен сбор и анализ требований, спроектированы логическая и физическая модели базы данных, построены прототипы системы, разработаны необходимые диаграммы для реализации приложения. В качестве языка программирования был выбран язык высокого уровня Visual C++, использован каркас приложения Dialog based, в качестве базы данных использо-

ван Microsoft Access и драйвер доступа к данным MS JET OLEDB, что позволяет работать на платформе Windows 95 и выше, без предустановленного MS Office.

Программа не требует установки и специальных библиотек. Пустой модуль имеет небольшой объем, устанавливается с дискеты, не требует наличия на компьютере установленной версии Microsoft Access и прочих специальных программ. Реализована возможность организации многопользовательского режима в локальной компьютерной сети. Первичные данные вводятся вручную с помощью дружественного интерфейса.

Интерфейс программы включает карту первичных сведений (рис. 1) и шесть дополнительных карт (окон) для заполнения информацией: «Информация о подозреваемом ЛС», «Сопутствующие ЛС и анамнез», «Меры коррекции ПР», «Дополнительные данные», «Информация, относящаяся к ПЛС и ПР», «Статус препарата, другие особенности клиники, лечения. Исход» (рис. 2).

- Карта первичных сведений содержит: Ф.И.О. врача, сведения о пациенте: фамилия, имя, отчество, пол, возраст, национальность, место рождения (отдельных полях), а также описание ПР, начало приема лекарственного средства и исход.

The screenshot shows a window titled 'effects' with a menu bar containing 'Файл', 'Редактирование', and 'Справка/Чемпи'. The main area is a form with the following fields and controls:

- Ф.И.О. врача: text input field.
- Пациент: text input field.
- Имя: text input field.
- Фамилия: text input field.
- Отчество: text input field.
- Возраст(лет): text input field.
- Пол: dropdown menu with 'Мужской' selected.
- Национальность: text input field.
- Место проживания: dropdown menu with 'Ростов' selected.
- Побочные реакции: text area for 'Описание ПР'.
- Начало приема: date dropdown menu with '25.05.2006' selected.
- Исход: dropdown menu with 'выздоровление без последствий' selected.

At the bottom, there are six buttons for navigating to other screens:

- Информация о подозреваемом ЛС
- Дополнительные данные
- Сопутствующие ЛС и анамнез
- Информация, относящаяся к ПЛС и ПР
- Меры коррекции ПР
- Статус препарата, другие особенности клиники, лечения. Исход

A 'Сохранить' button is located at the bottom right of the form area.

Рис. 1. Карта первичных сведений

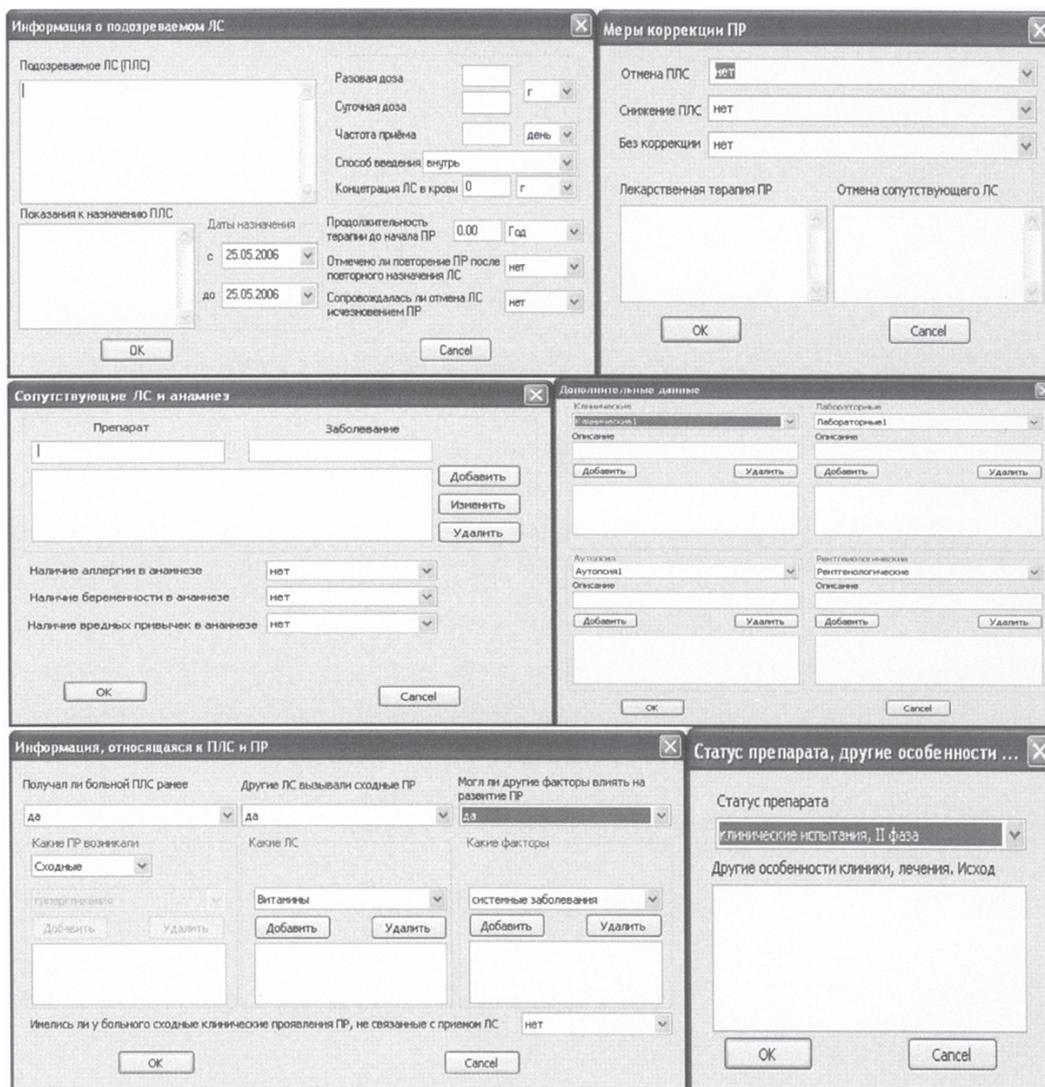


Рис. 2. Дополнительные окна программы

• Карта «Информация о подозреваемом ЛС» содержит поля: описание подозреваемого ЛС (ПЛС), показания к назначению ПЛС, даты назначения (с... по...), разовая доза, суточная доза, частота приема, способ введения, концентрация ЛС в крови, продолжительность терапии до начала ПР, отмечено ли повторение ПР после повторного назначения ПЛС, сопровождалась ли отмена ЛС исчезновением ПР.

• Карта «Сопутствующие ЛС и анамнез» содержит поля: препарат и заболевание, наличие аллергии в анамнезе, наличие беременности в анамнезе, наличие вредных привычек в анамнезе.

• Карта «Информация, относящаяся к ПЛС и ПР» содержит поля: получал ли больной ПЛС ранее, другие ЛС вызывали сходные ПР, мог ли другие факторы влиять на развитие ПР, какие ПР возникали, какие ЛС, какие факторы, имелись ли у больного сходные клинические проявления ПР, не связанные с приемом ЛС.

влиять на развитие ПР и какие, имелись ли у больного сходные клинические проявления ПР, не связанные с приемом ЛС.

- Карта «Меры коррекции ПР» содержит поля: отмена ПЛС, снижение ПЛС, без коррекции, лекарственная терапия ПР, отмена сопутствующего ЛС.

- Карта «Дополнительные данные» содержит поля: клинические методы обследования, лабораторные методы обследования, рентгенологические методы обследования, аутопсия с возможностью вводить результаты указанных исследований.

- Карта «Статус препарата, другие особенности клиники, лечения. Исход» содержит поля: статус препарата, другие особенности клиники и лечения, исход.

Программа позволяет производить выгрузку, загрузку и слияние данных, полученных в разных точках, что должно облегчать ее передачу по регионам, а сформированные на местах базы данных ПР можно анализировать сразу и передавать частично или полностью для слияния на общем сервере с целью комплексного целостного мониторинга и получения статистических данных. Программа имеет широкий спектр статистической обработки данных и возможность печати отчетов.

Характерным преимуществом данной программы является стандартизация вво-

димых названий, терминов и обозначений. При вводе данных нужное значение выбирается из предложенного списка, что позволяет качественно облегчить работу оператора, сократить время на ввод и обдумывание информации, а также является значимым для статистического анализа результатов мониторинга, так как унификация данных – основополагающий этап качественного скрининга. Для ввода и коррекции унифицированных данных в программе используются 14 библиотек-справочников: Адрес, Время, Доза, Способ введения, Побочные реакции (рис. 3). Клинические методы обследования, Лабораторные методы обследования, Рентгенологические методы обследования, Аутопсия, Исход, Лекарственные средства, Статус препарата, Вредные факторы, Вредные привычки.

Следующим этапом разработки оригинальной информационно-диагностической базы должно стать создание базы данных динамического наблюдения за пациентом на основе специально разработанной электронной версии медицинской карты.

Результатом внедрения разработанного программного продукта является создание базы данных побочных эффектов при применении ЛС у пациентов с различной патологией в Южном Федеральном Округе.

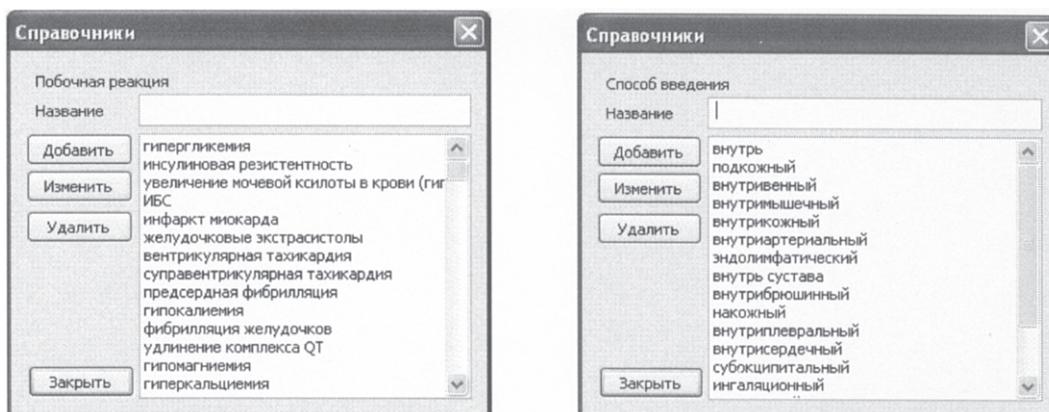


Рис. 3. Окна справочников «Побочные реакции» и «Способ введения»

Таким образом, будущее глобальной безопасности лекарств в огромной мере зависит от способности создать местные системы мониторинга лекарств, а также регистрации и хранения соответствующей информации. Разработанный в лаборатории информации и стандартизации в области биомедицинских и лекарственных технологий ЮНЦ РАН программный продукт «Регистрация побочных реакций на лекарственные препараты» является своевременным и актуальным, способствующим повышению качества лекарственной помощи населению и нацеленным на усиление технического содействия национальным органам по контролю лекарств для достижения более полной согласованности в области проведения мониторинга лекарств и реагирования на сигналы о неблагоприятных ПР на лекарства на региональном, национальном и глобальном уровне. Важно, чтобы такие сигналы быстро трансформировались в политические решения на национальном уровне в целях защиты безопасности пациентов.

### Литература

1. Бюллетень «Безопасность лекарств», Департамент государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медтехники Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральный Центр по контролю побочных действий лекарств, Российский университет дружбы народов. — Москва, № 3, с. 7-10, 1999.
2. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшков Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. — М.: Техносфера, 2007.
3. Cohen J.S. Ways to minimize adverse drug reactions: individualized doses and common sense are key // *Postgraduate Medicine*, 106:163-172, Sept 1999.
4. Lazarou J., Pomeranz B.H., Corey P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies // *JAMA*, 279(15):1200-1205, 1998.
5. Leape L.L., Cullen D.J., Clapp M.D., Burdick E., Demonaco H.J., Erickson J.I., Bates D.W. Pharmacist Participation on Physician Rounds and Adverse Drug Events in the Intensive Care Unit // *JAMA*, Jul 21;282(3):267-270, 1999.

### NEW PROGRAM PRODUCT FOR CLINICAL PHARMACOLOGY

U.V.Gorshkova, A.V.Tregubov, I.V.Sarvilina  
*South Scientific Centre of RAS, Rostov-on-Don*

The Laboratory of information and standardization in the field of biomedical and medicinal technologies of the South Scientific Centre of Russian Academy of Sciences has designed a computer product "Registration of drugs adverse reactions", which is an advanced electronic version of paper copy "Notice of adverse drug reactions". This program shall provide keeping track of drugs adverse reactions in Russia, introduction and monitoring of the medicine information standards targeted on better provision of medicines for the people of our country, particularly in its region. This computer product can be used in hospitals, regional department of the public health and social protection. As the medical information system and database it can find use in pharmacovigilance, pharmacogenomics, therapeutic drug monitoring, diagnosis of adverse reactions causes, interaction of medicines, toxicology, research of drugs bioequivalence.

**Key words:** adverse effects, drugs, program module, multiuser mode, interface, information and diagnostic database.



## Оценка иммунокорригирующей активности производных бензимидазола на фоне циклофосфановой иммуносупрессии

М.А.Самотруева\*, Д.Ш.Дубина\*, С.А.Лужнова\*\*

\* Астраханская государственная медицинская академия Росздрава, Астрахань

\*\* НИИ по изучению лепры Росздрава, Астрахань

В эксперименте на мышах линии СВА исследовали иммунокорригирующую активность конденсированных производных бензимидазола. Установлено, что применение соединений этого химического класса приводит не только к отмене ингибирующего действия циклофосфана на активность Т- и В-лимфоцитов, но и к стимулирующему действию этих веществ на процессы формирования и кооперации клеточного и гуморального звена иммунного ответа.

**Ключевые слова:** производные бензимидазола, иммунокоррекция, циклофосфан.

Возможность регуляции иммунологической реактивности фармакологическими средствами делает актуальным создание веществ, позволяющих воздействовать на отдельные звенья иммуногенеза. В прикладном аспекте это означает, что необходимо разрабатывать лекарственные препараты, пригодные для иммунокоррекции многочисленных заболеваний, при которых нарушения иммунного статуса являются либо причиной патологии, либо очень существенным звеном патогенеза. Учитывая, что многие факторы окружающей среды (климатические, сезонные), пищевые факторы, стрессорные, профессиональные воздействия, возрастные изменения приводят к неблагоприятным влияниям на иммунную систему, можно предположить, что иммуностропные препараты, обладающие корригирующей активностью, необходимы не только для лечения многих патологических состояний, но, очевидно, их нужно включать также и в «фармакологию здорового человека» [10].

Перспективными в данном направлении могут являться конденсированные

производные имидазо(1,2 $\alpha$ )бензимидазола, обладающие широким спектром биологической активности и низкой токсичностью [6]. Вещества данной химической группы проявляют антиоксидантные, гипогликемические, антиагрегантные, гепатопротекторные, церебропротекторные, актопротекторные и антиаритмические свойства [2, 3, 4, 5, 7, 9, 11].

**Целью** нашего исследования явилось экспериментальное изучение возможной коррекции клеточного и гуморального звена иммуногенеза соединениями под лабораторными шифрами РУ-185, РУ-254, РУ-284 и РУ-355 на фоне циклофосфановой иммуносупрессии.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на 120 мышах линии СВА обоего пола 3–4 месячного возраста, массой 18–20 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ФГУ «НИИ по изучению лепры Росздрава» (г. Астрахань).

Исследуемые производные бензимидазола вводили внутривентриально в течение семи дней, начиная за три дня до иммунизации, в дозах, соответствующих 1/20 ЛД<sub>50</sub>. Подав-

ление иммуногенеза вызывали применением циклофосфана в дозе 100 мг/кг в день иммунизации.

Контролем I служили иммунизированные мыши, получавшие циклофосфан. В качестве контроля II – иммунизированные животные, получавшие вместо препаратов 0,5 мл дистиллированной воды.

В первой серии изучали возможность коррекции производными бензимидазола «циклофосфановой» депрессии клеточного звена иммунного ответа на ЭБ в реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ); во второй – гуморального звена иммуногенеза в реакции прямой гемагглютинации (РПГА).

Для иммунизации при постановке РГЗТ использовали оптимальную дозу ЭБ –  $2 \times 10^8$  в 0,2 мл, разрешающую дозу –  $10^8$  ЭБ в 0,05 мл физиологического раствора. Антигенную стимуляцию при постановке РПГА проводили подкожным введением субоптимальной дозы ЭБ  $2 \times 10$  в 0,2 мл дистиллированной воды [8].

Все манипуляции с животными проводили, соблюдая международные принципы Хельсинской декларации [1]. Результаты были обработаны статистически с использованием программы StatGraph с применением *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты.** Результаты исследования иммунокорригирующей активности про-

изводных бензимидазола представлены в таблицах 1 и 2.

Как видно из данных табл. 1, применение алкилирующего соединения из группы хлорэтиламинов – циклофосфана – в дозе 100 мг/кг в день антигенной стимуляции привело к значительному нарушению формирования РГЗТ, что проявилось в снижении индекса реакции по сравнению с контролем II, практически в 3 раза ( $p < 0,01$ ). Кроме того, циклофосфан также вызывал угнетение и антителигенеза с  $0,84 \pm 0,06$  до  $0,48 \pm 0,03$  ( $p < 0,001$ ) (табл. 2).

Курсовое введение химических соединений, известных под лабораторными шифрами РУ-185, РУ-254, РУ-284 и РУ-355 (в дозах 11,3 мг/кг, 13,75 мг/кг, 9,75 мг/кг и 6,75 мг/кг соответственно), привело к выраженной стимуляции реакции гиперчувствительности замедленного типа (по сравнению с контролем I и II). При этом вещества РУ-185 и РУ-284 вызвали увеличение реакции местной сенсibilизации по сравнению с контролем II более чем в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ) и более чем в 6,5 раз по сравнению с группой животных, получавших только циклофосфан ( $p < 0,001$ ).

Введение производного бензимидазола под шифром РУ-355 на фоне экспериментальной иммуносупрессии также привело к значительной стимуляции клеточной инфильтрации. Индекс реакции ГЗТ

Таблица 1

Корригирующее влияние производных бензимидазола на показатели РГЗТ у мышей

Шифр соединения	Индекс реакции ГЗТ (%)	Статистические показатели при сравнении с контролем I		Статистические показатели при сравнении с контролем II	
		t	P	t	P
РУ-185	$39 \pm 4,3$	7,4	<0,001	5,3	<0,001
РУ-254	$27 \pm 2,8$	7,1	<0,001	3,9	<0,01
РУ-284	$37,4 \pm 5,8$	5,4	<0,001	3,8	<0,01
РУ-355	$40 \pm 4,2$	8,0	<0,001	5,7	<0,001
Контроль I (циклофосфан)	$5,6 \pm 1,2$			4,1	0,01
Контроль II (H <sub>2</sub> O)	$14,2 \pm 1,8$				

## Корригирующее влияние производных бензимидазола на показатели РПГА у мышей

Шифр соединения	Титры антител в РПГА ( $\log_2$ )	Статистические показатели при сравнении с контролем I		Статистические показатели при сравнении с контролем II	
		t	P	t	P
РУ-185	1,5 ± 0,16	6,3	< 0,001	3,8	< 0,01
РУ-254	1,1 ± 0,09	6,8	< 0,001	2,7	< 0,05
РУ-284	1,53 ± 0,09	11,6	< 0,001	6,9	< 0,001
РУ-355	0,93 ± 0,09	5,0	< 0,001	0,9	> 0,05
Контроль I (циклофосфан)	0,48 ± 0,03			6,0	< 0,001
Контроль II (H <sub>2</sub> O)	0,84 ± 0,06				

увеличился почти в 3 раза, если сравнивать с группой мышей, не получавших препараты ( $p < 0,001$ ) и более чем в 7 раз по сравнению с экспериментальной моделью иммунодепрессии ( $p < 0,001$ ).

В условиях лекарственной иммунодепрессии химическое соединение РУ-254 также стимулировало клеточное звено иммуногенеза: иммунный ответ не только достигал уровня контроля II, но и превышал его в 2 раза ( $p < 0,001$ ).

О влиянии исследуемых производных бензимидазола на функционирование гуморального звена иммунного ответа у мышей с индуцированной иммунодепрессией судили по их способности к формированию в крови антиэритроцитарных антител (табл. 2).

Установлено, что всем исследуемым веществам присущ иммунокорригирующий эффект. Максимальное воздействие наблюдалось при использовании РУ-185 и РУ-284, когда уровень титра антител повысился более чем в 3 раза по сравнению с циклофосфановой иммунодепрессией ( $p < 0,001$ ), что свидетельствовало не только о корригирующем, но и о активирующем влиянии на процесс антителообразования.

Аналогичная направленность наблюдалась в действии и другого исследуемого вещества, известного под лабораторным шифром РУ-254: количество антиэритроцитар-

ных антител при использовании этого соединения достоверно увеличилось по сравнению с контролем II в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), а по сравнению с экспериментальной моделью иммунодепрессии — в 2,3 раза.

Иммуностимулирующая активность производного бензимидазола РУ-355 несколько отличалась от действия выше описанных веществ. На фоне циклофосфановой иммуносупрессии соединение РУ-355 достоверно значительно увеличивало в крови количество антител к ЭБ (в 2 раза, при  $p < 0,001$ ). Но, в отличие от соединений РУ-284 и РУ-254, вещество РУ-355 выраженного стимулирующего действия на процесс антителообразования не оказывало (табл. 2): титр антител при этом увеличился всего на 0,09 ( $p < 0,1$ ).

**Выводы.** Использование новых производных бензимидазола приводит не только к отмене ингибирующего действия циклофосфана на активность Т- и В-лимфоцитов, но и проявляется как результат стимулирующего действия этих веществ на процесс формирования и кооперации клеточного и гуморального звена иммунного ответа.

Таким образом, изучаемые нами конденсированные производные имидазо(1,2 $\alpha$ )-бензимидазола РУ-185, РУ-254, РУ-284 и РУ-355, обладающие иммуностимулирующими и иммунокорригирующими свой-

ствами, являются перспективными соединениями для создания на их основе высокоэффективных иммуномодуляторов.

### Литература

1. *Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В.* Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных // *Качественная клиническая практика*, № 1, с. 24-28, 2002.
2. *Дудченко Г.П.* Противодиабетическая активность производных бензимидазола // *Автореф. ... д-ра мед. наук.* – Волгоград, 35 с., 2001.
3. *Островский О.В.* Фармакология антиоксидантов - конденсированных производных бензимидазола: *Автореф. ... д-ра мед. наук.* – Волгоград, 38 с., 1996.
4. *Салазников О.А.* Влияние гипогликемических средств на гемостаз и реологию крови: *Автореф. ... канд. мед. наук.* – Волгоград, 29 с., 2001.
5. *Сеньчуков И.Д.* Исследование влияния производного имидазо(1,2 $\alpha$ )бензимидазола на систему мозгового кровообращения в условиях радиационного воздействия: *Автореф. ... канд. фарм. наук.* – Пятигорск, 23 с., 2001.
6. *Спасов А.А., Иёжица И.Н., Бугаева Л.И., Анисимова В.А.* Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола // *Хим.-фарм. журнал*, № 5, с. 6-17, 1999.
7. *Степанов А.В.* Фармакокинетика производных имидазобензимидазола, оказывающих антиаритмическое действие: *Автореф. ... канд. мед. наук.* – Волгоград, 25 с., 2001.
8. *Хаитов Р.М., Гуцин И.С., Пинегин Б.В.* Методические указания по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ: Руководство по экспериментальному изучению фармакологических веществ. – М.: Минздрав РФ, с.257-263, 2000.
9. *Цибанев А.В.* Поиск средств, повышающих работоспособность и процессы восстановления среди производных имидазо(1,2 $\alpha$ )бензимидазола, проявляющих антиоксидантную активность: *Автореф. ... канд. биол. наук.* – Волгоград, 30 с., 1991.
10. *Черешнев В.А., Кеворков Н.Н., Бахметьев Б.А. и др.* Физиология иммунной системы и экология // *Иммунология*, № 3, с. 12-16, 2001.
11. *Шипов А.А.* Гепатопротекторные свойства новых конденсированных производных бензимидазола, проявляющих антиоксидантное действие: *Автореф. ... канд. мед. наук.* – Волгоград, 26 с., 1994.

## THE ESTIMATION OF IMMUNOCORRECTING ACTIVITY OF BENZIMIDAZOL DERIVATIVES ON THE BASE OF CYCLOPHOSPHANE IMMUNOSUPPRESSION

M.A.Samotrueva, D.SH.Dubina, S.A.Luzhnova

*Astrakhan State Medical Academy, Russian Health Service FSM, Astrakhan  
SRI of Studing Lepra of RHS, Astrakhan*

Immunocorrecting activity of benzimidazol condensed derivatives was investigated in experiments on CBA line mice. It was found out that compounds of such chemical class may lead not only to termination of inhibiting effect of cyclophosphane on T- and B-lymphocytes activity, but also to stimulating action of these substances on the processes of formation and cooperation of cellular and humoral parts of immune reaction.

**Key words:** benzimidazol derivatives, immunocorrection, cyclophosphane.

## Сравнение интенсивности галоперидоловой каталепсии у интактных и овариоэктомированных самок крыс в разное время суток

Э.А.Манвелян, В.А.Батурин

*Ставропольская государственная медицинская академия, Ставрополь*

В экспериментах на белых крысах-самках линии Wistar сравнивали интенсивность галоперидоловой каталепсии (0,5 и 1 мг/кг) у интактных и овариоэктомированных самок крыс в утреннее (8-10 ч) и вечернее (18-20 ч) время суток. Оценку выраженности каталепсии проводили путем регистрации длительности удержания животным заданного вертикального положения в позе «лектора». Выполненное исследование показало, что имеет место расхождение каталептогенного эффекта галоперидола. При этом действие нейролептика зависело от времени суток, сохранности эстрального цикла. Наиболее выраженной каталепсия была у интактных самок в вечерние часы. После удаления яичников каталептогенное действие нейролептического средства было заметно утром, а в вечернее время заметно ослаблялось.

**Ключевые слова:** галоперидоловая каталепсия, овариоэктомия, самки, утро, вечер.

Широкое применение нейролептиков в клинической практике делает актуальными нейрофармакологические исследования на животных. За последние годы достигнуты несомненные успехи в изучении механизмов специфической активности нейролептиков. Однако хронофармакология антипсихотических средств в женском организме остается изученной крайне слабо. Накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о вовлечении дофаминергической системы в эффекты нейролептиков [1, 2]. Для оценки функционального состояния дофаминергической передачи широко используется блокатор дофаминовых рецепторов – галоперидол и вызываемое им состояние каталепсии [1, 2, 5, 6, 7].

Вместе с тем, большой интерес представляет направленное выяснение особенностей влияния уровня половых гормонов на фармакологические эффекты лекарственных средств. В этой связи целью настоящего исследования была хронобиологическая оценка выраженности галоперидоловой каталепсии у интактных и овариоэктомированных (ОЭ) самок крыс.

### Материалы и методы

Опыты были выполнены на белых половозрелых интактных и овариоэктомированных самках крыс линии Wistar со средней массой 170-200 г, получаемых из питомника «Рапполово». Животных содержали в клетках-ваннах (по 5-6 крыс) при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного режима. Кормление (комбикорм) и уход осуществляли в привычном для животных режиме вивария. Обеспечивался свободный доступ крыс к пище и воде.

Для моделирования нейролептической каталепсии препарат вводили в дозах 0,5 и 1 мг/кг внутривенно. Через час после инъекции приступали к оценке выраженности каталепсии путем регистрации (сек.) длительности удержания животным заданного вертикального положения на опоре (так называемая поза «лектора»). Выполняли 10 определений у каждой особи, при этом регистрировали время, когда крыса убирала с опоры первую лапу (первый результат) и вторую лапу (второй результат). Эксперименты проводили утром (8-10 ч) и вечером (18-20 ч). Овариоэктомию выполняли по общепринятой методике [3].

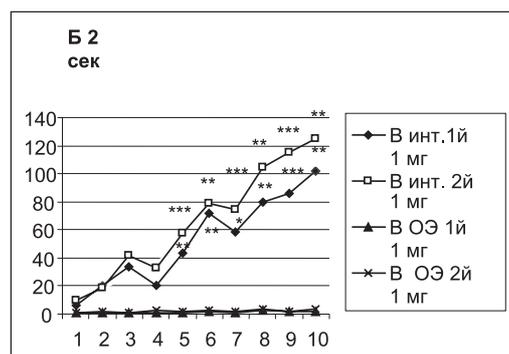
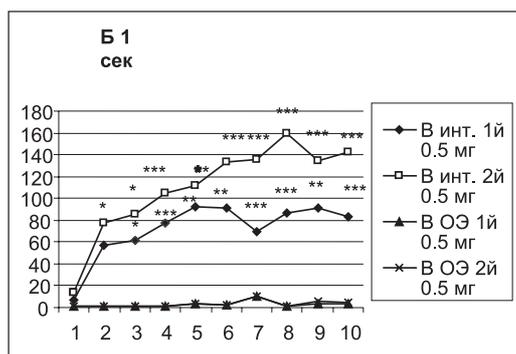
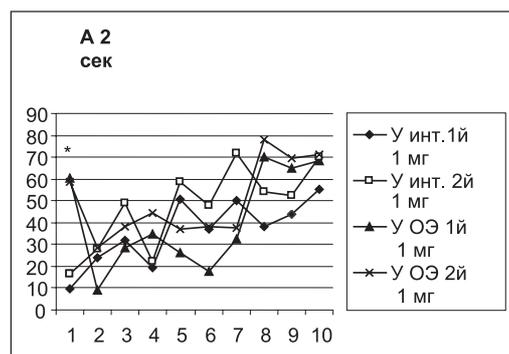
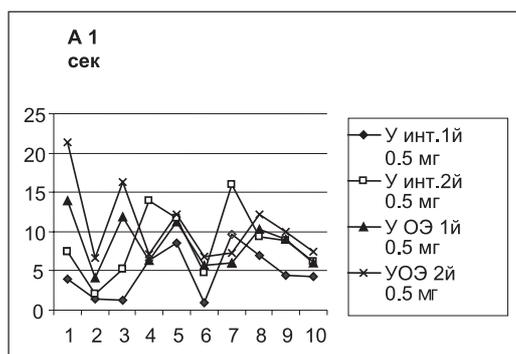
Результаты обрабатывали с использованием стандартных компьютерных программ. Достоверность обнаруженных отличий определяли при помощи критериев Стьюдента, Вилкоксона-Манна-Уитни.

### Результаты

Анализ результатов показал, что у интактных самок крыс на фоне введенной дозы препарата 0,5 мг/кг в утренние часы катаlepsия была не существенной. Однако вечером наблюдали четко выраженную катаlepsию ( $p < 0,001$ ) по сравнению с утренними результатами. С увеличением дозы нейролептика у самок катаlepsия была выше, при этом в вечернее время она была более выражена.

У ОЭ самок в утренние часы галоперидол в дозе 0,5 мг/кг вызывал слабо выраженную катаlepsию, существенно не отличающуюся по интенсивности у интактных крыс (рис. 1). Вечером на фоне малой дозы нейролептика у ОЭ самок заметной катаlepsии не отмечали. С увеличением дозы галоперидола (1 мг/кг) в утренние часы интенсивность катаlepsии была такой же, как и у интактных самок. Важно отметить, что в вечерние часы у ОЭ особей нейролептик в большей дозе, так же как и в малой, проявлял менее выраженное катаlepsитогенное действие.

Следовательно, после удаления яичников катаlepsитогенная активность галоперидола в вечернее время заметно ослаблялась,



Выраженность галоперидоловой катаlepsии у интактных и овариоэктомированных самок крыс в утреннее (А) и вечернее (Б) время. По оси абсцисс обозначены определения, по оси ординат — время удержания самок (в секундах) утром (А) и вечером (Б) первый и второй результаты. 1 — галоперидол 0,5 мг/кг, 2 — галоперидол 1 мг/кг.

\* — достоверные различия между интактными и овариоэктомированными самками крыс в одно и то же время суток при  $p < 0,05$  (\*\* — при  $p < 0,01$  и \*\*\* — при  $p < 0,001$  соответственно)

хотя у интактных самок эффект препарата был отчетливым.

Таким образом, выполненное исследование показало, что имеет место расхождение каталептогенного действия галоперидола. При этом эффект нейролептика зависел от времени суток, сохранности эстрального цикла. Наиболее выраженной каталепсия была у интактных самок в вечерние часы. После удаления яичников каталептогенное действие нейролептического средства было заметнее утром, а в вечернее время не проявлялось.

Несомненно, что указанные различия могут быть объяснены фармакокинетическими и фармакодинамическими особенностями действия антипсихотического препарата. Полученные результаты согласуются с данными о зависимости поведенческих характеристик животных от уровня половых гормонов [4, 8, 9]. Также важно подчеркнуть, что овариоэктомию сопровождается выраженным снижением плотности дофаминовых рецепторов D1 и D2 подтипов [10]. Эффекты галоперидола у интактных и ОЭ самок могут быть связаны с измененной экспрессией D2-подтипа рецепторов или эстрогеновых рецепторов, а также с изменением их связывающей способности в структурах головного мозга [11, 12, 13]. Следовательно, результаты настоящего исследования свидетельствуют о важной роли половых гормонов в поведенческих реакциях интактных и ОЭ крыс-самок.

#### Выводы

1. Интенсивность галоперидоловой каталепсии зависит от времени суток и сохранности эстрального цикла.
2. У интактных самок крыс наиболее выраженная галоперидоловая каталепсия наблюдается в вечерние часы.
3. После овариоэктомии каталептогенное действие нейролептика наблюдается утром. В вечернее время галоперидоловая каталепсия заметно ослаблена.

#### Литература

1. Арушанян Э.Б., Батурич В.А., Белозерцев Ю.А. Нейролептические средства. — Чита.1984.
2. Арушанян Э.Б. Хронофармакология. — Ставрополь: Ставрополье, 2000.
3. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. Основные методики и эксперименты эндокринологических исследований. — М.: Изд-во Московского университета, 1968.
4. Батурич В.А., Колодийчук Е.В. Половая диссимилиация эффектов кардиотропных средств. — Ставрополь: Изд-во Ставропольской государственной медицинской академии, 2003.
5. Козловский В.Л., Прахье И.В., Кенунен О.Г. Влияние блокаторов кальциевых каналов на эффекты галоперидола и фенамина у мышей и крыс // *Эксперим. и клин. фармакол.*, т. 59, № 3, с. 12-15, 1996.
6. Коршунов А.М., Воронина Т.А., Чурыканов В.В., Яхно Н.Н. Влияние галоперидола в малой дозе на развитие синдрома паркинсонизма в эксперименте // *Эксперим. и клин. фармакол.*, т. 58, № 6, с. 7-9, 1995.
7. Якимовский А.Ф. Сравнение эффектов галоперидола при системном введении и инъекции в стриатум у крыс // *Эксперим. и клин. фармакол.*, т. 56, № 1, с. 11-13, 1993.
8. Carlson J.N., Click S.D. Cerebral internalization as a source of interindividual differences in behavior // *Experimental*, № 45, pp. 788-790, 1989.
9. Haaren F. Van, Hest A. Van, Heinsbroc P.P.W. Behavioral differences between male and female rats: effects of gonadal hormones on learning and memory // *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.14, pp. 23-25, 1990.
10. Lammers C.H., De Souza U., Qin Z.H., et al. Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen // *Synaps*, v. 34, pp. 222-227, 1999.
11. McEwen B.S. Genome and hormones Gender differences in physiology invited review: estrogens effects on the brain multiple sites and molecular mechanisms // *J. Appl. Physiol.*, v. 91, pp. 2785-2801, 2001.
12. McEwen B.S., Alves S.E. Estrogen actions in the central nervous system // *Endocr. Rev.*, v. 20, No. 3, pp. 279-307, 1999.
13. Thompson T.L., Moore C.C., Smith B. Estrogen priming modulates autoreceptor-mediated potentiation of dopamine uptake // *Eur. J. Pharmacol.*, v. 401, pp. 357-363, 2000.

## COMPARISON OF CATALEPTOGENIC EFFECTS OF HALOPERIDOL ON INTACT AND OVARIECTOMIZED FEMALE RATS AT DIFFERENT TIME OF DAY

E.A. Manvelyan, V.A. Baturin

*Stavropol State Medical Academy, Stavropol*

In experiments, the cataleptogenic effects of haloperidol on white intact and ovariectomized females rats of Wistar line in the morning (8-10 a.m.) and in the evening (6-8 p.m.) were examined and compared. The intensity of cataleptogenic effect was estimated by the time during which an animal held its vertical position («the lecturer's pose»). Experiments have shown that the action of neuroleptic depends on the time of day and retention of an estrus cycle. Cataleptogenic action on intact females was mostly expressed at the evening. After ovariectomy, the cataleptogenic effect of the neuroleptic means was noticeable in the morning, while in the evening it was substantially attenuated.

**Key words:** haloperidol's catalepsy, ovariectomy, females, morning time, evening time.

## Нейрофизиологические индикаторы центрального действия различных психотропных средств

В.Н. Каркищенко, С.П. Матуа, В.П. Омельченко

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН*

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону*

На взрослых кошках изучалось влияние одномоментного перорального введения мелипрамина, амитриптилина, новерила и пиразидола. Регистрировались и анализировались электроэнцефалограммы (ЭЭГ) 8 церебральных структур. На основе кластерного анализа было выявлено увеличение мощности в области дельта- и тета-активности мозга при ее снижении в других частотных диапазонах. При этом каждый антидепрессант имел свою специфическую структуру спектров.

**Ключевые слова:** электроэнцефалограммы мозга, психотропные средства, кластерный анализ.

Диагностическая информативность анализа электроэнцефалограмм (ЭЭГ) при различных состояниях у больных, а также при действии психотропных средств (ПС) может быть повышена благодаря использованию мультидисциплинарного подхода. Использование кластерного анализа во время регистрации ЭЭГ позволяет получить ценную информацию о развитии во времени нервных процессов при изменениях психической деятельности [1]. Таким образом, становится возможным выяснить динамику нарушений механизмов интегративной деятельности мозга, лежащих в основе исследуемых состояний. С другой сто-

роны, информативность ЭЭГ-показателей может значительно повышаться за счет применения не только классических статистических методов, но и нового подхода к анализу ЭЭГ-данных, получившего в последнее время самое широкое распространение в различных методах компьютерного анализа [3, 4, 6]. Таким образом, клинико-нейропсихофизиологическое и экспериментальные исследования функционального состояния мозга при действии ПС может быть направлено на решение задач, важных как в теоретическом, так и в практическом отношениях [2].

### Материал и методы

Проведено 62 хронических опыта на взрослых кошках обоего пола массой 3-4 кг. Подготовка животных к эксперименту проводилась поэтапно. После взвешивания их наркотизировали внутривенно 2%-м раствором нембутала (этаминал натрий) из расчета 35-40 мг на 1 кг массы. Операции по вживлению электродов осуществлялись в стереотаксическом аппарате типа «МВ-4101» венгерской конструкции в стерильных условиях. Продольным разрезом над срединным швом рассекали кожу головы животного, отслаивали ее от костей черепа над обоими полушариями и обнаженную поверхность тщательно обезжировали 33%-м раствором перекиси водорода.

Ориентация электродов в исследуемые области мозга производилась в соответствии с координатами стереотаксических атласов для кошек Jasper, Ajmont-Marsan [7] с поправками по методике В.А.Черкеса и др. [5], после чего зубным бором высверливали отверстия в костях черепа. Имплантированные электроды подпаивались к панели девятиконтактной лампы и крепились на черепе с помощью пластмассы протакрил. В качестве электродов использовали константановую проволоку в фабричной изоляции с диаметром активного кончика 100 мкм. Отведение электрограмм различных отделов мозга осуществляли монополярно, при этом референтный электрод располагали в носовых костях черепа.

Животных брали в эксперимент через 7-10 дней после операции и перед каждым опытом их адаптировали к экспериментальным условиям. Во время опытов они находились при свободном содержании в специально оборудованной камере. Интервалы между экспериментами на одном и том же животном составляли 5-7 суток.

В каждом опыте производились одновременная регистрация и анализ электрограмм 8 церебральных структур. В сенсомоторную область коры больших полушарий

электроды имплантировались субдурально в симметричные зоны справа и слева от брегмы, латерально — на 3-5 мм. В зрительной зоне коры электрод ориентировали на 2-4 см сзади от проекции нулевого фронтального уровня и латерально — на 4-6 мм. Одновременно регистрировали ЭГ следующих подкорковых структур: дорсальный гиппокамп, задний гипоталамус, медиодорсальное ядро таламуса, ретикулярное ядро покрышки, средний мозг, хвостатое ядро.

Электрограммы мозга животных регистрировались на электроэнцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» до и через 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 часа после одномоментного перорального введения исследуемых препаратов: мелипрамин (12 мг/кг), амитриптилин (6 мг/кг), новерил (20 мг/кг), пиазидол (6 мг/кг).

Спектральные характеристики электрограмм мозга определялись с помощью быстрого преобразования по Фурье в диапазоне 1-30 Гц. Для описания ЭГ на каждом этапе исследования, с учетом стационарности, усреднялись нормированные спектры мощности 5 следующих друг за другом 8-секундных отрезков.

Электрограммы (ЭГ) мозга обрабатывались с помощью программ Statistica 6.0 по методу кластерного анализа (mean clustering). Было выделено 4 «значимых» кластера, т.е. кластера с достоверным ( $p < 0,05$ ) преобладанием паттернов ЭГ с наибольшими вероятностями встречаемости в анализируемой выборке.

В качестве анализируемого параметра выступало усредненное стандартное отклонение от центра кластера в «значимых» кластерах. Критерий оптимума — выход на плато графика зависимости среднего стандартного отклонения от центра кластера.

### Результаты и обсуждение

Переходя к рассмотрению структуры спектров ЭГ мозга животных, следует отметить, что кластерный анализ позволяет выделить несколько значительно коррелиру-

ющих между собой переменных в один кластер. Каждая группа переменных, входящих в один кластер, предполагает наличие единого механизма, их объединяющего.

Проведенный анализ классификации спектров ЭГ мозга животных показал, что на первые четыре кластера приходилось до 85 % всей дисперсии спектров мозга. Первый кластер (41,9 %) был связан с диапазоном частот в области 14-20 Гц, второй (23,1%) описывал реципрокные отношения 1-2 и у 10 Гц. Третий кластер (14,1%) характеризовал наличие связи между частотами 1-2 и 4-6 Гц. Частотные составляющие в области 11-14 Гц наиболее тесно коррелировали с четвертым кластером (6,3%).

Анализ структуры спектров ЭГ каждого отведения выявил специфику организации электрической активности исследованных отделов мозга животных. В зрительной коре на первое место выходили частоты в диапазоне 7-10 Гц, а на второе — 11-14 Гц и 18-20 Гц. Для дорсального гиппокампа было характерно наличие кластера, тесно связанного с частотами в области 6-7 Гц, который в других структурах в единичный кластер не выделялся. Почти идентичная структура спектров ЭГ отмечалась в электрической активности заднего гипоталамуса и медиодорсального ядра таламуса. В электрической активности ретикуло-теgmentарного ядра реципрокные отношения между 1-2 и 3-6 Гц выходили на второе место, а частотный диапазон 7-10 Гц коррелировал с третьим кластером, что было характерно также и для дорсального гиппокампа. В спектрах ЭГ хвостатого ядра второй кластер был связан с частотами в области 9-14 Гц, что отмечалось также и в спектрах ЭГ зрительной коры.

Таким образом, кластерный анализ выявил характерные особенности в структуре спектров ЭГ каждого образования, причем некоторые из них, а именно: сходство организации спектров конралатеральных отделов сенсомоторной коры, доминирующая роль 7-10 Гц зрительной коре и 6-7 Гц в гип-

покампе соответствуют известным коррелятам функциональной активности этих отделов мозга, указывает на закономерность установленных отличий.

Общей особенностью спектров ЭГ мозга животных следует признать наличие реципрокной связи  $\delta$ -диапазона с другими частотными диапазонами, что может свидетельствовать о наличии общих механизмов, изменяющих мощность этих частотных составляющих. Кроме того, во всех исследованных структурах, за исключением зрительной коры, первый кластер коррелировал с диапазоном 15-20 Гц. Отметим, что плацебо не вызывало существенных изменений в организации спектров ЭГ мозга.

Для действия антидепрессантов были характерны перестройка организации ритмической активности мозга и изменение вклада выделенных кластеров в дисперсию спектров ЭГ. Действие мелипрамина в дозе 6 мг/кг, по сравнению с фоном, приводило к возрастанию роли кластера, связанного с увеличением в диапазоне 3-4 Гц. Следующий по значимости кластер отражал реципрокные связи между 1-2 и 7-8 Гц. Отмеченное увеличение мощности 1-2 Гц и снижение в области 6-8 Гц имеет единый механизм, очевидно, связанный с угнетением гиппокампальных тормозных эффектов под действием данной дозы мелипрамина.

Мелипрамин в дозе 12 мг/кг также вносил основные изменения в диапазон 3-5 Гц, однако они были реципрокно связаны с частотами 14-20 Гц. Сравнивая эти данные с результатами спектрального анализа, можно предположить наличие единого механизма в генезе указанных частот, связанного с угнетением активирующих (в частности ретикулярной формации) и одновременным усилением тормозных (синхронизирующих) систем мозга.

При действии amitриптилина в дозе 6 мг/кг первый кластер был связан с частотами в области 8-12 Гц, второй — отражал реципрокную связь между 1-2 и 3-5 Гц. Частоты в области 5-7 Гц были связаны с тре-

тым кластером. Учитывая данные спектрального анализа, следует предположить, что действие amitriptilina приводит к угнетению  $\alpha$ -активности и увеличению  $\theta$ -активности. Это подтверждается тем, что наиболее значимое возрастание 6-7 Гц отмечалось в ЭГ медиодорсального ядра таламуса и гиппокампе.

Новерил в дозе 20 мг/кг, подобно amitriptilinu, наибольшие изменения вызывал в области 8-12 Гц, однако второй кластер был связан с частотами в диапазоне 15-20 Гц, третий - 6-7 Гц и лишь четвертый отражал разнонаправленные изменения в области 1-2 и 3-5 Гц. Можно предположить, что новерил, как и amitriptilin, в большей степени влияет на таламо-кортикальные отношения, вызывая значительное снижение альфа-активности. Увеличение мощности дельта-ритма при этом сопровождается ее снижением в области тета-диапазона.

При действии пиразидола (6 мг/кг) на первое место выходил кластер, описывающий реципрокные взаимоотношения между частотами в области 4-8 и 15-20 Гц. Второй кластер был связан с 7-9 Гц, а третий - с 1-2 Гц. Первый кластер указывал на наличие единого механизма, связывающего увеличение мощности в области 4-6 Гц и ее снижение в диапазоне 15-20 Гц.

#### Выводы

Кластерный анализ показал, что для действия всех антидепрессантов общим является увеличение мощности в области дельта- и тета-активности за счет ее сни-

жения в других частотных диапазонах. В то же время, каждый антидепрессант имеет специфическую структуру спектров ЭГ мозга, что связано с особенностями их активирующих или угнетающих влияний на различные отделы мозга и на межцентральные взаимоотношения.

#### Литература

1. *Верхлютов В.М., Щучкин Ю.В., Ушаков В.Л.* Статистическая оценка различий источников альфа- и тета-ритмов ЭЭГ с использованием кластерного анализа в норме и у больных шизофренией // *library.mephi.ru/data/scientific-sessions/2005/t5/0-I-II.doc*
2. *Жирмунская Е.А.* О преодолении традиций, сложившихся в электроэнцефалографии // *Физиология человека, т. 17, вып. 2, с. 147-154, 1991.*
3. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Том.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. — М: *Изд-во ВПК, 448 с., 2007.*
4. *Омельченко В.П., Матуа С.П., Гришин А.Д.* Компьютерный анализ электрограмм мозга при действии некоторых психотропных средств // *Фармакол. и токсикол., т. 52, № 3, с. 18-22, 1989.*
5. *Черкес В.А., Олешко КН., Ваколюк Н.И., Луханова Е.П.* Физиология головного мозга. — Киев, 1976.
6. *Itil T.M., Menon G.N., Dreyfus J.-F. et al.* Central effects and effective dose determination of suriclone (double-blind, controlled, phase I safety and quantitative pharmacology-EEG study) // *Drug Development Research. Vol. 4. Issue 2, Pages 155 - 165. Published Online: 5 Oct 2004.*
7. *Jasper H.H., Ajmone-Marsan C.A.* Stereotaxic Atlas of Diencephalon of the Cat. - *Ottawa, 1954.*

## NEUROPHYSIOLOGICAL INDICATORS OF CENTRAL ACTION FOR DIFFERENT PSYCHOTROPIC DRUGS

V.N.Karkischenko, S.P.Matua, V.P.Omel'chenko

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Rostov State Medical University, Rostov-on-Don*

The influence of one time administration of melipramine, amitriptilin, noveril and pirasidol *per os.* on cats was studied. EEGs of 8 cerebral structures were fixed and analyzed. Cluster analysis revealed that the power increased in  $\delta$ - and  $\theta$ -activity ranges and decreased within other frequency ranges.

**Key words:** cerebral EEG, psychotropic drugs, cluster analysis.



## Фармакоэпидемиологическое изучение половых особенностей потребления лекарственных средств

Е.В. Колодийчук, М.В. Дерева, И.В. Терентьева, В.А. Батурич

*Ставропольская государственная медицинская академия, Ставрополь*

Проведен ретроспективный анализ (2002–2007 гг.) использования кардиотропных средств у 1110 пациентов с основным диагнозом ИБС, стенокардии напряжения, ФК II–III, Н<sub>2</sub>А. Оценивали сложившуюся практику использования сердечно-сосудистых средств, в том числе определяли использование препаратов отдельно женщинами и мужчинами. По сравнению с мужчинами, больными ИБС, женщины получали более интенсивную фармакотерапию. У них чаще происходила смена препаратов, период стационарного лечения был более длительным, затраты на лечение были выше. Особенно существенны были расходы на проведение дополнительной терапии (нейротропные средства и НПВС).

**Ключевые слова:** фармакотерапия, половые различия, ишемическая болезнь сердца.

Опыт изучения потребления лекарственных средств в системе обязательного медицинского страхования (ОМС) показал, что масштабы использования медикаментов зависят от многих факторов. Важную роль играет отношение врачей к определенным группам лекарственных средств и к конкретным препаратам. При этом большое значение имеет изучение специалистами научной и методической литературы, знакомство с документами фармацевтических компаний, ориентация на мнение коллег. Вместе с тем определяющим для врача является его собственный опыт применения препарата, в связи с чем формируется арсенал лекарственных средств, наиболее часто используемых этим специалистом при лечении пациентов [3]. Очевидно также и то, что врач всегда стремится добиться терапевтического результата, поэтому интенсивность назначения медикаментов прямо связано с их эффективностью. Таким образом, фармакоэпидемиологические исследования потребления лекарственных средств определенными

большими группами населения могут характеризовать эффективность и безопасность конкретных препаратов [3].

В последние годы внимание исследователей и практических врачей привлекает неоднозначное действие лекарственных средств на мужской и женский организм. Несмотря на то, что половые отличия в действии лекарственных веществ известны уже давно [1, 2], фармакоэпидемиологическая оценка данного феномена не проводилась. Поэтому представлялось целесообразным изучить масштабы потребления сердечно-сосудистых средств у больных ИБС мужчин и женщин.

### Материал и методы исследования

Был проведен ретроспективный анализ использования кардиотропных средств у 1110 пациентов, находившихся на стационарном лечении в Ставропольском кардиологическом диспансере в 2002–2007 гг. с основным диагнозом: ИБС, стенокардии напряжения, ФК II–III, Н<sub>2</sub>А. При этом изучались анамнестические данные использо-

вания лекарственных препаратов на догоспитальном этапе лечения, а также оценивались назначения, сделанные в стационаре. Определяли использование сердечно-сосудистых средств в целом для всех больных в динамике за периоды 2002-2003 гг. и 2004-2007 гг., а также определяли использование препаратов отдельно женщинами и мужчинами.

### Результаты исследования

Согласно данным за 2002-2003 гг., в амбулаторных условиях наиболее часто применяемыми препаратами были пролонгированные нитраты (их постоянно принимали 52% пациентов). На втором месте по частоте применения находились антагонисты кальция, которые использовали в лечении ИБС 31,9% больных. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ) регулярно употребляли 27,2% пациентов, а бета-адреноблокаторы применяли 12,8% больных. Лекарственные препараты метаболического действия и диуретики использовали, соответственно, 11,3% и 16,9% пациентов.

Проведенный сравнительный анализ лекарственного анамнеза у женщин (480 больных) и мужчин (350 больных) с ИБС показал, низкую приверженность пациентов к фармакотерапии в амбулаторных условиях. Только 54,7% женщин соблюдали рекомендации лечащего врача. При этом наиболее часто женщины принимали нитраты – 48,1% пациенток. На втором месте по частоте использования находились антагонисты кальция, которые использовали 35,8% больных женщин. ИАПФ регулярно употребляли 25,8% пациенток. Бета-адреноблокаторы применяли 13,1%, а метаболические препараты и диуретики использовали, соответственно, 11,5% и 17,3% женщин.

У мужчин приверженность к рекомендованной медикаментозной терапии в амбулаторных условиях была несколько большей – 59,7%. При этом наиболее часто используемыми у мужчин с ИБС были также

нитраты – 57,4%, что превышает потребление данных препаратов у женщин. Антагонисты кальция использовались регулярно 26,6% больных. Бета-адреноблокаторы применяли 12,3%, а ИАПФ – 23,4% больных мужчин. Диуретики и метаболические препараты регулярно принимали, соответственно, 16,2% и 11,1% пациентов-мужчин. Важно подчеркнуть, что женщины несколько чаще мужчин употребляли антагонисты кальция (35,8%), ИАПФ (25,8%) и диуретики. Метаболические препараты использовались в равной мере мужчинами и женщинами.

В условиях стационара (2002-2003 гг.) практически все пациенты (88,6%) в качестве базисной терапии получали пролонгированные нитраты. Антагонисты кальция были назначены в 66,7%, ИАПФ использовались у 53,1% больных, в 41,6% случаев применялись бета-адреноблокаторы. Диуретическая терапия была назначена у 56,9% больных; препараты метаболического действия – у 54,9% пациентов. Достаточно часто в условиях стационара больным назначали психотропные средства.

При сравнительном анализе потребления лекарственных средств в условиях стационара у женщин и мужчин с ИБС было отмечено, что у женщин было сделано большее количество назначений лекарственных препаратов –  $10,3 \pm 0,5$ . При лечении мужчин было сделано меньше назначений –  $8,4 \pm 0,8$  ( $p < 0,05$ ). Наиболее часто (89,2%) в качестве базисной терапии у женщин применялись нитраты. Антагонисты кальция были назначены в 71,7% случаев. ИАПФ использовались у 62,4% больных женщин, у 44,8% пациенток были применены бета-адреноблокаторы. Диуретическая терапия была назначена в 67,1% случаев. Препараты метаболического действия были назначены в 64,2%. У 79,6% женщин возникла необходимость в приеме психотропных средств. Так, транквилизаторы (феназепам) были присоединены к антиангинальным препаратам у 61,7% пациенток,

нейролептики (эглонил) – у 7,1%, антидепрессанты (коаксил, amitриптилин) были использованы у 10,8% больных женщин.

У мужчин с ИБС (350 человек) также часто, как и у женщин использовались нитропрепараты (87,7%). Несколько реже применялись антагонисты кальция (60%). Бета-адреноблокаторы были назначены 36,9% больным, ИАПФ – 40,6%, диуретическая терапия проводилась у 43,4% пациентов. Препараты метаболического действия использовались только у 42,3% мужчин. Необходимо отметить, что транквилизаторы у мужчин применялись также активно, как и у женщин (59,1%), тогда как антидепрессанты в данной группе больных не использовались.

В 2004–2007 гг. было отмечено изменение в структуре потребления лекарственных средств. Вероятно, это обусловлено внедрением формулярной системы и стандартов фармакотерапии. Так, наиболее часто употребляемыми препаратами стали ИАПФ (50,66%). На втором месте по частоте применения были нитраты, которые использовали 41,6% больных. Заметно увеличилось потребление бета-адреноблокаторов (биспролол, атенолол, метопролол) с 12,8% до 39,6%. Антагонисты кальция (пролонгированные формы нифедипина, дилтиазема, верапамила) были назначены 21,7% пациентов. Лекарственные препараты метаболического действия (предуктал, милдронат, рибоксин) и диуретики принимали, соответственно, 25,3% и 20% пациентов. Антиагрегантные препараты (АСК) были назначены 36% пациентов.

У женщин с ИБС по сравнению с предыдущим периодом возросло использование ИАПФ с 25,8% до 52,4%, бета-адреноблокаторов с 13,1% до 41,4%, диуретиков с 16,2% до 39%, метаболических препаратов с 11,5% до 36,5%. Антагонисты кальция стали использоваться реже – у 29,8% пациенток.

У мужчин с ИБС за последние годы, также как и у женщин, увеличилось ис-

пользование ИАПФ с 23,4% до 35,9%, бета-адреноблокаторов с 12,3% до 40,3%, метаболических препаратов с 11,1% до 28%. Впрочем, уменьшилось использование антагонистов кальция с 35,8% до 10,5%.

При анализе использования кардиотропных препаратов в стационаре за 2004–2007 гг. было отмечено снижение среднего количества назначенных лекарственных препаратов.

Практически все пациенты (72,66%) в качестве базисной терапии принимали ИАПФ. По сравнению с предыдущим периодом значительно увеличилось использование бета-адреноблокаторов с 41,6% до 68,7%, уменьшилось применение нитропрепаратов с 88,6% до 54%. Антагонисты кальция использовались у 35,3% больных, диуретики – 67%, метаболиты – 52,3% пациентов, АСК – у 79% больных.

Анализ потребления кардиотропных препаратов в стационаре у женщин и мужчин в 2004–2007 гг. показал, что мужчинам за время госпитализации было сделано  $6,7 \pm 0,9$  назначений, а женщинам –  $8,4 \pm 0,6$ . При этом практически все пациентки в качестве базисной терапии получали ИАПФ (84,1%), бета-адреноблокаторы (74,8%) и диуретики (72,5%). Нитраты были назначены 68,2% пациентам, антагонисты кальция использовались у 38,4%, метаболические препараты у 36,5% больных женщин. В качестве дезагрегантного препарата у 78% пациенток была назначена АСК. У 38,4% пациенток использовались психотропные препараты.

У исследуемых мужчин с ИБС чаще, чем у женщин, использовались нитропрепараты (80,7%). Реже используются диуретики (54,3%). Бета-адреноблокаторы были назначены 68,4% больным, ИАПФ – 72,8%, антагонисты кальция 34,2% пациентов, препараты метаболического действия использовались у 56,4% мужчин. Необходимо отметить, что 11,4% пациентов-мужчин получали гиполипидемическую терапию статинами.

Среднее количество дней пребывания в стационаре у женщин несколько выше, чем у мужчин – 13,41 и 12,53 дня соответственно.

Таким образом, по сравнению с мужчинами, больными ИБС, женщины получали более интенсивную терапию. У них чаще происходила смена препаратов, период стационарного лечения был более длительным, и поэтому затраты на лечение были выше. Особенно существенны были расходы на проведение дополнительной терапии (нейротропные средства и НПВС). В свя-

зи с этим необходимо создание новых, более гибких стандартов терапии для лечения женщин больных ИБС.

#### Литература

1. Батури В.А., Колодийчук Е.В. Половая диссимилиация эффектов кардиотропных средств. – *Ставрополь: Изд-во СтГМА, 2003.*
2. Петков В. Современная фитотерапия. – *София: Медицина и физкультура, 1988.*
3. Прикладная фармакоэпидемиология: Учебник для вузов. / Под ред. В.И.Петрова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.

#### PHARMACOEPIDEMOLOGICAL STUDY OF SEX-RELATED CONSUMPTION OF PHARMACEUTICALS

E.V. Kolodichuk, M.V. Dereva, I.V. Terentieva, V.A. Baturin

*Stavropol State Medical Academy, Stavropol*

Retrospective analysis of sex-related consumption of cardiotropic drugs has covered 1110 patients with IHD diagnosis for 2002-2007. A common practice of using cardiovascular drugs by men and women was evaluated. Compared to men, women got more intensive pharmacotherapy. They presents with more frequent change of drugs, prolonged hospital care and more expensive treatment. Adjuvant therapy, including neurotropic drugs and anti-inflammatory medicines, required extra charges.

**Key words:** pharmacotherapy, sexual differences, coronary heart disease.



## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

### Компьютерные ЭЭГ-профили как индикаторы биоэлектрической активности мозга животных

С.П. Матуа, В.Н. Каркищенко, В.П. Омельченко

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН*

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону*

Доказано, что спектральная характеристика электроэнцефалограммы мозга (ЭЭГ) кошки в достаточной степени отражает специфику действия психотропных препаратов. Это позволяет проводить классификацию препаратов, а также дает возможность исследовать нейрофизиологические действия психо- и нейротропных средств.

**Ключевые слова:** электроэнцефалограммы мозга, нейро- и психотропные средства, математические методы.

Интегральный подход к диагностике функциональных состояний мозга становится все более привлекательным в клинической и экспериментальной нейрофизиологии. Современные методы математического анализа позволяют выделить наиболее информативные показатели биоэлектрической активности с целью диагностики и прогнозирования функциональных состояний организма. Использование новых информационных технологий и математических методов в значительной степени облегчает задачу врача-исследователя по выявлению отклонений электроэнцефалограммы мозга (ЭЭГ) от нормы, проявляющихся в изменении амплитуды, спектрального состава, организации ритмов, фазовых соотношений и т.д. [1, 2, 3, 9].

Для выявления возможности классификации психотропных средств по их влиянию на биоэлектрическую активность мозга ряд авторов сравнивали полученные изменения спектральных характеристик ЭЭГ мозга при различных физиологических и патологических состояниях, а также при воздействии психотропных средств [5, 8, 11].

#### Материал и методы

На взрослых кошках обоего пола массой 3–4 кг проведено 62 хронических опыта для выявления влияния психотропных средств на биоэлектрическую активность мозга. Для снятия ЭЭГ предварительно в мозг кошек вживлялись электроды на стереотаксическом аппарате типа «МВ-4101» венгерской конструкции в стерильных условиях. Для этого кошек после взвешивания наркотизировали внутрибрюшинно 2%-м раствором нембутала (этамилал натрия) из расчета 35–40 мг на 1 кг массы. После чего продольным разрезом над срединным швом рассекали кожу головы животного, отслаивали ее от костей черепа над обоими полушариями и обнаженную поверхность тщательно обезжировали 33%-м раствором перекиси водорода.

Ориентацию электродов в исследуемые области мозга производили по стереотаксическим атласам для кошек [10] с поправками, изложенными в методике В.А.Черкеса и др. [7]. Зубным бором высверливали отверстия в костях черепа. Имплантирован-

ные электроды подпаивали к панели девятиконтактной лампы и крепили на черепе с помощью пластмассы протакрил. В качестве электродов использовали константановую проволоку в фабричной изоляции с диаметром активного кончика 100 мкм. Отведение электрограмм (ЭГ) различных отделов мозга осуществляли монополярно, при этом референтный электрод располагали в носовых костях черепа.

Эксперимент начинали через 7-10 дней после операции и перед каждым опытом животных адаптировали к экспериментальным условиям. Во время опытов они находились в свободном содержании в специально оборудованной камере. Интервалы между экспериментами на одном и том же животном составляли 5-7 суток.

В каждом опыте производились одновременная регистрация и анализ электрограмм 8 церебральных структур. В сенсорную область коры больших полушарий электроды имплантировались субдурально в симметричные зоны справа и слева от брегмы, латерально — на 3-5 мм. В зрительной зоне коры электрод ориентировали на 2-4 см сзади от проекции нулевого фронтального уровня и латерально — на 4-6 мм. Одновременно регистрировали ЭГ следующих подкорковых структур: дорсальный гиппокамп, задний гипоталамус, медиодорсальное ядро таламуса, ядро ретикулярной формации, средний мозг, хвостатое ядро.

Электрограммы мозга животных регистрировались на электроэнцефалограф-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» до и через 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 часа после одномоментного перорального введения исследуемых препаратов: мелипрамин (12 мг/кг), амитриптилин (6 мг/кг), новерил (20 мг/кг).

Спектральные характеристики электрограмм мозга определялись с помощью быстрого преобразования по Фурье в диапазоне 1-30 Гц. Для описания ЭГ на каждом этапе исследования, с учетом стационарно-

сти, усреднялись нормированные спектры мощности 5 следующих друг за другом 8-секундных отрезков.

Использовали классификации Т.А. Леонтович [4] для подкорковых и Г.И. Полякова [6] для корковых нейронов. Для количественной характеристики дендритного дерева нейронов мы применили методы многомерного анализа (корреляционный, факторный и кластерный анализы) с целью получения классификации действия препаратов.

### Результаты и обсуждение

Для реализации этого подхода нами был применен дискриминантный анализ спектральных характеристик ЭГ мозга. При этом отдельно оценивались спектры ЭГ, формируемые в различных структурах мозга в динамике действия антидепрессантов, и разности спектров препарата и фона в диапазоне 1-30 Гц.

В таблице приведены данные классификации антидепрессантов для каждой структуры мозга, а также среднее значение по всем структурам. Полученные результаты показывают, что спустя 1 час после приема препарата процент правильной классификации весьма низок. Однако оценка разностных спектров, фактически вычлещающих изменения, вызванные действием вещества, значительно повышает процент правильной классификации антидепрессантов.

Этот процент резко возрастал на пике действия препаратов (через 2 часа после приема), и применение разностных спектров не улучшало классификацию. Наиболее высокий процент правильной классификации отмечался при анализе пиразидола (90-95%) и мелипрамина (86,2%). Среди исследованных структур мозга лучше классифицировались спектрограммы медиодорсального ядра таламуса и зрительной коры.

Результаты дискриминантного анализа показали достаточно высокий процент правильной классификации всех психо-

Таблица

Анализ спектров ЭГ мозга кошек при действии антидепрессантов  
(2 часа после приема)

Структуры мозга*	Процент правильной классификации			
	Плацебо	Препарат		
		Мелипрамин	Новерил	Амитриптилин
ССП	62,5	87,5	80	77,7
ССК	87,5	80,8	87,5	78,9
Зрительная кора	75	90	100	88,8
ДорГП	87,5	90	40	66,6
МДЯТ	100	100	100	88,8
ЗдГПТ	87,5	80	60	66,6
РТЯ	87,5	90	100	77,7
ХвЯ	75	90	100	44,4
Среднее по структурам	82,81	89,64	83,44	73,69

ССП – сенсомоторная кора, правая; ССК – сенсомоторная кора, левая; ДорГП – дорсальный гиппокамп; МДЯТ – медиодорсальное ядро таламуса; ЗдГПТ – задний гипоталамус; РТЯ – ретикулогенераторное ядро; ХвЯ – хвостатое ядро

тропных препаратов. Наиболее высокий процент выявлен у сиднофена (93,7%) и пиразидола (90%), самый низкий – у амитриптилина (66,7%). Среди структур мозга, наибольший показатель отмечен для ЭГ зрительной коры и хвостатого ядра (85,4% и 83,8% соответственно).

## Выводы

В спектральных характеристиках ЭГ мозга животных в достаточной степени отражается специфика действия психотропного препарата, что позволяет их правильно классифицировать с довольно высокой (75-100%) степенью надежности. Следовательно, животных можно использовать для предварительного отбора и классификации психотропных средств. Кроме того, использование хронически имплантированных электродов в подкорковые структуры мозга дает возможность исследовать нейрофизиологические механизмы действия психо- и нейротропных средств.

## Литература

1. Бияшева З.Г., Кустубаева А.М., Датхабаева Г.К. ЭЭГ-корреляты адаптации у детей, больных детским церебральным параличом с сохранным интеллектом // VII Междисциплинарная конференция по биологической психиатрии «Стресс и поведение», 28 февраля 2003, [mosmedclinic.ru/conf\\_library/2003/4/371](http://mosmedclinic.ru/conf_library/2003/4/371).
2. Воробьев В.В., Ганеев А.Б., Нейман С.А., Пискунова Г.М., Храмов Р.Н., Чемерис Н.К. Частотный состав ЭЭГ симметричных областей коры и гиппокампа кроликов при воздействии ЭМИ КВЧ на зону акупунктуры // [www.mednet.com/publikac/vmnt/1999/n2/razd\\_1/6128223.htm](http://www.mednet.com/publikac/vmnt/1999/n2/razd_1/6128223.htm).
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
4. Леонтович Т.А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга. – М.: Медицина, 1978.
5. Омельченко В.П., Матуа С.П., Гришин А.Д. Компьютерный анализ электрограмм мозга при действии некоторых психотропных

- средств // *Фармакол. и токсикол.*, т. 52, № 3, с. 18-22, 1989.
6. Поляков Г.И. Основы систематики нейронов новой коры большого мозга человека. – М.: Медицина, 1973.
  7. Черкес В.А., Олешко Н.Н., Ваколюк Н.И., Луханина Е.П. Физиология головного мозга. – Киев, 1976.
  8. Fink M. EEG and behavior: association or disassociation in man? // *Integrative Psychiatry*, 9:108-1231, 1993.
  9. Itil T.M., Soldatos C. Epileptogenic side effects of psychotic drugs: practical recommendation. – *JAMA* 147:1069-1071, 1990.
  10. Jasper H.H., Ajmont-Marsan C.A. Stereotaxic atlas of diencephalon of the cat. – Ottawa. 1954.
  11. Michel C.M., Murray M.M., Lantz G. et al. EEG source imaging // *Clinical Neurophysiology*, 115: 2195-2222, 2004.

#### COMPUTER EEG-PROFILES AS INDICATORS OF BIOELECTRICAL ACTIVITY OF ANIMALS BRAIN

S.P. Matua, V.N. Karkischenko, V.P. Omel'chenko

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Rostov State Medical University, Rostov-on-Don*

It has been proved that spectral characteristics of cat brain encephalograms are sufficient means to reflect specific action of psychotropic drugs. This permits us to classify drugs and study neurophysiological effects of psycho- and neurotropic substances.

**Key words:** cerebral EEG, neuro- and psychotropic drugs, mathematical methods.

## Морфологическая активность регуляторных нейропептидов и регенерация планарий

И.М. Шейман, Н.Д. Крещенко

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино*

Плоских червей – планарий, обладающих выраженной способностью к регенерации, использовали для изучения морфогенетической функции регуляторных нейропептидов (НП). К группе морфогенетически активных отнесены некоторые из исследованных НП позвоночных и беспозвоночных животных. Их функция проявлялась в разной степени по отношению к разным органам планарий, в зависимости от динамики регенерационного процесса и концентрации НП, и вызывала стимулирующий или тормозный эффект. НП могут быть выявлены у интактных животных и в ходе их регенерации иммуноцитохимическим методом. Показана корреляция между обнаружением НП у интактных планарий и регенератов и эффектом их воздействия.

Морфогенетически активные НП, исследованные на беспозвоночных, проявляли сходные эффекты в опытах на позвоночных животных и были обнаружены также у человека.

**Ключевые слова:** планарии, регенерация, нейропептиды, морфогенетическая активность.

Синтез и функционирование нейропептидов (НП) – древнейшее и устоявшееся в эволюции животного мира явление, присущее возбудимым тканям. Важная черта НП – их полифункциональность в самом широком смысле. Она включает в себя как представительство в филогенетическом ряду, так и морфофункциональное распределение. Познание НП формируется двумя экспериментальными путями. Первый – это изучение эффектов, вызываемых НП в разных функциональных системах и у разных животных, второй – выявление НП в разных морфологических структурах организмов и у разных животных. Он основан на развитии биохимических, гистохимических и иммуноцитохимических методов.

Детальное исследование функциональных проявлений НП обнаружило, что, наряду с полифункциональными свойствами, выделяются и преимущественные влияния НП по отношению к какой-нибудь одной функции. Это позволило И.П.Ашмарину сформулировать гипотезу функционально-континуума [1]. Основные свойства, а

иногда и названия НП соответствуют их впервые обнаруженной активности.

При изучении влияния ряда НП на развитие беспозвоночных животных была выделена группа НП, обладающих морфогенетической активностью [12, 31]. Исследование таких НП представляет интерес как с теоретической, так и с практической позиции. Нами накоплены результаты экспериментальных исследований морфогенетической функции НП на беспозвоночных животных, главным образом на модельном объекте – планариях. Обобщение этих данных и является целью настоящей публикации.

### Регенерация планарий

Регенерацию планарий наблюдают, изучают и используют как модель повторного развития более 200 лет. Доступность объекта и удобство экспериментального манипулирования на них трудно переоценить. Планарии – плоские черви (*Plathelminthes*, *Turbellaria*, *Tricladida*) – занимают ключевую позицию в филогенетическом ряду: это

первые животные с билатеральной симметрией. Они обладают центральной нервной системой, включающей парный ганглионарный мозг. Их тело содержит большое количество резервных недифференцированных клеток – необластов, предшественников стволовых клеток позвоночных животных. Эти клетки обеспечивают большую морфогенетическую пластичность, свойственную планариям, являясь клеточным источником регенерации. Характеристика планарий служит основанием для изучения на них как клеточных механизмов, так и факторов регуляции восстановительных явлений.

Для наблюдения за воздействием некоторых регуляторных НП на регенерацию планарий нами были использованы две экспериментальные модели: восстановление частей тела, удаленных после поперечных перерезок, и регенерация глотки после ее ампутации (рис. 1). Соответственно исследовали действие на эти процессы НП, описанных у позвоночных и беспозвоночных животных (табл. 1).

**Действие НП на регенерацию планарий**

**НП позвоночных животных.** Ряд НП (даларгин, соматостатин и вазопрессин) применяли при изучении регенерации головного конца тела планарий. Динамику его

роста определяли с помощью прижизненной компьютерной морфометрии [9]. Животных помещали после операции в раствор НП слабой концентрации (0,1 мМ и 1,0 нМ). Контрольные опыты проводили в аквариальной воде.

После поперечной перерезки планарий на хвостовом фрагменте отмечали рост регенерационной бла-

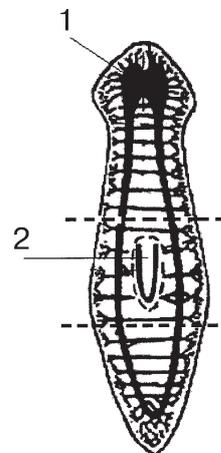


Рис. 1. Схема планарии. 1 – головной ганглий, 2 – глотка. Пунктирная линия – уровень операций

стемы в течение 10 дней регенерации и определяли отношение показателей между опытными и контрольными данными. Все три НП стимулировали рост регенерационной бластемы (рис. 2). В конце опыта наиболее значительным оказался стимулирующий эффект, вызванный даларгином [13]. Действие НП отличалось не только по интенсивности, но отражалось и в динамике роста бластемы. Так, соматостатин в начале опыта (5-е сутки) не вызывал практически никакого эффекта.

Таблица 1

**НП, исследованные в опытах на планариях**

<i>НП позвоночных животных:</i>		<i>НП беспозвоночных:</i>
Фрагмент АКТГ(4-10)	MEHFRWG	Морфоген гидры(МГ)
Аналог АКТГ (4-10)	MEHFPGP	или (Hydra head activator): EPPGGSKVILF
Люлиберин (LHRH)	pEHWSYGLRPG	Его фрагменты:
Его фрагменты:		МГ 6-11 SKVILF
LHRH (1-2)	pEH	МГ 7-11 KVILF
LHRH (9-10)	PG	МГ 8-11 VILF
Аналог энкефалина – даларгин	YAGFLR	МГ 9-11 ILF
Вазопрессин	CYFEDCPRG	Нейропептид
Соматостатин	AGCLNFFWKTFTSC	F(NPF): PDKDFIVNPSDLVLDNKAALRDY LRQINEYFAIGRPRF
		FMRF-подобные пептиды: GYIRF FMRF

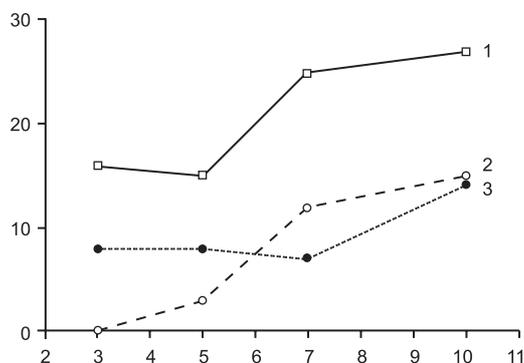


Рис. 2. Действие НП на регенерацию головного конца планарий: 1 – даларгин, 2 – соматостатин, 3 – вазопрессин.

По оси абсцисс – дни регенерации, по оси ординат – разница между опытными и контрольными критериями регенерации. Критерий регенерации определяли по формуле:  $K = (A_1 V_0 / A_0 V_1) \cdot 100\%$ , где  $A_0$  – площадь головной части интактной планарии,  $V_0$  – площадь всей интактной планарии,  $A_1$  – площадь blastемы регенерата и  $V_1$  – площадь всего регенерата

В опытах по регенерации глотки [7] список исследованных НП был расширен. Были применены следующие НП: люлиберин (LHRH) и его фрагменты (LHRH 1-2,

LHRH 9-10), фрагмент аденокортикотропного гормона (АКТГ 4-10), аналог фрагмента АКТГ (4-10). Определяли функциональное восстановление глотки, о котором судили на основании появления двигательной-пищевой реакции. Методика заключалась в выявлении пищевой реакции в каждый день регенерации в экспериментальной и контрольной группах животных, или числа планарий, способных к захвату глоткой пищи [6]. Обобщенные результаты действия НП на восстановление функции глотки приведены в табл. 2.

В растворе люлиберина в концентрации 1,0 nM на всем протяжении опыта у планарий из подопытной группы глотка регенерировала интенсивнее, чем у контрольных животных. К седьмым суткам регенерации у всех животных в подопытной и контрольной группах функция глотки полностью восстанавливалась. В растворе фрагмента люлиберина (LHRH 1-2) в концентрации 0,1 μM глотка регенерировала более интенсивно, чем у животных контрольной группы. Фрагмент люлиберина (LHRH 9-10) в концентрации 0,1 μM вызывал слабое

Таблица 2

Динамика восстановления функции глотки под воздействием НП (% планарий, проявивших пищевую реакцию)

Нейропептид, концентрация	Число животных	Дни регенерации глотки				
		4	5	6	7	8
Контроль	30	–	43,3	80,0	100	–
Люлиберин, 1,0 nM	32	9,4	53,2	93,8	100	–
Контроль	64	6,3	37,6	85,9	100	–
LHRH (1-2), 0,1 μM	70	14,3	44,3	98,6	100	–
Контроль	63	9,5	57,1	92,0	98,3	100
LHRH (9-10), 1,0 nM	66	1,5	51,5	86,3	93,9	100
Контроль	31	12,9	38,7	77,4	100	–
LHRH (9-10), 0,1 μM	32	31,3	59,4	90,7	100	–
Контроль	250	4,8	52,8	72,8	92,4	100
Даларгин, 0,1 μM	245	4,1	41,2	70,2	94,3	100
Контроль	74	1,4	9,5	73,0	100	–
Даларгин, 1,0 nM	78	5,1	17,9	83,3	100	–
Контроль	66	16,7	74,3	94,0	100	–
АКТГ(4-10), 1,0 nM	65	13,8	70,7	95,4	100	–
Контроль	64	29,7	90,6	100	–	–
Аналог АКТГ(4-10), 1,0 nM	68	44,1	86,8	100	–	–

стимулирующее влияние, а в концентрации 1,0 нМ – слабое тормозящее влияние.

LHRH (1-2) вызывал у планарий наиболее выраженный стимулирующий эффект на восстановление функции регенерирующей глотки, а действие фрагмента LHRH (9-10) зависело от концентрации раствора НП.

Фрагмент адренокортикотропного гормона АКТГ 4-10 в концентрации 1,0 нМ не оказал влияния на регенерацию глотки у планарий. Аналог этого фрагмента оказывал слабое стимулирующее влияние.

При действии аналога энкефалина – даларгина – в концентрации 0,1 мМ неизменно проявлялся тормозящий регенерацию глотки эффект, в то время как действие даларгина в концентрации 1,0 нМ имело слабое положительное влияние. Таким образом, действие даларгина на регенерацию глотки также изменялось в зависимости от его концентрации в растворе.

**НП беспозвоночных.** Последовательное изучение разных НП позвоночных животных обнаружило, что многие из них свойственны и беспозвоночным. У последних были в свою очередь обнаружены НП со специфической функцией. Некоторые из них были также исследованы на предмет морфогенетической активности.

Группой Шаллер [28] из нейросекрета гидры был выделен НП, стимулирующий почкообразование у гидр. Он был назван активатором головы гидры (Hydra Head Activator) или морфогеном гидры (МГ). Позже он был обнаружен также и у млекопитающих, у которых были выявлены и исследованы его различные функции.

МГ стимулировал регенерацию головного конца тела планарий в концентрациях 0,1 мМ, 1,0 нМ и 0,1 нМ (рис. 3). Точно так же действовали его фрагменты МГ 6-11, МГ 7-11, МГ 8-11 и МГ 9-11. При этом наибольший эффект вызывал самый короткий С-концевой фрагмент (рис. 4). Стимулирующее действие МГ было наиболее значительным в первые дни регенерации.

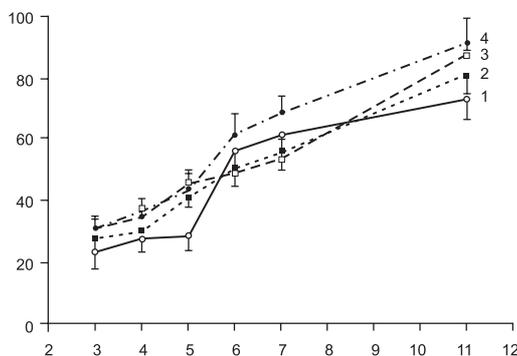


Рис. 3. Действие МГ на регенерацию головного конца планарий.

Концентрации МГ: 1 – контроль, 2 – МГ (100 нМ); 3 – МГ (1,0 нМ); 4 – МГ (0,01 нМ).

По оси абсцисс – дни регенерации, по оси ординат – площадь бластымы (% по отношению к интактным)

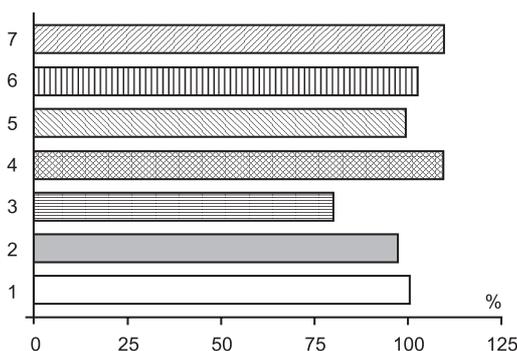


Рис. 4. Сравнительный анализ действия фрагментов МГ на регенерацию головного конца: 1 – МГ(1-11), 2 – МГ(1-5), 3 – МГ(3-8), 4 – МГ(6-11), 5 – МГ(7-11), 6 – МГ(8-11), 7 – МГ(9-11). Вычисляли отношение арифметической суммы величин критерия регенерации в разные дни опыта под действием МГ к аналогичной сумме в контрольной группе, регенерирующей в воде. Это отношение приняли за 100 %. Соответствующие величины данного отношения для других экспериментальных групп животных, регенерирующих в растворах фрагментов МГ, сравнивали с этой величиной, и результаты также выражали в процентах.

Нейропептид F (NPF) был впервые выделен и охарактеризован у плоских червей цестод *Moniezia expansa* [23], он состоит из 39 аминокислотных остатков. Второй родственный NPF был выделен из наземных

Таблица 3

**Рост головной бластемы у регенератов  
(площадь головной бластемы, условные единицы)**

Период регенерации (сут.)	Контрольная группа (1) N = 25	Опытная группа (1) NPF (0.1 μM) N = 27	Контрольная группа (2) N = 22	Опытная группа (2) NPF (1 μM) N = 24
1	844,6±67,7	785,4±74,6	3116±213,4	3356±184,9
1,5	1097,0±78,7	1107,0±87,4	3047±198,3	3866±199,8
2	1436,0±81,2	1758,0±139,0	5554±379,0	5720±295,3
2.5	1971,0±69,9	1881,0±88,7	8257±415,5	8847±455,7
3	2117,0±92,8	2147,0±71,6	12521±435,4	12323±638,2
5	4430,0±105,9	4839,0±160,0	17597±488,5	19651±577,9
7	6105,0±162,5	6663,0±223,7	31828±659,0	29984±1129,0

планарий *Artioposthia triangulata*, он состоит из 36 аминокислотных остатков [16].

Влияние NPF в концентрациях 1,0 μM – 1,0 nM на регенерацию головного участка тела планарий обнаружило стимулирующий эффект на рост головной бластемы. Площадь регенерационной бластемы измеряли при помощи компьютерной установки [11] спустя 1,5–7 суток после декапитации. NPF в концентрациях 1,0–0,01 μM стимулировал рост бластемы в течение семи суток регенерации (табл. 3).

На регенерацию удаленной глотки МГ в концентрации 0,1 μM оказывал стимулирующее действие, а его фрагмент МГ(7-11) тормозил регенерацию глотки. Эффекты фрагментов были выражены относительно слабо (табл. 4).

Кардиоактивный нейропептид FMRF-амид был впервые выделен из ганглия моллюска *Macrocalista nimbosa* [24]. К настоящему времени четыре природных FMRF-амидоподобных НП были найдены у плоских червей, из них GYIRFамид у *Dugesia tigrina*, Bdeloura candida; RYIRFамид у наземной турбеллярии *Artioposthia triangulata*, YIRFамид у турбеллярии *Bdeloura candida* и GNFFRFамид у цестоды *Moniezia expansa* [22].

Для изучения морфогенетической роли FMRF-подобных НП использовали модель регенерации глотки у головного и хвостового фрагментов планарий, полученных после перерезки тела впереди и позади глотки. В этих фрагментах изучали восста-

Таблица 4

**Динамика восстановления функции глотки у планарий во время регенерации под воздействием НП (%)**

Нейропептиды	Число животных	Дни регенерации глотки				
		4	5	6	7	8
Контроль МГ, 1,0 nM	62	4,8	62,9	87,6	100	–
	67	6,0	67,2	100	–	–
Контроль МГ, 0,1 μM	139	17,3	48,2	92,1	100	–
	134	22,9	69,2	94,6	100	–
Контроль МГ(7-11), 0,1 μM МГ(9-10), 0,1 μM	46	–	17,4	91,3	100	–
	43	–	7,0	90,7	100	–
	42	2,4	21,4	92,8	100	–

новление функции глотки под влиянием FMRFамида, GYIRFамида, NPF. Было обнаружено, что NPF и FMRFамид в концентрации 1,0  $\mu\text{M}$  ускоряли восстановление функции регенерирующей глотки, а GYIRFамид не оказывал существенного влияния на этот процесс [19].

#### Иммуноцитохимическое выявление НП у планарий

Исследовали локализацию НП у планарий описанным методом иммуноцитохимии (ИЦХ) с использованием специфических антител к определенным НП. У интактных планарий нескольких видов (*Dendrocoelum lacteum*, *Dugesia (Girardia) tigrina*, *Polycelis nigra*, *Dugesia lugubris*, *Artioposthia triangulatus*) показана иммунореактивность к NPF и GYIRFамиду [17]. GYIRFамид был обнаружен в центральной и глоточной нервной системе интактных и регенерирующих планарий *Girardia tigrina* [25, 18].

ИЦХ-исследования проведены в ходе формирования ганглия у хвостового фрагмента после поперечной перерезки и после деления планарий [25, 26], а также при формировании глотки [18, 19]. Ранее было установлено, что новый ганглий планарий формируется из волокон, прорастающих из остаточных нервных стволов и дифференцирующихся необластов [10]. NPF-иммунореактивность проявлялась в тонких нервных волокнах, прорастающих из субэпителиальной сети уже к 1,5 суткам после начала регенерации ганглия, а также на обрезанных концах старых нервных стволов на 2-е сутки регенерации. С последующим ростом волокон навстречу друг другу и формированием нейропиля NPF-иммунореактивность в регенерационной бластеме увеличивалась. Иммунореактивность к NPF была богато представлена в нейропиле. В клетках нового ганглия эта реакция появлялась позднее и постепенно нарастала, очевидно, в связи с образованием у них отростков и связей [26].

Глотка планарий обладает относительно автономной нервной системой. В про-

цессе регенерации глотки NPF волокна вращались в зачаток новой глотки на 3-и сутки, а ее клетки проявляли слабую NPF иммунореактивность, и число их постепенно увеличивалось. В целом NPF-иммунореактивность ганглия значительно богаче, чем в глотке. На рис. 5 приведены примеры NPF-иммунореактивности в интактном головном ганглии и интактной глотке планарий *Girardia tigrina*.

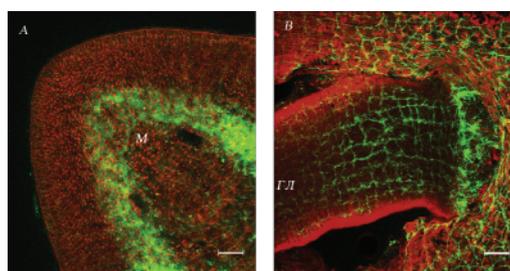


Рис. 5. Изображение головного конца тела (А) и глотки (Б) интактной планарии полученное с помощью конфокального сканирующего микроскопа. Зеленый цвет – иммуноцитохимическая окраска нервной системы мечеными антителами к NPF; М – мозг; ГЛ – глотка. Красный цвет – окраска мышечных волокон мускулатуры тела с помощью флуоресцентно меченного фаллоидина. Шкала 100  $\mu\text{m}$

#### Анализ морфогенетической активности нейропептидов

Ландэ [20] в середине прошлого века обратил внимание на роль нейросекреции в регенерации головного конца тела планарий. Позднее в составе нейросекреторных клеток планарий были выделены пептиды, обнаружившие иммунологическое родство к нейрогормонам позвоночных [14]. Мы показали, что в ходе регенерации головного конца тела планарии в первые трое суток истощаются нейросекреторные образования под раневой поверхностью перерезанных планарий, а на 4-5-е сутки появляются новые нейросекреторные включения в головной бластеме [10].

Изложенные выше исследования морфогенетического эффекта некоторых НП, а также их выявление у интактных плана-

рий и в ходе регенерации разных частей их тела позволили сделать ряд обобщений.

Несмотря на полифункциональные свойства НП, морфогенетическое действие на регенерацию планарий проявили не все испытанные НП позвоночных животных. Так, она отсутствовала при испытании дельта-пептида сна, а также в первые дни регенерации при действии соматостатина [12]. Отсутствие морфогенетического действия некоторых НП коррелирует с данными об отсутствии иммунореактивности по отношению к ряду НП, описанному у разных видов червей [32]. Тем самым подтверждается правильность выделения группы морфогенетически активных НП, для которых эта функция является доминирующей.

Изучение этой функции на модели регенерации планарий выявило некоторые особенности. В процессе регенерации планарий активность НП проявлялась неодинаково в динамике регенерации и в неодинаковой степени для разных НП. Различия в эффектах НП на разных сроках регенерации могут быть связаны с воздействием НП на отдельные элементы сложного механизма регенерации, в состав которого входят апоптоз, деление клеток, их миграция, дифференцировка и т.д. Такое объяснение находит подтверждение в результатах воздействия некоторых НП на пролиферацию клеток. Так, было установлено, что МГ, вызывающий митозы клеток гидры, проявляет митогенную активность также в культуре клеток млекопитающих (NH15-CA2), в том числе и человека в ходе раннего нейрогенеза [15, 21, 29, 30]. А FMRFамид, который не оказывал влияния на пролиферативную активность клеток у улиток, препятствовал апоптозу [27].

Также различалось влияние НП на регенерацию разных участков тела у планарий. Это было продемонстрировано при действии МГ и его фрагментов на регенерацию головного конца тела и глотки планарий.

Нами была предпринята попытка найти корреляцию между эффектами НП и иммунореактивностью в разных регионах тела на примере NPF. Его действие на рост головной регенерационной бластемы было обнаружено уже спустя 1,5 суток после начала регенерации. В этот же срок впервые проявлялась иммуноцитохимическая реакция в бластеме. Такое совпадение сроков может свидетельствовать об одновременном формировании в ходе регенерации NPF-содержащих клеток, а также рецепторов к нему. В глотке планарий NPF-иммунореактивные элементы появлялись позднее и в меньшем количестве, чем в головном конце.

В морфогенетических эффектах НП проявилась активность в малых концентрациях, а также альтернативные действия при разных концентрациях, что характерно для влияния слабых факторов [2, 7].

Некоторые из описанных НП беспозвоночных были обнаружены и исследованы у позвоночных животных. Они представляют практический интерес. Так, МГ найден в опухолях мозга человека. Он проявляет митогенные свойства для клеток млекопитающих [21]. В экспериментах МГ ускорял заживление ран у крыс [8] и оказывал протективное действие на печень и кишечник [3]. Аналог энкефалина даларгин защищал от язвообразования слизистую оболочку двенадцатиперстной кишки, подобно некоторым эндорфинам [4]. Он также ускорял регенерацию легких морских свинок и человека [5].

Для возможного применения НП в практике имеет большое значение всестороннее исследование их свойств на таком доступном и удобном для манипулирования объекте, каким является планария.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ  
04-07-00452а в 2007 г.*

**Литература**

1. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Регуляторные пептиды, функционально непрерывная совокупность // *Биохимия*, т. 51(4), с. 531-545, 1986.
2. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Сверхслабые воздействия химических соединений и физических факторов на биологические системы // *Биофизика*, т. 49, в. 3, с. 551-564, 2004.
3. Виноградов В.А. Пептидный морфоген гидры: роль у млекопитающих // *Онтогенез*, т. 19(5), с. 536, 1988.
4. Виноградов В.А., Полонский В.М., Смагин В.Г. Влияние энкефалина и циметидина на возникновение и течение дуоденальных язв у крыс // *Бюлл. эксп. биологии и медицины*, т. 93(5), с. 40-42, 1982.
5. Корнилова З.Х. Регуляция восстановительных процессов в поврежденных легких с помощью пептидов // *Онтогенез*, т. 22(3), с. 301, 1992.
6. Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий *Dugesia tigrina* // *Онтогенез*, т. 24(1), с. 49-53, 1993.
7. Крещенко Н.Д., Шейман И.М. Регенерация глотки у планарий. Влияние нейропептидов // *Онтогенез*, т. 25(4), с. 60-67, 1994.
8. Сневак С.Е., Соловьев А.И., Рубина А.Ю., Беспалова Ж.Д. Пептидный морфоген гидры и его фрагменты в регенерации ран у крыс // *Онтогенез*, т. 19(5), с. 552, 1988.
9. Тирас Х.П., Сахарова Н.Ю. Прижизненная морфометрия регенерации планарий // *Онтогенез*, т. 15(1), с. 42-48, 1984.
10. Шейман И.М. Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль. – М.: Наука, 1984.
11. Шейман И.М., Крещенко Н.Д., Седельников З.В., Грозный А.В. Морфогенез у планарий *Dugesia tigrina* // *Онтогенез*, т. 35(4), с. 285-290, 2004.
12. Шейман И.М., Тирас Х.П., Балобанова Э.Ф. Морфогенетическая функция нейропептидов // *Физиологический журнал*, т. 75(5), с. 619-626, 1989.
13. Шейман И.М., Тирас Х.П., Виноградов, В.А., Ефимов И.А. Аналог энкефалина даларгин ускоряет регенерацию головного конца тела планарий // *Доклады АН СССР*, т. 284(2), с. 481-483, 1985.
14. Bautz A., Shilt J. Somatostaine-like peptide and regeneration capacities in planarians // *General and Comparative endocrinology*, v. 64, 267-272, 1986.
15. Boels K., Glassmeier G., Herrmann D., Riedel I.B., Hampe W., Kojima I., Schwarz J.R., Schaller H.C. The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca(2+)-permeable channel GRC // *J Cell Sci.*, v. 114(20), 3599-3606, 2001.
16. Curry W.J., Shaw C., Johnston C.F., Thim L., Buchanan K.D. Neuropeptide F: primary structure from turbellarian, *Artioposthia triangulata* // *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v. 101, 269-274.
17. Gustafsson M., Halton D.W., Kreshchenko N.D., Movsessian S.O., Raikova O.I., Reuter M., Terenina N.B. Neuropeptides in flatworms // *Peptides*, v. 23, 2053-2061, 2002.
18. Kreshchenko N.D., Reuter M., Sheiman I.M., Halton D.W., Johnston R.N., Shaw C., Gustafsson M.K.S. Relationship between musculature and nervous system in the regenerating pharynx in *Dugesia tigrina* (Platyhelminthes) // *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 35(2), 109-125, 1999.
19. Kreshchenko N., Sheiman I., Reuter M., Gustafsson M.K.S., Halton D.W., Maule A.G. Effects of FMRF-related peptides and Neuropeptide F on planarian regeneration (Platyhelminthes, Tricladida) // *Belgium J. Zoology*, v. 131(S1), 147-148, 2001.
20. Lender Th. Le role de la neurosecrection on course de la reproduction asexual des planaires d'eau douce. *Ann. Endocrinol.*, 1970, v. 31, 463-465.
21. Lintzel J., Franke I., Riedel I.B., Schaller H.C., Hampe W. Characterization of the VPS10 domain of SorLA/LR11 as binding site for the neuropeptide HA // *Biol. Chem.*, v. 383(11), 1727-1733, 2002.
22. Maule A.G., Mousley A., Marks N.J., Day T.A., Thompson D.P., Geary T.G., Halton D.W. Neuropeptide signaling system – potential drug targets for parasite and pest control // *Current Topics in Medical Chemistry*, v. 2, 733-758, 2002.
23. Maule A.G., Shaw C., Thim L., Johnston C.F., Fairweather I., Buchanan K.D. Neuropeptide F: a novel parasitic flatworm regulatory peptide from *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophylidae) // *Parasitology*, v. 102, 309-316, 1991.

24. Price D.A., Greenberg M.J. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide FMRFamide // *Gen. Pharmacol.*, v. 11, 237-241, 1977.
25. Reuter M., Gustafsson M.K.S., Sheiman I.M., Terenina N., Halton D.W., Maule A.G., Shaw C. The nervous system of Tricladida. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Plaudicola, Dugesidae): an immunocytochemical study // *Invert. Neurosci.*, v. 1, 133-143, 1995.
26. Reuter M., Sheiman I.M., Gustafsson M.K.S., Halton D.W., Maule A.G., Shaw C. Development of the nervous system during regeneration after fission and decapitation // *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 29(3), 199-211, 1996.
27. Roszer T., Kappelmayer J., Nagy G.G., Szentmiklosi A.J., Basnakian A.G., Banfalvi G. The neuropeptide FMRFamide can protect cells against apoptosis in the snail digestive gland // *Apoptosis*, v. 11(2), 173-182, 2006.
28. Schaller H.C. Isolation and characterization of a low-molecular-weight substance activating head and bud formation in hydra // *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 29(1), 27-38, 1973.
29. Schaller H.C., Druffel-Augustin S., Dubel S. Head activator acts as an autocrine growth factor for NH15-CA2 cells in the G2/mitosis transition // *EMBO J.*, v. 8(11), 3311-3318, 1989.
30. Schaller H.C., Hoffmeister S.A., Dubel S. Role of the neuropeptide head activator for growth and development in hydra and mammals // *Development*, v. 107 (Suppl), 99-107, 1989.
31. Sheiman I.M., Balobanova E.F., Kreshchenko N.D. Regulation of development of the grain beetle *Tenebrio molitor* by neuropeptides // *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 36(1-3), 105-110, 1999.
32. Wikgren M.C., Reuter M. Neuropeptides in Microturbellarian – whole mount immunocytochemistry // *Peptides*, v. 6 (Suppl 3), 471-475, 1985.

#### MORPHOGENETIC ACTION OF NEUROPEPTIDES AND PLANARIAN REGENERATION

I.M. Sheiman, N.D. Kreshchenko

*Institute of Cell Biophysics*

The flatworms, planarian, which possesses the remarkable regeneration ability, were used for the investigation of morphogenetic function of the regulatory neuropeptides (NPs). Between them were some of the known NPs of vertebrates and invertebrates morphogenetically active peptides. Their function has been shown in relation to the regeneration of different body organs in planarians, has been dependent on concentrations used and caused stimulating or inhibiting effects. NPs have been identified in intact animals and in the course of their regeneration by immunocytochemical method. The correlation between the identification of NPs in intact and regenerating planarians and NPs effects has been shown. The morphogenetically active NPs, studied on invertebrates exhibited similar effects in vertebrates and was found also in human.

**Key words:** planarian, regeneration, neuropeptides, morphogenetic action.

## Изучение фармакокинетики анастрозола на мини-свиньях светлогорской популяции

Салар Эйса Задах<sup>1</sup>, В.Г. Кукес<sup>1</sup>, Г.Д. Капанадзе<sup>2</sup>

*Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова, Москва  
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Изучали биоэквивалентность противоопухолевого препарата анастрозола на мини-свиньях светлогорской популяции. Проведенный фармакокинетический анализ показал, что время всасывания, распределения и выведения препарата у мини-свиней светлогорской популяции близки к таковым у человека. Время достижения максимальной концентрации, период полувыведения, площадь под фармакокинетической кривой сравнительно легко экстраполируются на человеческий организм.

**Ключевые слова:** биоэквивалентность, противоопухолевые препараты, мини-свиньи светлогорской популяции.

Анастрозол – современный лекарственный препарат с противоопухолевой активностью в отношении эстрагензависимых опухолей молочной железы у женщин в постменопаузе [1]. После приема внутрь всасывается 83–85% принятой дозы, время достижения максимальной концентрации – 2 часа, связь с белками плазмы – 40%, равновесная концентрация в плазме достигается после 7 суток приема препарата. Метаболизм осуществляется в процессе N-деалкилирования, гидроксирования и конъюгации с глюкуроновой кислотой. Основной метаболит – триазол, определяемый в плазме и моче, не обладает аналогичной фармакологической активностью. Метаболиты выводятся преимущественно почками, менее 10% дозы выводится с мочой в неизменном виде в течение 72 часов [2]. Известно, что при изучении биоэквивалентности генерических противоопухолевых препаратов с учетом побочных эффектов по этическим соображениям рекомендуется проводить исследование на животных [3, 4].

**Целью** нашего исследования было изучение фармакокинетических параметров противоопухолевого препарата анастрозо-

ла у мини-свиней после однократного перорального введения.

### Материалы и методы

Динамику концентрации анастрозола изучали на 12 мини-свиньях светлогорской популяции MSY (работа с животными проводилась в Научном центре биомедицинских технологий РАМН) после однократного перорального введения препарата аридекс в дозе 2 мг (2 таблетки по 1 мг). Отбор крови осуществляли до и спустя 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 и 72 часа после введения препарата. Концентрацию анастрозола в плазме крови животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Gilson с УФ-спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны при длине волны 215 нм. Использовали хроматографическую колонку LC-18-OB 4,5×150. Элюирование проводили подвижной фазой состава: ацетонитрил – 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в соотношении 27:73. Подвижную фазу перед использованием дегазировали под вакуумом. Скорость элюирования составляла 1,0 мл/мин. Фармакокинетические параметры рассчитывали модельно-незави-

симым методом. Были взяты следующие параметры:  $C_{max}$  – максимальная концентрация;  $T_{max}$  – время достижения максимальной концентрации;  $AUC_{0-t}$  – площадь под фармакокинетической кривой в пределах длительности наблюдений (рассчитывали методом трапеций); отношение  $C_{max}/AUC_{0-t}$  по индивидуальным значениям (характеристика скорости всасывания).

Для проведения хроматографического анализа анастрозола в крови животных были подобраны следующие условия экстракции: к 1 мл плазмы добавляли 5 мл дихлорметана, экстрагировали при энергичном встряхивании 10 минут, затем центрифугировали 10 минут при 4500 об/мин; органический слой переносили в колбы для упаривания и упаривали досуха под вакуумом; к сухому остатку добавляли 250 мкл подвижной фазы, фильтровали и аликвоту использовали для хроматографирования.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по высоте пиков. Калибровочная зависимость в диапазоне концентраций 10–200 нг/мл носила линейный характер ( $y = -2,02708 + 2,159638 x$ ;  $r^2 = 0,9987$ ).

При статистической обработке экспериментальных данных рассчитывали следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение (Mean), среднее геометрическое значение (GMean), стандартное отклонение среднего результата (SD), медиана (Median).

### Результаты и обсуждение

Динамика концентрации анастрозола в плазме крови животных после однократного перорального приема 2 мг и результаты расчетов фармакокинетических параметров анастрозола представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Динамика концентрации анастрозола в плазме крови животных, нг/мл

Показатель	Время после приема препарата, час												
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8	12	24	30	48
Mean	10,9	32,4	43,0	74,8	68,1	58,0	44,2	35,6	28,2	22,7	16,2	11,4	4,5
GMean	9,4	26,4	38,0	65,1	59,9	50,9	39,5	31,5	24,9	20,6	14,4	10,5	—
SD	6,7	24,8	22,0	43,5	36,9	30,5	22,9	19,3	15,3	11,2	8,8	4,5	3,2
CV	62	77	51	58	54	53	52	54	54	49	54	40	71
Median	9,0	22,6	39,4	63,2	55,3	48,2	34,6	29,5	23,8	18,7	13,3	11,3	4,5

Таблица 2

Фармакокинетические параметры анастрозола

Показатель	$C_{max}$ , нг/мл	$T_{max}$ , час	$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	$\frac{C_{max}}{AUC_{0-t}}$
Mean	77,6	2,1	882,3	0,089
GMean	68,7	2,1	816,7	0,084
SD	42,1	0,2	375,5	0,033
Median	69,6	2,0	729,9	0,087
L-95%	52,0	2,0	653,5	0,069
Up-95%	192,1	2,3	1111,0	0,109

Как видно из представленных данных, пик концентрации анастрозола достигался в среднем через 2 часа после введения препарата и составлял  $74,8 \pm 43,5$  нг/мл. Следует отметить, что через 72 часа после приема препарата концентрация анастрозола во всех пробах была ниже предела определения.

Полученные результаты были сопоставлены с литературными данными фармакокинетических параметров, полученных у здоровых добровольцев. Проведенный анализ (с учетом доз и веса животных) пока-

зал, что процессы всасывания, распределения и выведения анастрозола у мини-свиней близки к таковым у людей. Сопоставимыми оказались такие параметры, как время достижения максимальной концентрации, период полувыведения, площадь под фармакокинетической кривой. Таким образом, мини-свиньи светлогоской популяции могут быть использованы в исследованиях по биоэквивалентности противоопухолевых препаратов.

#### Литература

1. The Merck Index, p. 633, 2001.
2. Geiser J., King N., Dowsett M. et al. Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, nonsteroidal aromatase inhibitor, on *in vivo* aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal woman with breast cancer // *Br. J. Cancer*, 74:1286-91, 1996.
3. Geisler J., Bernsten H., Ottestad L. et al. Neoadjuvant treatment with anastrozole (Arimidex) causes profound suppression of intratumor estrogen levels // *Proc. ASCO 18: (82a)*, abstr. 311, 1999.
4. Bonneterre J., Buzdar A., Nabholz J. et al. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma. Results of two randomized trials designed for combined analyses // *Cancer*, 9 (92):2247-58, 2001.

### STUDY OF ANASTROZOL PHARMACOKINETICS IN SVETLOGORSKAYA MINIPIGS

Salar Asa Zadekh, V.G. Kukes, G.D. Kapanadze

*I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow  
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

Bioequivalence of antitumoral medication of anastrozol was studied on the svetlogorskaya minipigs. The pharmacokinetic analysis showed that for Svetlogorskaya minipigs the time of suction, distribution and elimination of medications is close to that for a human. The time of achieving maximal concentration, elimination half-life and area under a pharmacokinetic curve can be extrapolated on a human organism with relative ease.

**Key words:** bioequivalence, antitumoral medication, minipigs.



## НАШ БЕСТИАРИЙ

— Дети! Завтра мы идем в зоопарк! — объявляет воспитательница в детском садике.

— А зачем? — спрашивает маленькая девочка.

— Ты там познакомишься с волком, с медведем, с лисой, с зайцем.

— И с Колобком?

\*\*\*

Покупатель в зоомагазине:

— У вас крокодилы есть?

— Есть.

Покупатель показывает руками метр:

— А вот такие есть?

— Есть.

Покупатель показывает полметра:

— А вот такие?

— Есть!

Покупатель показывает 10 сантиметров:

— А такие?

— И такие есть.

Покупатель показывает 1 сантиметр:

— И совсем маленькие?

— Есть! Будете брать?

— Нет, не могу! Все равно страшно!

\*\*\*



Сидит рыбак над лункой уже пять часов, а все не клюет!

— О, Боже! — взмаливается рыбак. — Пошли ты мне хотя бы одну большую рыбку!

Всплывает синий кит:

— Ну?!



### РЕДКАЯ БОЛЕЗНЬ

— Правда, что гениальность — болезнь? — спросили однажды у древнегреческого врача Гиппократ.

— Безусловно. Но, к сожалению, очень редкая и — увы! — совершенно не заразная.

### НАДЕЖНОЕ СРЕДСТВО

Ученик спросил Сократа, не знает ли он надежного средства от любви с первого взгляда.

— Знаю, — ответил Сократ. — Нужно внимательно посмотреть второй раз.

## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

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

### Рубрикация журнала

1. Обзоры
2. Оригинальные статьи
3. Краткие сообщения
4. Практикум
5. Нормативные документы

В рубрике «Обзоры» публикуются обзоры научной литературы, по темам, соответствующим профилю журнала, методологические статьи (максимальный объём рукописи – до 12 стр., максимальное количество ссылок – до 35).

В рубрике «Оригинальные статьи» печатаются труды, отражающие результаты завершённых исследований (до 10 стр., до 25 ссылок).

В «Кратких сообщениях» приводятся завершённые фрагменты работ, представляющие самостоятельный интерес (до 4 стр., до 15 ссылок).

«Практикум» – учебно-методический раздел, где помещаются описания используемых в биомедицине методик, новых технологий (до 6 стр., до 10 ссылок).

В разделе «Нормативные документы» печатаются правила обращения с лабораторными животными, отечественные и международные законодательные акты, регламентирующие использование биомоделей в экспериментах (до 3 стр.).

### Общие требования к оформлению

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

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

## Вниманию авторов

На отдельных листах печатаются таблицы, иллюстративный материал, подписи к рисункам, а также реферат и ключевые слова на английском языке. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу, и на отдельном листе – фамилия, имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Литература». Для работ, предназначенных для рубрики «Краткие сообщения», раздел «Обсуждение результатов» необязателен, а количество литературных ссылок должно быть минимальным. Форма изложения обзорных и теоретических статей – свободная.

Статьи, описывающие исследования, выполненные на экспериментальных животных или альтернативных биологических объектах, в разделе «Материалы и методы» должны содержать следующую информацию: организм, орган, ткань, клеточная культура, микробная культура, субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов. В тех работах, где были использованы лабораторные животные, следует указать: 1 – биологический вид; 2 – пол; 3 – возраст или массу животного; 4 – генетический статус: инбредные линии, популяции нелинейных животных гибриды, генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные); 5 – источник, откуда получены животные; 6 – микробиологический статус: гнотобиоты; SPF; конвенциональные; 7 – условия содержания: виварий, изолятор, барьерная система, тип клеток, плотность посадки животных, корм.

### Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для расчётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы должны быть пронумерованы и озаглавлены. Таблицы печатаются на отдельных листах, а в тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (см. табл. 1).

### Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке их упоминания в тексте. На обороте каждого рисунка или фотографии должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов, название статьи, номер рисунка, «верх». Подписи к рисункам даются общим списком на отдельной странице. Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение. На полях рукописи следует проставить (карандашом) номера таблиц и рисунков напротив тех мест в тексте, где желательно их поместить. Требования к иллюстрациям на дискетах или компакт-дисках: а) чёрно-белая графика – разрешение не менее 600 точек на дюйм, формат EPS или TIFF; б) полутоновые и цветные изображения – разрешение не менее 300 точек на дюйм, формат EPS или TIFF; в) диаграммы и графики (векторные изображения) представляются в собственном формате программы Adobe Illustrator, FreeHand или CorelDraw или в формате EPS с приложением исходных (табличных) данных, по которым построены графики/диаграммы.

### Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более 3 сокращений терминов с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

### Литература

Цитируемая в статье литература приводится общим списком в конце статьи в *алфавитном порядке* (вначале – на русском, затем – на иностранных языках). Ссылки на цитируемую литературу в тексте статьи отмечаются порядковым номером работы в списке литературы, заключённым в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов указываются (если это необходимо) в тексте на русском языке, при первом упоминании приводится их написание на языке оригинала в круглых скобках.

## Вниманию авторов

---

В списки литературы приводятся:

**для книг:** фамилии и инициалы всех авторов, название, место издания, название издательства, год издания, цитируемые страницы, либо общее количество страниц в книге (если текст статьи содержит несколько ссылок на данную книгу).

Пример:

1. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В. Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. – М.-Воронеж: ИСТОКИ, с.232, 2004.

**для главы (статьи) в книге:** фамилии и инициалы авторов главы, название главы, название книги, фамилии и инициалы редакторов, место издания, название издательства, год издания, первая и последняя страницы главы.

Пример:

2. Авербах М.М., Мороз А.М. Естественная резистентность к туберкулезу и некоторые вопросы иммуногенетики // В кн.: Иммунология и иммунопатология туберкулеза. – М.: Медицина, с. 106-116, 1976.

**для статьи в журнале:** фамилии и инициалы авторов, название статьи, наименование журнала, год, том (выпуск), номер, первая и последняя страницы статьи.

Пример:

3. Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина, № 1, с. 5-17. 2005.

**для сайта:** ссылка на страницу в Интернете.

Пример:

<http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout/index.html>

### Корректурa

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

После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

Рукописи направлять по адресу:

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

Электронный адрес редакции: [biomedicina@inbox.ru](mailto:biomedicina@inbox.ru)

[matveyenkoel@mail.ru](mailto:matveyenkoel@mail.ru)

Телефон редакции: 561-52-64.

Коллектив ГУ НЦБМТ РАМН сердечно поздравляет

сотрудников филиала «Клинической фармакологии» ГУ НЦБМТ РАМН  
академика РАМН, зав. кафедрой ММА им. И.М.Сеченова

***Кукеса Владимира Григорьевича,***

профессоров

***Ших Евгению Валерьевну,***

***Стародубцева Алексея Константиновича,***

***Раменскую Галину Владиславовну,***

***Сычева Дмитрия Алексеевича***

а также директора Центра, члена-корреспондента РАМН, академика РАН,  
доктора медицинских наук, профессора, лауреата государственных  
премий СССР

***Каркищенко Николая Николаевича***

с присуждением премии Правительства Российской Федерации  
в области науки и техники за оптимизацию лекарственной терапии  
на основе изучения биотрансформации и транспортеров лекарственных средств  
(постановление Правительства РФ от 27 февраля 2008 г. № 121).

Желаем всем доброго здоровья и дальнейших творческих  
успехов в работе!



Коллектив ГУ НЦБМТ РАМН сердечно поздравляет

***Дубакину Лидию Григорьевну,***

главного экономиста филиала «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН,  
в связи награждением Почетной грамотой Министерства здравоохранения  
и социального развития РФ за многолетний и добросовестный труд.



---

Изготовлено в «Универсум Пабблишнг»  
Тираж 3 000 экз.

Адрес: ул. 3-я Мытищинская, д. 16  
тел.: (495) 980-9230, факс (495) 980-9231  
e-mail: [prepress@clinpharma.com](mailto:prepress@clinpharma.com)

