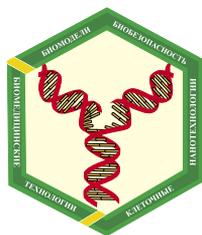


Научный журнал.

Основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Г.Д.Капаназе (к.с.-х.н., зам. главного редактора), В.Н.Каркищенко (д.м.н., проф.), Ю.С. Макляков (д.м.н., проф.), Е.Л. Матвеев (к.э.н., доц., ответственный секретарь), А.Н.Мурашев (д.б.н., проф.), А.В. Муха (д.м.н., зам. главного редактора), Г.В.Раменская, (д.ф.н., проф.), А.О.Ревякин (к.б.н.), Д.В.Сахаров (к.б.н.), Х.Х.Семенов (к.б.н.), Н.В.Станкова (к.б.н.), Д.А.Сычев (д.м.н., проф.), В.В.Хоронько (д.б.н., проф.)

### Редакционный совет:

prof. Hans-W.Ackermann (Канада), prof. Iorgen Backmen (Германия), акад. РАМН и РАСХН В.А.Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А.М.Дыгай, prof. Ralf Edwards (Швеция), prof. Moineao S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С.И.Колесников, акад. РАМН А.А.Кубатиев, акад. РАМН В.Г.Кукес, prof. Michael Orme (Великобритания), акад. РАМН А.А.Кубатиев, акад. РАМН В.Г.Кукес, prof Michael Orme (Великобритания), акад. РАН А.И.Мирошников, акад. РАН и РАМН М.А.Пальцев, акад. РАМН В.И.Петров, акад. РАМН К.В.Судаков, prof. Solemene Umberto (Италия), акад. РАМН В.П.Фисенко, член-корр. РАМН Д.Ф.Хритинин, проф. Б.Д.Цыганков, акад. РАМН В.Н.Ярыгин

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.

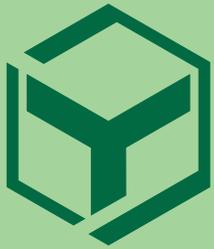
### Адрес редакции:

105064, Москва

Малый Казенный пер. 5, стр. 1

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

Тел.: 561-52-64, 917-32-17



БИОМЕДИЦИНА

2  
2009

МЕДИЦИНА  
ISSN 2074-5982

2009

2

# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

## В СЛЕДУЮЩЕМ НОМЕРЕ:

Мобилизация стволовых клеток пегилированным с помощью нанотехнологии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором как модель изучения процессов миграции прогениторных элементов

Трансплантация аллогенных клеток костного мозга для коррекции нарушений при пародонтозе на генетических мышах линии BRSUNT

Новые клинико-фармакологические подходы к лечению эпидермальных проявлений папилломавирусной инфекции

БИОМЕДИЦИНА

## В НОМЕРЕ:

Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии 57BL/KsJYLeprdb/+

Моделирование дегенеративных изменений межпозвоночных дисков (остеохондроза) у кроликов

Модулирование действия ядерных рецепторов и регуляция биотрансформации лекарств



тема номера

страница 5

НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
РАМН

*Наноинженерные лекарства:  
новые биомедицинские  
инициативы в фармакологии*

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

*Н.Н.Каркищенко.* Наноинженерные лекарства: новые биомедицинские инициативы в фармакологии..... 5

### РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

*О.И.Степанова, В.Н.Каркищенко, О.В.Баранова, Х.Х.Семенов, Т.Б.Бескова, Т.В.Галахова, Н.А.Онищенко, Н.В.Касинская.* Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLeprdb/+..... 28

*А.Б.Шехтер, В.А.Басков, О.Л.Захаркина, А.Е.Гуллер, И.А.Борщенко, И.Ю.Кольшев, Г.Д.Капанадзе, А.В.Басков, Э.Н.Соболь.* Моделирование дегенеративных изменений межпозвонковых дисков (остеохондроза) у кроликов: макроскопическое и гистологическое изучение..... 41

### КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

*С.Н.Ларина, Н.В.Чебышев, Е.В.Ших, В.Н.Каркищенко.* Модулирование действия ядерных рецепторов и регуляция биотрансформации лекарств..... 70

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

*А.О.Ревякин, Н.В.Касинская, Л.Н.Зобова.* Влияние неингаляционных препаратов для общей анестезии, их сочетаний и схем применения на макак резусах..... 81

## CONTENT

### REVIEWS

<i>N.N.Karkischenko</i> . Nanoengineering drugs: new biomedical initiatives in pharmacology.....	5
--	---

### RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

<i>O.I.Stepanova, V.N.Karkischenko, O.V.Baranova, H.H.Semenov, T.B.Beskova, T.V.Galahova, N.A.Onischenko, N.V.Kasinskaya</i> . The mutant mice C57BL/KsJYLeprdb/+ as the genetic model of diabetes 2 type.....	28
--	----

<i>A.B.Shekhter, V.A.Baskov, O.L.Zakharkina, A.E.Guller, I.A.Borschenko, I.Yu. Kolyshev, G.J.Kapanadze, A.V.Baskov, E.N.Sobol</i> . Simulation of the intervertebral discs degenerative changes (spine osteochondrosis) in rabbits: macroscopic and histological study.....	41
---	----

### CLINICAL PHARMACOLOGY

<i>S.N.Larina, N.V.Tchebyshev, E.V.Shikh, V.N.Karkischenko</i> . Modeling of nuclear receptors actions and drug interaction biotransformation.....	70
--	----

### BRIEF REPORTS

<i>A.O.Revyakin, N.V.Kasinskaya, L.N.Zobova</i> . Influence of not inhalation preparations for the general anaesthesia, their combinations and application schemes on <i>Macacus mulatta</i> .....	81
--	----

29 октября 2009 г. в НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск)  
состоится научно-практическая конференция  
**«ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ  
КАК ОСНОВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»**

Конференцию проводят Научный центр биомедицинских технологий РАМН и НИИ фармакологии СО РАМН

Председатели: академик РАМН А.М.Дыгай,  
член-корреспондент РАМН Н.Н.Каркищенко

**В программе предусмотрены следующие выступления:**

От животных-моделей к моделям животных.  
Докладчик: член-корреспондент РАМН Н.Н.Каркищенко

Международная аккредитация организаций, работающих с лабораторными животными. Докладчик: д.б.н. А.Н.Мурашев

Центры генетических ресурсов лабораторных животных — ключевая инфраструктура постгеномной биомедицины.  
Докладчик: проф. М.П.Мошкин

Возможности использования светлогорских мини-свиней в экспериментальной медицине. Докладчик: к.с.-х.н. Г.Д.Капаназде

Проблемы лабораторного животноводства.  
Докладчик: д.м.н. Н.В.Бельская

Биоэтические аспекты использования животных в эксперименте. Докладчик: к.б.н. А.В.Амикишиева

Требования к животным, используемым при проведении доклинических исследований. Докладчик: д.м.н. А.А.Чурин

Выгоды использования индивидуально вентилируемых клеток в сравнении с обычными клетками.  
Докладчик: д.вет.медицины G.Milite (Италия)

Организация моечного отдела в лаборатории для животных.  
Докладчик: H.Lehtinen (Италия)

В рамках конференции будет работать круглый стол *«Международные требования к работе с лабораторными животными. Принципы GLP в доклинических исследованиях»*. Модераторы: член-корреспондент РАМН Н.Н.Каркищенко, профессор А.Н.Мурашев.

По результатам конференции будет опубликован сборник научных трудов.



## Наноинженерные лекарства: новые биомедицинские инициативы в фармакологии

Н.Н.Каркищенко

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Установлено, что наноинженерные вещества, созданные на основе фуллерен- $C_{60}$ -полифторидов (фуллеренилы), с общей формулой  $C_{60}F_nR_n$  влияют на регуляторные процессы, снижая спектры мощности электрической активности мозга в  $\Delta$ -,  $\theta$ -диапазонах, и достоверно повышая их в  $\sigma$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -диапазонах, соответственно изменяя паттерн когерентности между различными зонами мозга. Изменение поведенческих реакций крыс WAG/GY под влиянием  $C_{60}F_nR_n$  было характерно для анксиолитического и ноотропного действия. Показано, что фуллеренилы взаимодействуют с трансмембранными GPCR-рецепторами, преодолевают гематоэнцефалический барьер путем эндоцитоза, а их транслокация в нейронах и клетках астроглии мозга осуществляется через CURL-систему. Поиск наногеномных и нанопротеомных путей альтернативного моделирования должен оптимизироваться выбором гетерогенных и генномодифицированных животных. Дается новый взгляд на оценку кинетических параметров нановеществ и построение моделей на основе функций Байеса, аксиоматики Колмогорова и метода Монте-Карло. Разработана технологическая платформа поиска наноинженерных прототипов новых высокоэффективных лекарств.

**Ключевые слова:** наноинженерия, транслокация наночастиц, фуллерены, GPCR-рецепторы, наноэндоцитоз, CURL-системы, нанокинетика, аксиоматика и метод Монте-Карло, технологическая платформа для оценки нановеществ.

Развитие нанотехнологий и создание наноматериалов основывается на прогрессе фундаментальной науки, направленном на повышение качества жизни населения, состояния среды обитания, обеспечение экономического роста, обороны и безопасности страны. В утвержденных в 2002 году Президентом Российской Федерации «Основах политики Российской Федерации в области развития науки и технологий на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу» [8] нанотехнологические проекты относятся к стратегическим национальным приоритетам страны.

Нанобиология и наномедицина являются наиболее активно развиваемыми направлениями наноиндустрии. В настоящее время в ряду зарегистрированных и выпускаемых в мире около 2000 наименований наноинженерных материалов, лишь несколько десятков субстанций с размерностью менее 100 нм находят возможное применение в медицине для лечения онкологических, сосудистых, инфекционных, психических заболеваний и диагностики. Такой разрыв связан с отсутствием единой технологической платформы оценки нановеществ как перспективных лекарств. Необходима выра-

ботка критериальных подходов к оценке наноинженерных веществ в стандартах GLP, GCP, GMP.

Это ставит перед фармакологией как новые задачи, так и новые ориентиры методологического, методического и организационного характера при оценке будущих лекарств, созданных с помощью наноинженерных технологий. Проводимые нами исследования и данные отечественных и зарубежных источников дают основание поставить вопрос о необходимости разработки единой технологической платформы междисциплинарных биомедицинских исследований с целью конструирования и валидации новых наноинженерных соединений как инновационных лекарственных средств.

К основным понятиям, используемым в этой статье, относятся:

*Наночастицы* – высокодисперсные частицы, геометрические размеры которых хотя бы в одном измерении не превышают 100 нм, с заданной структурой и свойствами, пригодными для контроля и манипуляций на атомном уровне.

*Наноэффективность* – количественные показатели наличия биологической активности нановеществ, имеющие терапевтическое, профилактическое или диагностическое значение.

*Нанорегуляторные системы* – структурно-функциональные биомиметики для наночастиц, обеспечивающие управляющие и регулирующие воздействия на процессы физиологических и нарушенных функций организма.

*Нановещества, нанопрепараты* – биологически активные или фармакологические средства, созданные на основе наноинженерных технологий.

## Точки приложения наночастиц и нанорегуляторные системы

Несмотря на бурное развитие работ по созданию наноматериалов, корректные данные об их эффективности и безопасности крайне скудные. Это связано с тем, что подходы к изучению и оценке наноструктур зиждутся на классических методах исследования более высокоразмерных соединений. Кардинальным отличием наноразмерных структур является их огромная удельная поверхность, увеличение химического потенциала на межфазной границе, несопоставимо большая адсорбционная активность и способность к кумуляции. Это приводит к неожиданным изменениям термодинамических характеристик в живых системах, реакционной и каталитической способности, увеличению продукции АФК (активных форм кислорода) и свободных радикалов. В свою очередь, это влияет на течение основных фундаментальных процессов жизнедеятельности, включая перекисное окисление липидов, структурные изменения белков, ДНК, РНК, функционирование генетического аппарата человека и животных [10].

Представляет интерес механизм действия фуллеренов. Считается, что при внутривенном введении в организм фуллерены могут проходить ГЭБ [5, 24, 28] и локализоваться в мозге. Другие авторы исключают проникновение фуллеренов через ГЭБ [27]. Указывается возможность локализации фуллеренов в печени и селезенке, откуда они удаляются в течение долгого времени [24].

Несмотря на большое количество атомов, молекулы фуллеренов компактны. Диаметр молекулы фуллерена  $C_{60}$ , представляющей собой сферу, равен

0,714 нм (и это при молекулярной массе 720 дальтон). Молекула фуллерена  $C_{70}$  представляет собой эллипсоид длиной 0,780 и толщиной 0,694 нм. Фуллерены  $C_{60}$  имеют низкую общую токсичность, от 1200 до 2500 мг/кг [9].

Проведенные нами исследования модифицированных полифторидных фуллеренилов с общей формулой  $C_{60}F_nR_n$  (синтез осуществлен, по нашему предложению, А.А.Филиповым, В.Б.Соколовым в РНЦ Курчатовский институт) выявили их широкую биологическую активность [5, 6].  $C_{60}F_{24}$  и другие фторсодержащие фуллеренилы обнаружили необычную и характерную картину достаточно выраженного антиоксидантического и ноотропного эффектов. Исследованные нами вещества обнаружили более высокую токсичность (до 500 мг/кг) и достаточно широкий фармакотерапевтический диапазон. Несмотря на различия в фармакологических эффектах отдельных фуллеренилов, в дальнейшем изложении мы будем выделять наиболее общие, характерные для всей группы фторсодержащих фуллеренилов, проявления. В этом случае мы будем обобщенно говорить о всей исследованной нами группе фуллеренилов на основе  $C_{60}F_nR_n$ , содержащий группы  $NH_2$ ,  $[FNC_5H_5]^+F^-$ ,  $[FN_2C_4H_4]$  и др. В необходимых случаях будут указываться конкретные соединения на основе  $C_{60}$ .

Уже исходя из современных представлений [3, 4] и немногочисленных данных [7, 12, 26], можно полагать, что наночастицы влияют на регуляторные процессы в живых системах и их эффекты, в свою очередь, можно представить и описать в терминологии теории автоматического регулирования на наносистемном уровне (рис. 1).

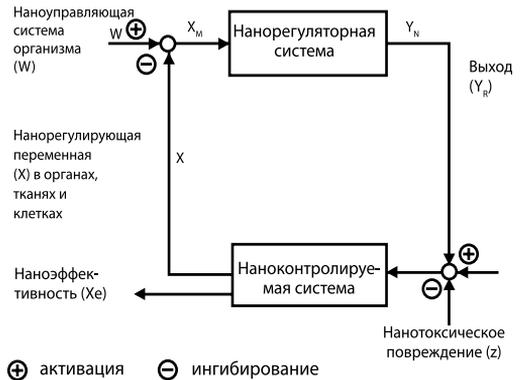


Рис. 1. Контур регулирования и управления в наносистемах организма при моделировании наноэффектов.

Если принять как постулат, что нановещества и наночастицы участвуют в поддержании некоторых физических или химических величин в предварительно определенных границах на наноуровнях живых систем, то регулируемый наномеханизм можно представить в качестве управляемой системы, а механизм, выполняющий регулирование, – соответственно, в виде блока управления или нанорегулятора. Эти две части образуют контур регулирования. Регулируемая величина, т.е. такая величина, которая изменяется при отклонении системы от заданного состояния (например, стационарного), обозначается  $x$ . Из схемы видно, что в данном случае представлен контур нанорегулирования с отрицательной обратной связью, в котором выходной сигнал  $x$  вычитается из входного сигнала  $w$ , при котором искомый эффект равен  $x_e$ .

Сигнал ошибки  $x_w$ , как разница между действительной  $x$  и требуемой  $w$  величиной, должен быть как можно меньшим, либо равным нулю. Требуемое значение регулируемой величины задается системе наноправления посредством управ-

ляющей величины  $w$ . Отсюда следует, что  $x_w = w \cdot x$ . Возможны случайные и непреднамеренные изменения регулируемой величины под воздействием различных *нановозмущений*  $z$ . Сигнал управления  $Y_R$  – это величина, которая так воздействует на управляемую систему, что обеспечивает минимальное отклонение системы от заданного состояния. Иными словами, мы принимаем априори, что наночастицы и нановещества подобно другим химическим, физическим, биологическим факторам и фармакологическим средствам, включаются в регуляторные процессы, но уже на уровне атомов или иных наноразмерных субстратов живых систем.

Поскольку мы пока не располагаем надежным инструментом для прямой оценки влияния наночастиц на системы управления наноразмерного уровня, возможно изучение этих процессов косвенными методами. В своих исследованиях мы воспользовались электрофизиологическими методами изучения электрической активности мозга (ЭАМ) с помощью системы «Энцефалан-131-03» и последующей компьютерной обработкой после введения модифицированных фуллеренов – фторсодержащих фуллеренилов  $C_{60}F_{24}$ ,  $C_{60}F_{48}$ ,  $C_{60}F(NO_2)$  и др.

Электроды располагали в восьми симметричных точках обоих полушарий мозга крыс WAG/GY (подробнее см. статью [6]). Спектральную мощность электрической активности мозга (СМ ЭАМ) анализировали с помощью пакета программ MatLab-5 в диапазонах частот: дельта ( $\Delta$ ) – 1-4 Гц, тета ( $\theta$ ) – 4.25-8 Гц, сигма ( $\sigma$ ) – 8.25-13 Гц, бета ( $\beta$ ) – 13.25-30 Гц, гамма ( $\gamma$ ) – 30.25-45 Гц. Эпоха анализа составляла 4 с. Изменения СМ ЭАМ при действии фуллерена для каждого опыта

нормировались к фоновым значениям, достоверность отличий между выборками для одного опыта по каждому отведению, в каждом диапазоне оценивали по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (как для двух независимых выборок), для группы опытов – по критерию Стьюдента. Принимали во внимание только достоверные изменения СМ ЭАМ ( $p < 0,05$ ). Характерные изменения СМ ЭАМ при введении фуллеренов  $C_{60}F_{24}$ ,  $C_{60}F_{48}$  заключались в снижении мощности в  $\Delta$ - и  $\theta$ -диапазонах, в  $\sigma$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -диапазонах отмечалось достоверное повышение мощности, а при действии фуллеренила  $C_{60}F(NO_2)$  повышение затрагивало и  $\theta$ -диапазон. Изменения в большинстве случаев были однонаправлены в каждом диапазоне [6].

Паттерн когерентных связей при действии фуллеренилов  $C_{60}F_nR_n$  у разных крыс разный, однако общим является снижение когерентности в  $\Delta$ -диапазоне между различными областями мозга после введения  $C_{60}F_{24}$ ,  $C_{60}F_{48}$ , часто это изменение представлено генерализованно по всей коре (рис. 2).

Как известно, СМ ЭАМ и параметры когерентности отображают достаточно тонкие механизмы интрацентральных регуляторных процессов головного мозга [4]. Другим подтверждением влияния нановеществ на регуляторные системы мозга является изменение или модификация поведения. Исследование системных поведенческих реакций фуллеренилов  $C_{60}F_nR_n$ , как правило, хорошо дополняет результаты электрофизиологических экспериментов. Поведенческие реакции крыс WAG/GY исследовались нами с помощью автоматизированных компьютерных систем Laboras и Sonotrack (Нидерланды), позволяющим на основе

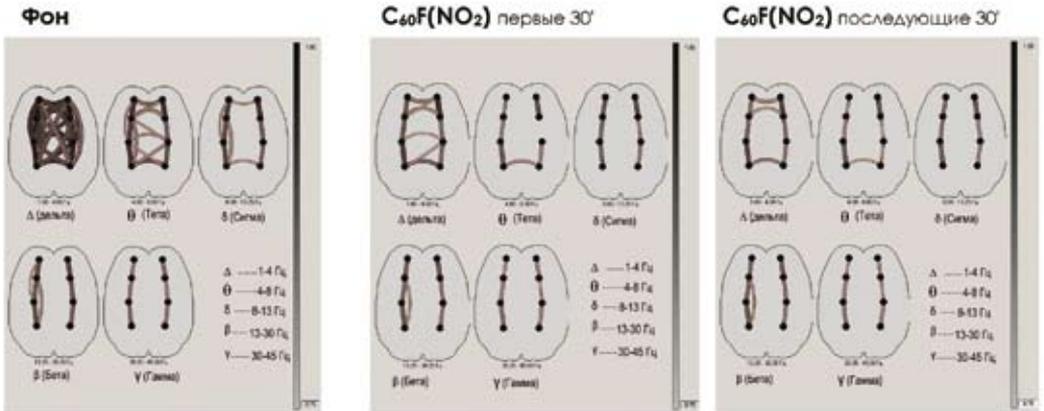


Рис. 2. Характерные изменения паттерно-когерентных связей для фторсодержащих фуллеренилов.

гироскопических и ультразвуковых показателей получить аналитическую и интегральную картину системного поведения животных.

Действие фуллерена  $(C_{60}Br_{24}) \times Br_2$  на крыс WAG/GY в дозе 10 мг/кг длится 40-50 мин. Через 15 минут у животных ослабли реакции агрессии, ослабла двигательная активность. Реакции на внешние раздражители сохранялись, но были ослаблены. После помещения животного в общую клетку пищевой рефлекс наблюдался сразу. Вегетативное проявление (частота дыхания и пульс) изменялись незначительно.

Эффект от фуллерена  $C_{60}F_{24}$  в дозе 10 мг/кг наступает через 5-7 минут. Животные становятся более подвижными, но на внешние раздражители реагируют слабо. Вертикальная активность уменьшается, а горизонтальная – приобретает характер стереотипии. Выраженный эффект длится около 50-60 минут, после чего нормализуется поведение, реакции становятся адекватными. Другие исследованные фуллерены  $(C_{60}-F_{36}(NH_2)_{12}$ ,  $C_{60}(NH_2)_{12}$ ,  $C_{60}(NO_2)_x$ ) также значительно

модифицировали поведение.

Полученные нами данные коррелируют с сообщением о том, что введение в желудочки мозга крыс гидратированного фуллерена  $C_{60}$  в дозе 7,2 нмоль значительно улучшало функционирование когнитивной сферы [21]. Ряд авторов указывает, что при введении фуллеренов в желудочек мозга отмечалось нарушение функционирования моноаминных систем в мозге крыс [27]. Инъекция фуллерена  $C_{60}$  в дозе 0,25 мг/кг в желудочек мозга увеличивала двигательную активность крыс, кроме того, в их мозге изменялись концентрации моноаминов. В частности, круговороты серотонина и дофамина увеличились в гипоталамусе, коре головного мозга, стриатуме, а серотонина еще и в гиппокампе. Интраперитонеальная инъекция  $C_{60}$  уменьшила только круговорот дофамина в гиппокампе. Нарушение функций медиаторных систем, возможно, и вызывало изменения в двигательной активности [27].

Суммируя собственные и литературные данные, можно прогнозировать возможность создания на основе фул-

леренов  $C_{60}$  средств ноотропного и ангиолитического действия, а при соответствующей модификации их молекул ожидать создания психотропных средств с антидепрессивными и психостимулирующими эффектами. Однако расшифровка принципов деятельности нанорегуляторных систем может открыть самые неожиданные горизонты фармакопсихологии, например, воздействие на волевые функции, мгновенного внесения в память человека больших объемов информации.

### Влияние нановеществ на поведение клеток через GPCR-рецепторы

Большое и широкое семейство генов в царстве грибов, растений и животных, обеспечившее появление GPCR (*G-protein coupled receptors*), привело к делению общей структуры на 7 трансмембранных сегментов, с минимальной последовательностью подобию наиболее удаленным GPCR. Семейство белков GPCR в геноме человека более чем представительно (около 900 членов), а рецепторы и лиганды играют роль во многих аспектах физиологии, фармакологии и имеют отношение к большому числу заболеваний (в ряду примерно 200 GPCR) через изучение его роли в геноме, лиганде, рецепторе. Около 2000 GPCR и несвязанных мембранных протеинов в качестве контроля разделены на 36 кластеров.

Роль рецепторов системы GPCR изучалась на биомоделях генетически модифицированных *нокаутных мышах* [2]. Первым геном, подвергнутым нокауту, был ген рецептора  $A_{2A}$ . Изучение таких мышей показало, что рецептор  $A_{2A}$  играет роль в проведении болевого сигнала

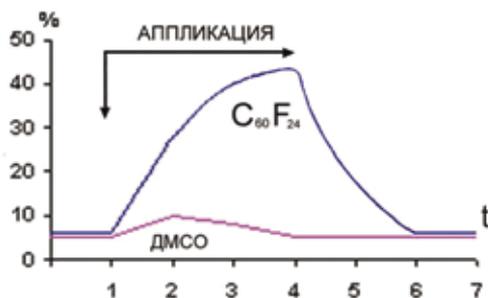


Рис.3. Взаимодействие фуллеренила  $C_{60}F_{24}$  с аденозиновым рецептором  $A_3$  системы GPCR. Аппликация  $C_{60}F_{24}$  (верхняя кривая) производилась в ДМСО (нижняя кривая, контроль)

через периферические участки, ингибировании агрегации тромбоцитов и регуляции кровяного давления. Рецептор  $A_{2A}$  также важен для моторной стимуляции эффектов кофеина. Также было показано, что рецептор  $A_{2A}$  вносит свой вклад в ишемические повреждения мозга у взрослых мышей.

Совместно с лабораторией ЦКП «Биовест» ФЦМО нами исследовано влияние фуллеренилов на их способность связываться с аденозиновыми рецепторами  $A_1$  и  $A_2$ , взаимодействующими с различными G-белками. Было также проверено взаимодействие фуллеренила  $C_{60}F_{24}$  с рецептором  $A_3$ , взаимодействующим с  $G_{i/o}$ -белком (рис.3). Полученные результаты демонстрируют способность GPCR-рецепторов распознавать лиганд фуллеренила и активировать G-белки. Эти предварительные данные иллюстрируют способность нановеществ взаимодействовать с универсальными рецепторными системами мембранных белков. Воспользовавшись удобной схемой взаимодействия лигандов с GPCR-рецепторами [15], мы можем представить механизм влияния фуллеренилов на

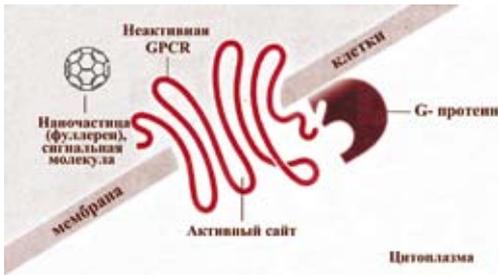


Рис. 4. GPCR осуществляют блокировку сообщения в клетку, пока нановещества (фуллерены) или сигнальные молекулы (гормон, нейромедиатор и т.д.) не обволакиваются активной зоной и образуют сайт.

трансмембранные процессы следующим образом (рис.4 и 5).

Многосторонность системы GPCR значительно превосходит любой другой класс поверхностно-клеточных рецепторов. Природные молекулы, на которые есть отклик GPCR имеют размер от нейротрансмиттеров, которые только в несколько раз больше атома углерода, до протеинов, которые в 75 раз больше него. GPCR участвует во всех функциях организма, которые поддерживают жизнь, от биения сердца и пищеварения до дыхания и активности мозга. Можем предположить, что фуллерены и иные нановещества, как и другие лиганды, способны запускать внутренний каскад регуляторных механизмов поведения клетки (рис.5)

Новые взгляды на функционирование GPCR предполагает появление новых подходов к лечению болезней. Трансмембранные белки представляют собой одну из самых больших групп белков, выполняющих сигнальную, транспортную, защитную, рецепторную, метаболическую и структурную функции (рис. 3, 4) [15]. Несмотря на универсальность структуры GPCR унитарностью к ним обладает великое множество существующих



Рис. 5. Лиганд-рецепторное обволакивание нановеществ (фуллеренов) может обеспечить активацию молекулы G-протеина, которая переключает серию внутримолекулярных взаимодействий и изменяет поведение клетки.

и, надо думать, будущих лекарств. Полученные нами данные позволяют считать, что модифицированные фуллерены имеют все основания стать прототипом будущих инновационных лекарств, действующих на клеточные структуры через GPCR-рецепторы и аналогичные трансмембранные системы.

### Внутриклеточная транслокация наночастиц в мозге

Вне всякого сомнения мозг является органом-мишенью для наночастиц и нановеществ [5, 6]. Попадать они туда могут путем пассивной и активной диффузии, а наноагломераты – путем эндоцитоза. Нами проведены электронномикроскопические исследования фуллеренилов  $C_{60}F_{24}$  и получены данные, подтверждающие общие механизмы транслокации ксенобиотиков в мозге. Фуллеренилы  $C_{60}F_{24}$  вводились крысам WAG/GY интраперитонеально в дозе 20-30 мг/кг или интрацистернально в дозе 6-7нмоль.

Процесс транслокации наночастиц-лигандов в нервную клетку начинался с того, что они взаимодействовали с

рецепторами на нейролемме. Этот вид эндоцитозного поглощения, или опосредованный рецепторами эндоцитоз, отличается по количественным и качественным показателям от эндоцитоза молекул, лишенных сродства к плазматической мембране, и поглощение происходит в соответствии с принципом градиента концентрации (объемный или жидкофазный эндоцитоз) [4, 13] и модуляции транспортных белков (Р-гликопротеид) [16]. Вслед за *первым этапом* взаимодействия, когда происходит связывание наночастиц со специфическими рецепторами на клеточной поверхности, комплексы лигандов образуют на плазмолемме скопления (или кластеры), располагающиеся в местах окаймленных углублений (coated pits).

Окаймление на внутренней поверхности мембраны обеспечивает фибриллярный белок – *клатрин*. Проникновение фуллеренилов  $C_{60}F_{24}$  в места окаймленных углублений сопровождалось инвагинацией в нейрон во время эндоцитоза (рис. 6). В результате образовывались окаймленные пузырьки – своеобразные *везикулярные контейнеры* – носители нановеществ (рис. 6). По мере продвижения в цитоплазму нейрона они теряли клатриновую оболочку и сливались друг с другом или везикулами иного типа, образуя более крупные пузырьки с гладкой поверхностью в виде *эндосом* или *рецепторосом*. В этом процессе мы не наблюдали никаких особых отличий от действия других, более высокоразмерных молекул [4].

Данные о судьбе рецепторов и лигандов ранее удалось установить методом электронно-микроскопического анализа. В опытах с двойной меткой гепатоцитов наночастицами золота неодинакового

размера при инкубации срезов сначала с антителами против лиганда (гликопротеид с терминальной галактозой), а затем с антителами против соответствующего рецептора оказалось возможным идентифицировать везикулярно-тубулярную систему CURL (Compartment of uncoupling of receptor and ligand) [4, 17, 29]. По-видимому, именно там происходят диссоциация рецептора и лиганда, а также их перераспределение, в результате чего *лиганды* сосредотачиваются в *везикулярной* части CURL, а *рецепторы* – в *тубулярном* отделе. Везикулярный фрагмент CURL с лигандом оказывается объектом агрессии лизосом и встроенных в них ферментов, а тубулярный участок, нагруженный рецепторами, ампутируется от системы CURL, и, таким образом, рецепторы, избежав протеолиза, *возвращаются* на поверхность клетки. Сходная по направленности реакция описана нами в отношении ряда психотропных средств и ксенобиотиков [4].

Как и для других веществ, кинетика связывания фуллеренила  $C_{60}F_{24}$  с рецептором и механизмы передачи сигнала жестко не детерминированы и в соответствии с общими закономерностями биологических процессов могут проходить по альтернативному (запасному) пути.

С помощью электронномикроскопических исследований нами визуализирована способность наночастиц к прямому взаимодействию с нейронами (рис. 7). Внутрижелудочковое введение их в обход ГЭБ позволяет обеспечить возможность прямого контакта наночастиц с соответствующими рецепторами на нейрональной плазмолемме, о чем можно судить по наличию многочисленных окаймленных везикул. Транснейронный перенос наночастиц (судя по реакции усиления

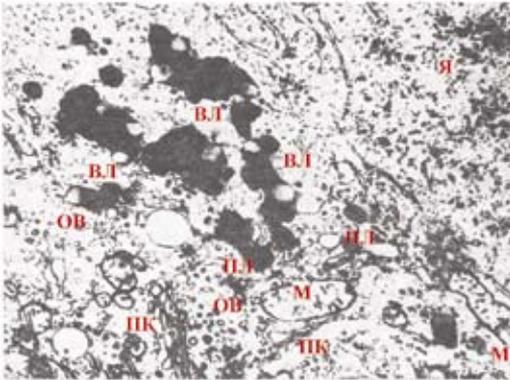


Рис. 6. Увеличение количества окаймленных везикул, сочетающееся с активацией аппарата протеолиза под влиянием фуллеренила  $C_{60}F_{24}$  в дозе 25 мг/кг, введенного интраперитонеально. Обозначения: ОБ – окаймленные везикулы, ПЛ – первичные лизосомы, ВЛ – вторичные лизосомы, ПК – пластинчатый комплекс, М – митохондрии, Я – ядро. Ув. 32 000.

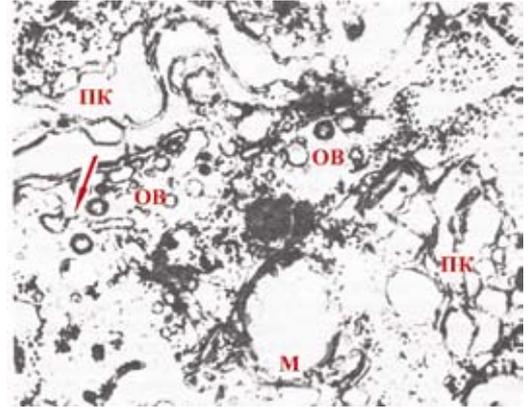


Рис. 7. Влияние интрацистернального введения 6,8 нмоль фуллеренила  $C_{60}F_{24}$  на пластинчатый комплекс клеток головного мозга, в котором наблюдается разобщение (стрелка) окаймленной части CURL, носителя лиганда и тубулярного фрагмента – рециклирующего рецептора. Обозначения те же, что и на рис. 5. Ув. 40 000.

специфического эндоцитоза) отчетливо заметен в большинстве изученных образований, включая кору головного мозга.

Процесс эндоцитоза фуллеренов складывается из ряда последовательных этапов: *кластеризации* комплекса нановещество-рецептор, *интернализации* комплексов с образованием окаймленных везикул, *диссоциации* лигандов и разрушения их в лизосомах или мультивезикулярных тельцах, *рециклирования* рецепторов. Внутринейрональная сортировка лигандов-рецепторов осуществляется в особых везикулярно-тубулярных компартментах, являющихся производными пластинчатого комплекса (рис.6, 7). Все эти процессы более наглядно представлены на рис. 8.

Нами обнаружено, что наночастицы  $C_{60}F_{24}$  взаимодействуют не только с нейронами, но и с астроцитами, что может быть связано с наличием неких, пока неизвестных рецепторов на клетках астроглии. Дальнейшая судьба везикул-

контейнеров, нагруженных наночастицами и для нейронов, и для астроглии одинакова: деградация содержимого осуществляется в лизосомах (*основной путь*) или мультивезикулярных тельцах (*хелперный*, или вспомогательный путь). Не вдаваясь глубоко в анализ механизмов взаимодействия наночастиц с субклеточными структурами, следует заключить, что транслокация фуллеренилов  $C_{60}F_nR_n$  в головном мозге обеспечивается не только при интрацистернальным, но и при системном их введении.

### Геномика, протеомика и иные «наномики»

Молекулярная белковая машина взаимосвязана с информационной структурой *гена*. Белковые «карты» биосистем организма, анализ экспрессии генома на уровне мРНК, геномный анализ клеточных популяций и продолжающаяся «инвентаризация» тканевых белков создали

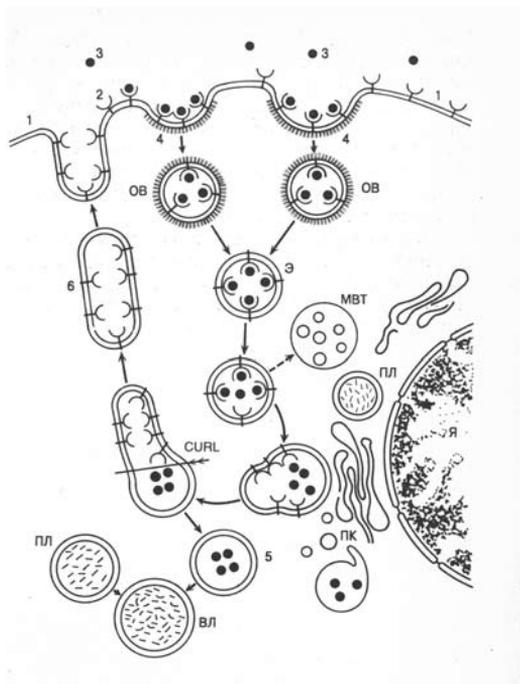


Рис. 8. Гипотетическая схема взаимодействия нановещества-лиганда и рецептора. 1 – плазмолемма нейрона; 2 – рецептор; 3 – наночастица-лиганд (фуллерен); 4 – окаймленное углубление; 5 – везикулярная часть системы CURL; 6 – тубулярная часть системы CURL. Сплошная стрелка – альтернативный путь взаимодействия лиганда с участием мультивезикулярного тельца (MBT); двойная стрелка – место разделения на везикулярную и тубулярную части в системе CURL. Обозначения: ОВ – окаймленные везикулы; Я – ядро; ПЛ – первичная лизосома; ВЛ – вторичная лизосома; ПК – пластинчатый комплекс; CURL – место разделения рецептора и лиганда; Э – эндосома.

предпосылки нового научного направления – *нанопротеомики*. Это следующий за геномикой и протеомикой этап развития биомедицинских технологий для изучения и оценки нанобезопасности и нанозффективности.

Используемые в настоящее время для оценки наноматериалов на животных-моделях биомаркеры были получены несколько десятилетий назад. Необходи-

димо срочно искать более оптимальные варианты. Существует множество новых техник, обещающих лучшие результаты. Они включают разного рода «омики» (геномика, протеомика, экспрессиономика, метаболомика, гистомика, целломика), также как поведенческие профили, телеметрия и улучшенные методы представлений. Эти техники часто дорогие и затратны по времени. Их можно применять в небольших экспериментах, в которых используют генетически однородных животных. Они также нуждаются в валидации в различных лабораториях. Их нельзя применять на аутбредных животных, тем более для оценки нановеществ. Необходимо использование гетерогенных и генномодифицированных животных.

Многообразные химические, белковые, пептидные и иммунные комплексы участвуют в регуляции активности клетки и имеют способность откликаться на сигнал, который в других ситуациях они игнорировали. Индивидуальные протеины имеют свои программы в специфических генах, но эти комбинации рецепторов не всегда соответствуют простым программам поведения, на основе которых оно могло бы быть предсказано. Поэтому они должны быть рассмотрены как продукт «фантома» генов.

Метаболические, физиологические и патофизиологические взаимодействия весьма гибкие, а значит, действие наноматериалов зависит от столь тонких и сложных условий на уровне белка, что только прямой и всесторонний анализ переноса природных протеинов обеспечит перспективы достоверного и соответствующего скрининга и контроля.

Огромные и динамически сложные протеиновые изоформы могут быть ре-

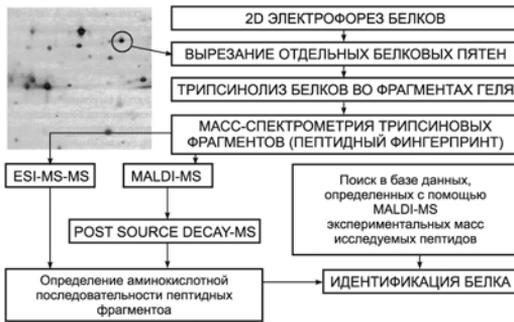


Рис 9. Возможности и последовательность проведения протеомного анализа, в том числе в целях поиска мишеней для оценки безопасности и эффективности нановеществ и нанопрепаратов [по 1].

ально уменьшены до нескольких ключевых *суррогатных биомаркеров* с адекватным количественным и дифференциальным анализом протеиновых объектов [25]. 2D-PAGE обеспечивает лишь качественную технику анализа объектов, а точную информацию о молекулах можно получить с помощью автоматической масс-спектрометрии.

Аналитическая база биомоделирования на основе клеточно-картируемой протеомики включает в себя самые современные методы и подходы [1], представленные на рис 9.

Это открывает перспективы для всестороннего понимания молекулярного уровня действия наночастиц или нанолекарств, или их составляющих в действии. Это повысит качество и скорость данных, полученных из моделей *in vitro*, например, моделей стволовых клеточных культур человека. Эти модели могут быть использованы для создания оптимально соответствующих и быстрых «рецепторов протеиновых изоформ» для условий цитотоксичности, относительной клеточной полиферации и скрининга нановеществ.

## Доминанты нанокинетики и нанодинамики

Правомерность терминов, вынесенных в подзаголовок, можно легко оспорить. Действительно, пока нет достаточных данных, чтобы говорить об общих принципах фармакокинетики или токсикокинетики наноинженерных веществ, равно, как и об их фармако- и токсикодинамике. Но стоит вспомнить, что термины «фармакокинетика» и «фармакодинамика», известные теперь каждому покупателю аптечных лекарств, полстолетия назад употреблялись лишь самыми «продвинутыми» специалистами-фармакологами.

Наноразмерные вещества не являются чем-то абсолютно неожиданным для живых систем. Наночастицы в виде космической и вулканической пыли существовали всегда. Просто поток инженерно-созданных наночастиц будет оказывать большее давление на биосубстраты, менять баланс метаболических систем, что потребует изучения новых механизмов жизнедеятельности, а, возможно, и кардинальных изменений наших представлений об интимных процессах квантово-механического уровня.

Уникальная адсорбционная, реакционная, каталитическая активность наночастиц, их большая удельная поверхность и, соответственно, огромный химический потенциал на межфазной границе, заставляют по-новому взглянуть на структурные параметры функционирования нанокинетических мишеней. Важнейшей доминантой для нанокинетики и нанодинамики является познание интегративных процессов, таких как нахождение функции *дозы* и *времени* и установление связи между *концентра-*

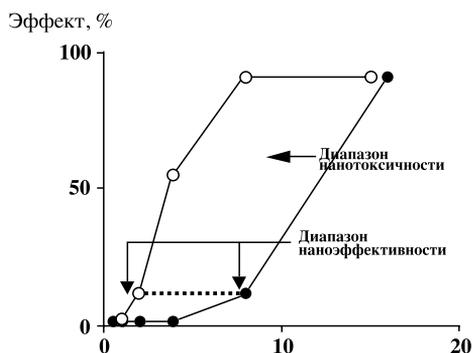


Рис. 10. Теоретическое представление связи концентрация – эффект, определяющая динамический диапазон эффективности для нановеществ от начального действия до токсического проявления. По оси абсцисс: концентрация наносубстанции в плазме крови (выраженная в безразмерных единицах); по оси ординат: процент наблюдаемых эффектов у испытуемых людей или животных. Левая кривая отображает нанодинамические, а правая – нанотоксические эффекты.

цией и эффектом, оптимизации отбора проб. На рис. 10 представлена теоретическая схема соотношения наноэффективности и нанотоксичности для веществ от начального действия до развертывания токсических проявлений.

Обратимся вновь к примеру фуллеренов. Липофильная природа фуллерена  $C_{60}$  предопределяет его локализацию и участие в функционировании неполярных мембранных структур, в переносе различных веществ через мембрану [18, 20]. Фуллерены взаимодействуют с противоionsами, образуя прочные комплексы, что может объяснить некоторые «загадочные» функции аргинин-богатых пептидов и белков (cell penetrating peptides, CPP) в мембранах [22]. Подобные механизмы вносят существенное отличие в сорбционные и метаболические процессы наночастиц, в сравнении с классическими лекарствами и ксенобио-

тиками.

Интересно, что для самого фуллерена найден новый, ранее неизвестный путь метаболизма, не связанный с обычными окислительно-восстановительными реакциями. Было показано, что сам фуллерен  $C_{60}$  подвергается биотрансформации не только в печени, но и в других тканях организма. Более того, метаболизм фуллерена *in vivo* может протекать не по обычным механизмам окисления ксенобиотиков, но и по реакции Дильса–Альдера [9]. Поэтому построение функциональных кинетических моделей для наночастиц требует учета целого ряда новых факторов (рис. 11).

Для тех наночастиц, которые с легкостью проникают через различные мембранные барьеры, быстрое нарастание концентраций может происходить в разных органах, а элиминация осуществляться не одним каким-то предпочтительным путем, например, ренальным, а неравномерно, но сразу по разным путям экскреции: кожа, легкие, печень, почки (рис. 11).

Ткани, в которых будет наблюдаться быстрое и преимущественное нарастание концентрации наночастиц, называют хорошо перфузируемыми или центральными. Ткани, не входящие в центральную камеру, обычно объединяются в одну, две и т.д. дополнительные камеры, которые называются *периферическими*. При построении кинетических моделей для классических лекарств и ксенобиотиков эти камеры называют *медленно перфузируемыми*, так как максимальные концентрации препаратов в них наступают гораздо позже, чем в центральной камере. Когда график зависимости концентрации препарата от времени имеет двухфазный характер, организм рассма-

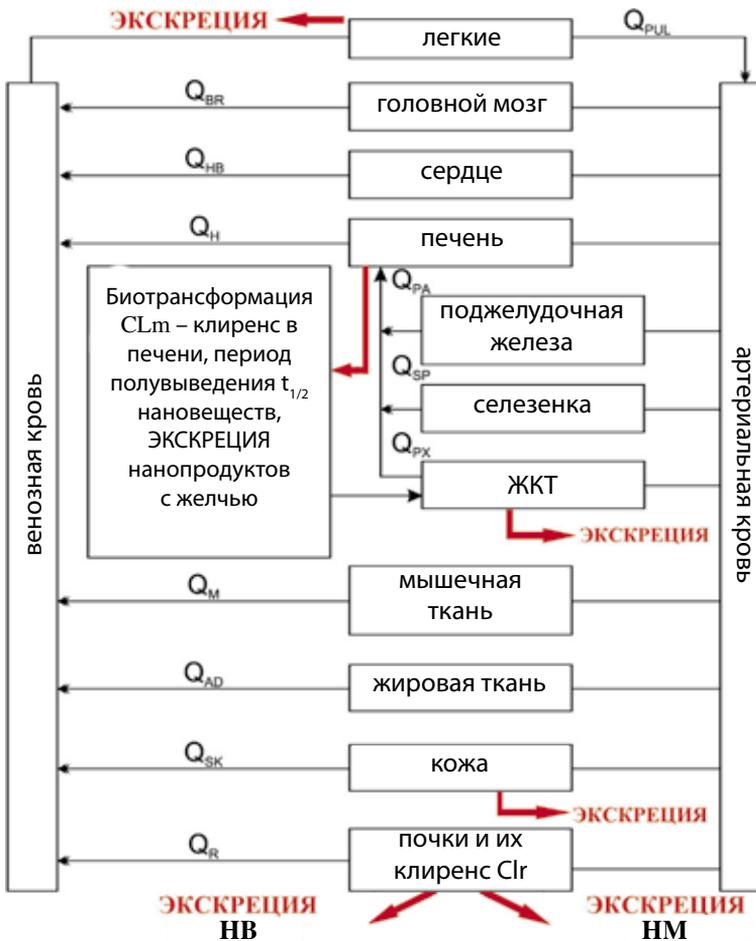


Рис. 11. Теоретическая блок-схема структурно-параметрической функциональной модели для оценки кинетики нановеществ (НВ) и нанометаболитов (НМ).

тривается как *двухкамерная система*, состоящая из центральной и периферической камер. Для наночастиц роль центральных камер теоретически может принадлежать трем, четырем, пяти и т.д. органам. В этом случае математическое моделирование кинетических процессов может быть чрезвычайно громоздким и малопродуктивным.

Биологический эффект ( $E$ ) воздействия наносубстанций на организм в простейшем случае можно описать

функцией одного параметра – введенной в организм дозы ( $D$ ):

$$E = f(D) \quad (1)$$

Многочисленность органов-мишеней для наночастиц, их биодоступности ( $F$ ), разнообразий в рецепторике, константах скоростей поглощения, распределения, метаболизма и выведения ( $k_i$ ), от объема распределения препарата ( $V_d$ ), позволяет представить уравнение (1) в виде:

$$E = f(D, t, F, V_d, k_i) \quad (2)$$

Символы в правой части выражения говорят о существовании сложных взаимоотношений между фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами при создании моделей

действия нановеществ. Установить связь между ними – значит получить возможность анализировать или даже регулировать выраженность эффекта, изменяя тот или иной параметр.

Мультикомпарментное моделирование для одновременного описания фармакокинетики и нанодинамики новых веществ позволяет соотнести наноэффективность с фармакокинетикой:



Рис. 12. Теоретическое представление связи концентрации и фармакодинамических эффектов нановеществ, получившее название «гистерезиса».

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50\%} + C} \quad (3)$$

где  $E_{\max}$  — максимальное значение эффекта при полном насыщении рецепторов,  $EC_{50\%}$  — концентрация вещества в эффекторном компартменте модели, вызывающая 50% эффекта от  $E_{\max}$ .

Такие зависимости широко используются в других областях биомоделирования в биомедицине, но в нашем случае они предсказывают максимальный эффект, который может вызвать нановещество, т.к. при его отсутствии величина эффекта равна нулю.

Вследствие этого эффект нановеществ будет измеряться в условиях *нестационарного состояния* (неустановившегося равновесия между содержанием препарата в плазме крови и тканях, в которых вещество оказывает свое действие). Отставание между достижением максимальной концентрации в плазме крови и тканях ( $C_p$ ) от момента наступления максимального эффекта созда-

ет зависимость, имеющую вид петли гистерезиса (рис. 12).

Подобная форма графика (рис.12) говорит о том, что многочисленные рецепторы, которые обуславливают развитие эффекта, расположены не в плазме крови, а в самых различных областях организма, которые окажутся целевыми органами или целевыми тканями для нанопрепаратов. Формализация концепции гистерезиса позволяет наполнить новым смыслом понятия *эффекторной камеры* и *компартамента* и перейти к непараметрическому фармако моделированию или использовать непараметрические методы моделирования для наночастиц и нанопрепаратов [3].

Фармакокинетику двухкамерной фармакокинетической системы удобно проиллюстрировать на примере модели, состоящей из двух частей. Если внутривенное введение представляет собой быстрое заполнение первой камеры ( $k_{12}$ ), то начинает заполняться и вторая камера ( $k_{21}$ ), до тех пор, пока концентрации в обеих камерах не сравняются. Кинетика распределения в двухкамерной фармакокинетической системе характеризуется тремя константами скоростей: константой скорости элиминации из центральной камеры ( $k_e$ ) и константами скоростей распределения ( $k_{12}$  и  $k_{21}$ ). Изменения концентраций в центральной ( $C_1$ ) и периферической ( $C_2$ ) камерах модели описываются следующим уравнением:

$$C_1^1 = A_1 \cdot e^{-a} + A_2 \cdot e^{-b} \quad (4)$$

В многокамерной же фармакокинетической модели элиминация исходного вещества и каждого из его метаболитов также может иметь моноэкспоненциальный характер, но только если их рас-

смагивать каждый в отдельности. Как представлено на рис. 11 экскреция нановеществ может осуществляться одновременно разными путями (легкие, печень, кожа, почки, ЖКТ), каждый из которых можно рассмотреть как однокомпартментную модель, хотя это и весьма условное допущение. Однако при объединении этих однокамерных звеньев система приобретает новые свойства, анализ которых позволяет выяснить ряд закономерностей, связанных с использованием линейных многокамерных фармакокинетических моделей для изучения метаболизма нановеществ. Математически это достаточно громоздкий и трудоемкий процесс, Поэтому необходим поиск новых подходов компьютерного моделирования, формализованной аксиоматики, критериев Колмогорова, метода Монте-Карло и иных нестандартных принципов математического моделирования.

Проблемы развития нанотехнологии ставят вопросы, на которые потребуются незамедлительные ответы. В их числе: пути поступления наночастиц в организм, их транспорт, биотрансформация, деградация и депонирование, элиминация, инактивация, рецепторные и иные механизмы действия, динамические характеристики в различных органах-мишенях. Наконец, связь динамических и кинетических процессов.

Исследования кинетики и динамики нановеществ только начинаются. Методы прямого измерения концентрации для большинства наночастиц отсутствуют. О нанокинетике фуллеренов  $C_{60}$  можно судить лишь по косвенным данным, согласно которым, например, после однократной ингаляции, эффекты повышенного ПОЛ наблюдались в течение по крайней мере трех месяцев [23]. Связано

ли это с введением собственно наночастиц еще предстоит выяснить. Поэтому методы, приведенные выше, имеют на сегодняшний день ряд методологических ограничений.

С практической точки зрения протоколы исследования нанокинетики имеют малую гибкость, поскольку требуют измерения концентраций в строго определенные моменты времени. Метод, использующий теорему Байеса и оценку максимального правдоподобия (см. формулу 5 полной вероятности Байеса) позволит определить наиболее вероятный набор нанокинетических параметров.

$$P(X_i / H_i) = \frac{F_i(H_L)}{\sum_{l=1}^N F_l(H_L)} \quad (5)$$

где  $N$  – число диапазонов разбиения;  
 $F_i(H_L)$  – частота встречаемости отклонения  $X_i$  в первом диапазоне;  
 $H_L$  – принадлежность к определенному классу нановеществ вычисляется по формуле:

$$P(A_L) = \sum_{i=1}^N P(H_i) \times P(A_L / H_L) \quad (6)$$

где  $P(H_i)$  – вероятность гипотезы  $H_i$ ,  
 $P(A_L / H_i)$  – условная вероятность события  $A_L$  по этой гипотезе.

Вероятность события  $A_L$  (принадлежность к определенной группе нановеществ) определяется формулой:

$$P(A_L / H_i) = \frac{P(X_i / H_L)}{\sum_{i=1}^N P(X_i / H_L)} \quad (7)$$

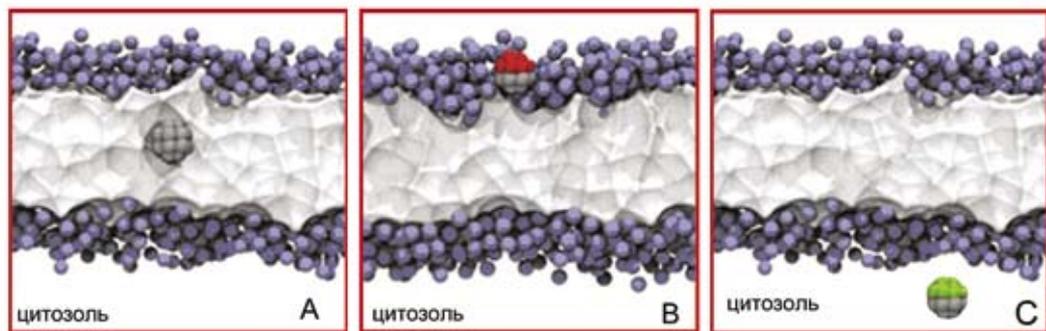


Рис.13. Фуллерен  $C_{60}$  «застревает» в гидрофобном участке (А),  $C_{60}(OH)_{20}$  остается в гидрослое мембраны (В), а  $C_{60}(OH)_{10}$  проникает в цитозоль (С). Схема представлена на основе Оксфордской компьютерной модели (см. текст).

При разработке различных версий Байесовского подхода, нами ранее было показано [3, 4], что вероятностные фармакодинамические и фармакокинетические оценки в значительной степени независимы от вариаций исходных данных. Байесовские оценки параметров  $C_p$ ,  $C_L$ ,  $V_d$ ,  $k_e$ ,  $k_a$  и т.д. вычисляются с помощью таких процедур, как Simplex или иных математических и компьютерных приемов и программ.

### Компьютерные модели, аксиоматика и метод Монте-Карло

Широко применяемые для оценки результативности и токсичности лекарств методы компьютерного моделирования оптимизируются не только в направлении нанобезопасности [5], но применимы и к изучению эффективности нановеществ. Примером компьютерного моделирования на основе сравнения термодинамических возможностей преодоления мембранных структур модифицированными молекулами фуллерена  $C_{60}$ , может служить работа биохимиков Оксфордского университета [NanoWeek 16-22. 03. 2009, №. 59]. Эта виртуальная

модель дает красивую иллюстрацию полученным нами и другими авторами экспериментальным данным (рис.13).

На рис. 13 показаны различия транслокации фуллеренов. Так, если простой фуллерен  $C_{60}$  хорошо проникает через наружный слой, но задерживается в середине мембраны (рис.13А), а  $C_{60}(OH)_{20}$  ввиду своей гидрофильности остается в наружном водном слое (рис.13В), то  $C_{60}(OH)_{10}$  преодолевает мембранный «сэндвич» и достигает цитозольного пространства (рис.13С). Подобные компьютерные модели расширяют возможности моделирования эффектов и тропности нановеществ к рецепторам и органеллам клеток, позволяют прогнозировать пути направленного транспорта и транслокации лекарств, созданных на базе нанотехнологий и прогнозировать их фармакодинамические и фармакокинетические профили.

Тем не менее нанотехнологические инициативы требуют поиска и использования новых математических подходов и методов математического моделирования. Методологические основы современной математической науки, начало которой положили Н.Бурбаки, определя-

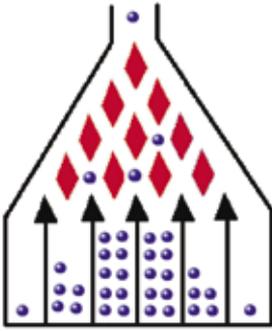


Рис. 14. Доска Гамильтона как пример вероятностного распределения значений в биологическом эксперименте по исследованию эффектов нановеществ.

ют не столько саму математику, сколько объекты, которые она исследует. Это направление, получившее название *формализованной аксиоматики*, возникло на основе аксиоматики Евклида, но отличается точным знанием *правил вывода*, использованием *языка символов и формул*, заменой содержательных рассуждений преобразованиями *формул и числений*.

Представлениям о формально-логических системах, как абстрактных аксиоматических теориях и разрешениям задач *непротиворечивости, полноты и независимости* системы аксиом, мы обязаны Д.Гильберту и А.Н.Колмогорову. Работы А.Н.Колмогорова обосновали и разрешили вопросы сопоставления статистических данных с вероятностной теорией явлений. Согласно критерию А.Н.Колмогорова сходимость ряда

$$\sum \sigma_k^2 k^2$$

является достаточным условием для того, чтобы усиленный закон больших чисел был применим к последовательности взаимно независимых случайных величин  $X_k$ .

На основе теории вероятностей и посылок о вероятностной природе на-

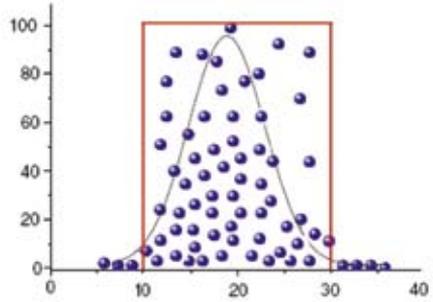


Рис. 15. Пример численного интегрирования функции Гаусса методом Монте-Карло. Точками обозначены мгновенные значения биомедицинских параметров при оценке эффектов нановеществ. На осях абсцисс и ординат условные единицы.

нобиотехнологических явлений, являющихся аксиоматичными по самой сути своей природы, возможно продвижение на основе аксиоматики Колмогорова по пути имитационного моделирования методом Монте-Карло. Сложная форма поведения биологических систем пока не позволяет описать их строгими математическими формулами, тогда как суть моделирования методом Монте-Карло заключается в проведении определенного числа случайных испытаний и экспериментов для оценки поведения каждого компонента биосистемы на уровне нанопроцессов с участием или под влиянием наночастиц, нановеществ или нанопрепаратов.

Механистическим примером биологических испытаний нановеществ может являться «доска Гамильтона» (рис.14). Вбрасываемые шарики распределяются случайным образом и при достаточной выборке подчиняются гауссову, или нормальному, распределению. В сущности то же происходит при любом солидном биомедицинском исследовании в силу стохастичности большинства биологи-

ческих процессов и вероятности распределения откликов биосистем на воздействие наночастиц и нановеществ. В литературе можно найти сотни примеров, подтверждающих аксиоматичность и вероятность реагирования живых систем [3, 4].

Не вдаваясь в детали использования метода Монте-Карло для анализа и оценок нанобиотехнологических экспериментов и их результатов, отметим, что стохастический алгоритм интегрирования методом Монте-Карло заключается в случае многих ( $N$ ) биомедицинских измерений в ограничении  $n$ -мерным параллелепипедом (рис. 15), площадь которого  $S_n$  включает в себя все многообразие экспериментальных данных. В этом случае построение искомой модели методом Монте-Карло осуществляется по формуле  $S = S_n(K/N)$ , где  $K$  – число экспериментальных точек под графиком функции. Метод Монте-Карло применим к анализу сложных биологических систем или явлений, когда иные математические приемы слишком громоздки и трудоемки. Для метода Монте-Карло имеется хорошо разработанный математический аппарат и качественный продукт для компьютерной обработки.

### Заключение

Стремительное развитие нанотехнологий сопровождается явным отставанием нанобиотехнологических исследований. Необходима выработка единой технологической платформы междисциплинарных экспериментов с нанотехнологическими веществами в биологических, доклинических и клинических исследованиях (рис. 16).

Учитывая мировые биоэтические

тенденции по сокращению использования лабораторных животных, необходимо искать адекватные альтернативы при исследовании нанотехнологических веществ и материалов. С одной стороны это определяется тем, что в марте 2009 г. тестирование определенных химических средств на животных было запрещено Европейским Союзом. Запрещение касается проверки острой токсичности, повреждений кожи, повреждений глаз и мутагенности [11]. Тесты на токсичность с повторяющимися дозами, включая чувствительность кожи, будут запрещены с марта 2013 г. [11]. С другой стороны, тенденции к ограничению широкомасштабного использования животных-моделей, а также уникальные свойства нановеществ заставляют проявлять новые биомедицинские инициативы на путях альтернативного моделирования. Наряду с *in vitro*-моделями изучение новых фармакологических свойств нановеществ и наночастиц диктует необходимость разработки специальных методов оценки их эффективности на основе наногеномных, нанотранскриптомных и нанопротеомных технологий.

Иррациональность полного отказа от исследования на животных очевидно даже для начинающих профессионалов. Ряд высококомпетентных авторов [14, 19] выдвинули гипотезу, что нет ни одного подхода, не использующего животных для получения всеобъемлющей информации об эффективности и безопасности веществ. Существует множество форм для достижения этих целей. Для оценки потенциальной чувствительности и адекватной оценки барьерных функций (bronхо-легочных, кожных, желудочно-кишечных, гематоэнцефалических и др.) человека, необходимо и возможно



Рис. 16. Технологическая платформа междисциплинарных биомедицинских исследований наночастиц, нановеществ и лекарственных средств, созданных на основе наноинженерных технологий. *Обозначения:* МБМ – мутантные белки-мишени; ADMET – Absorption, Distribution, Metabolism, Extraction and Toxicity; QSAR – Quantitative Structure Activity Relationship; SBDD – Structure-Based Drug Design; МАБП – мембранно-активные белки и пептиды; ГТЖ – гетерогенные животные, КрЖ – крупные животные (мини-свины, собаки, обезьяны); ГМЖ – генномодифицированные животные;

изучение химического взаимодействия, пептидного взаимодействия, предрасположения тканевой биоактивности, воспаления тканей, пролиферации Т-клеток и др., но только в сочетании с корректными оценками на животных.

Генетические вариации в отклике на лекарства, ксенобиотики, токсиканты и нановещества у человека идентифицировать трудно, поскольку определение вариаций может опоздать. Целесообразнее анализировать эти вариации на гетерогенных животных, их инбредных, трансгенных и нокаутных линиях, позволяющих определять гены, ответственные за генетический полиморфизм,

а затем смотреть, являются ли эти же гены ответственными за соответствующие отклики у человека на ранних стадиях испытаний. Генетический профиль животных проще чем у человека, а большее количество генов, ответственных за отклик нановеществ может быть легче найден и использован для создания персонализированных лекарств.

Предлагаемая нами технологическая платформа представляет собой замкнутый цикл поиска и оценки эффективности и безопасности нановеществ, как потенциальных инновационных лекарств на путях от их скрининга до мониторинга возможных сайдэффектов в IV фазе

клинических наблюдений (рис.16). Важным элементом техноплатформы является привнесение в традиционную схему изыскания и контроля действия новых лекарств изучения специфических для нановеществ и только им присущих особенностей влияния на термодинамику и жизнедеятельность биосистем, таких как наноэффективность, нанобезопасность, фармакодинамики и фармакокинетики структур наноразмерного уровня.

Другим важным элементом предлагаемой техноплатформы является обязательное мониторинговое наблюдение эффектов нанолечений (внеклинические испытания) во всех фазах клинических оценок и применения. Поскольку создается принципиально новый для медицинской практики класс лекарственных средств, резко возрастает роль фармаконадзора не только на этапах разрешения и внедрения таких препаратов, но и на всем протяжении их широкого медицинского применения.

Нановещества не могут быть определены как простой гомогенный класс. Наши исследования фуллерена  $C_{60}$  и созданных на его основе фуллеренилов  $C_{60}F_nR_n$  показали, что наряду с их общими чертами биологического действия, каждое из наносоединений имеет свой облик фармакологического действия. Общими являются принципы транслокации в клетках на основе единого механизма образования окаймленных везикул и взаимодействия с CURL-системой. Мы обнаружили, что такие нановещества, как фуллеренилы, не только способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, но и взаимодействовать с органеллами нейронов и глиальных клеток. Способность фуллеренов взаимодействовать с GPCR-рецепторами позволяет раскрыть

механизм их влияния на мембранные белки и системы транспорта наночастиц в живых системах (рис.16).

Нановещества являются удобными кандидатами для создания фармакологических средств, осуществляющих регуляторные и управляющие воздействия в ЦНС и в исполнительных органах. Способность фуллеренилов  $C_{60}F_nR_n$  направленно влиять на интрацентральные процессы головного мозга, изменять спектральные мощности электрической активности мозга и когерентные функции, хорошо подтверждается изменением ими системных поведенческих реакций. Это дает основание думать о фуллеренах не только как об участниках в нанотранспортных процессах лекарственных средств, но и как веществах прямого действия на структуры и процессы головного мозга. На основании собственных данных мы прогнозируем модифицированные фуллерены как возможные средства анксиолитического, ноотропного и других видов психотропного действия.

Важным моментом является изучение и оценка нанокинетических параметров, которые могут быть получены из структуры нановеществ и их квантово-механического взаимодействия с биологическим окружением. Мы не можем вычленить изучение нанокинетики из потенциального порядка действий, включая оценку нанофармакодинамических компонентов и безопасности нановеществ (рис.16). Удобным и оптимальным на данном этапе является использование байесовских функций, поскольку стохастичность конечных эффектов нанотехногенных веществ, связанных с их сорбционными свойствами, распределением, биотрансформацией и элиминацией кар-

динально отличаются от проявлений их большеразмерных аналогов. Математическое и компьютерное моделирование нанобиотехнологических процессов в живых системах на начальных этапах изучения может основываться на аксиоматике Колмогорова и методе Монте-Карло. Хотя поиск адекватных математических моделей должен быть продолжен.

Характеристика влияния созданных через наноинженерные технологии продуктов на здоровье – вопрос, который активно дебатруется и дискутируется. Определение порядка действий для выявления эффектов от нановеществ будет ключевым в понимании данных, полученных в эксперименте для их экстраполяции в отношении человека.

### Литература

1. Арчаков А.И. Геномика, протеомика и биоинформатика – науки XXI столетия // *Медицинская кафедра*, № 3, с. 6-13, 2002.
2. Геномика в медицине. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005.
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т.1. Основы биомедицины и фармако моделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
4. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
5. Каркищенко Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов // *Биомедицина*, № 1, с. 5-18, 2009.
6. Каркищенко Н.Н., Сахаров Д.С., Филиппов А.А., Соколов В.Б. Спектральная мощность ЭЭГ крыс при интраперитонеальном введении фторсодержащих

фуллеренов // *Биомедицина*, № 1, с. 25-30, 2009.

7. Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды / Под ред. Ю.А. Рахманина – М., 2007.

8. Основы политики Российской Федерации в области развития науки и технологий на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу // *Поиск*, № 16, 2002.

9. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. – СПб: Изд-во Росток, 2006.

10. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горикова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. – М.: Техносфера, 2007.

11. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetics products // *Official Journal of the European Union*, L66, 26-35, 2003. 1.

12. FDA's critical path initiative. – Rockville, MD, USA: US food and drug administration // <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/>.

13. Fujimoto M., Okabayashi T. Functional properties and “Tright turn” connections of clathrin-cjfted endocytic vesicles // *Life Sci*, vol.30, No 1, pp.51-57, 2002.

14. Jowsey I.R. Proactive surveillance of contact allergies: an important component of the risk management strategy for skin sensitizers // *Contact Dermatitis*, 56, 305-310, 2007.

15. Kenakin T.A Pharmacology Primer. – Academic Press [Elsevier], 2006.

16. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs // *Adv Drug Deliv Rev.*, Mar 23; 47(1):65-81, 2001.
17. Lamaze C., Schmid S.L. The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways // *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 7, pp. 573- 580, 2005.
18. Nishihara M., Perret F., Takeuchi T. et al. Arginine magic with new counterions up the sleeve // *Org. Biomol. Chem.*, vol. 3, pp.1659-1669, 2005.
19. Ormandy E.H., Schuppli C.A., Weary D.M. Worldwide trends in the use of animals in research: the contribution of genetically-modified animal models // *ATLA*, 37, pp. 63-68, 2009.
20. Perret F., Nishihara M., Takeuchi T. et al. Anionic fullerenes, calixarenes, coronenes and pyrenes as activators of oligo/polyarginines in model membranes and live cells // *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, pp.1114-1115, 2005.
21. Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A. et al. Effects of hydrated forms of C<sub>60</sub> fullerene on amyloid 1-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task // *J Nanosci Nanotechnol.*, 7(4-5):1479-85, 2007.
22. Sakai N., Matile S. Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes // *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, pp.14348-14356, 2003.
23. Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C<sub>60</sub> water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles // *Nano Lett.*, Aug;7(8):2399-406, 2007.
24. Selvi B.R., Jagadeesan D., Suma B.S. et al. Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo // *Nano Lett.*, Oct;8(10):3182-8, 2008.
25. Schratzenholz A. Proteomics: how to control highly dynamic patterns of millions of molecules and interpret changes correctly? Drug Discovery Today – Technologies 1, 2004.
26. The innovative medicines initiative research agenda // [http://imi.europa.eu/docs/imi-gb-006v2-15022008-research-agenda\\_en.pdf](http://imi.europa.eu/docs/imi-gb-006v2-15022008-research-agenda_en.pdf), 2008.
27. Yamada T., Jung D.Y., Sawada R. et al. Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60]fullerene on brain functions differ in rats // *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Aug;8(8):3973-80, 2008.
28. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E. et al. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: <sup>14</sup>C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // *Chem. Biol.*, Jun;2(6):385-9, 1995.
29. Yu G.F., Aldrich P.T. Inhibition of coated and non-coated membrane invaginations with translocation to complex Golgi // *New J. Brain Res.*, vol. 8, No. 1-2, pp. 109-112, 2006.

## NANOENGINEERING DRUGS: NEW BIOMEDICAL INITIATIVES IN PHARMACOLOGY

**N.N.Karkischenko**

*Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow*

It has been established that nanomatters, which were done on the base on  $C_{60}F_nR_n$  polyfluorides influence on regulatory process by reducing of spectral brain capacity in  $\Delta$ -,  $\theta$ -diapasons and reliable incrise them in  $\sigma$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -diapasons, change coherent pattern between different brain zones. Changes in behavior reactions WAG/GY rats under  $C_{60}F_nR_n$  was character for anxiolytic and nootropic actions. It was shown that nanomatters interact with transmembrane GPCR-receptor, get over gematoencephalitic barier by endocytosis, and theirs translocation in neurons and astroglia brain cells carry out throw CURL-system. In this article necessity of search of the new nanogenomic, nanoproteomic ways of alternative modeling and optimization of genetically-modified laboratory animals choice is based on facts. There is a new look on estimation of kinetic parameters of nanomatters and nanopharmacokinetic model construction on the base of Bayesian functions, Colmogorov axiomatic and Monte-Carlo method. A combined technological platform destined to identification nanoengineering prototypes of new highly effective drugs.

**Key words:** nanoparticles translocation, fullerenes, GPCR-receptors, nanoendocytosis, CURL-system, nanokinetic, axiomatic and Monte-Carlo method, technological platform.



## РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

### Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLeprdb/+

О.И.Степанова, В.Н.Каркищенко, О.В.Баранова, Х.Х.Семенов,  
Т.Б.Бескова, Т.В.Галахова, Н.А.Онищенко\*, Н.В.Касинская

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва  
\*ФГУ ФНЦ трансплантологии и искусственных органов  
им. ак. В.И.Шумакова Минздравсоцразвития РФ, Москва*

Изучена клиническими, биохимическими и морфологическими методами отечественная генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLeprdb/+, которая воспроизводит стадийность течения заболевания и соответствующие патогенетические, функциональные и структурные изменения в организме.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа, мыши db/db, поджелудочная железа, углеводный обмен.

Сахарный диабет (СД) 2 типа во всем мире является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, развитие которого связывают со снижением рецептор – опосредованной чувствительности клеток организма к эндогенному инсулину [2, 4]. СД 2 типа, как любая хроническая патология, развивается на фоне прогрессирующей дисфункции иммунной системы с развитием аутоиммунного повреждения островковой ткани поджелудочной железы (ПЖ) [1, 6, 8] и сосудистой стенки [3]. В эксперименте для изучения этой патологии создают токсическую модель СД путем затравки животных аллоксаном или стрептозотоцином, моделирующих, только, нарушения типичные для СД 1 типа. Модель аутоиммунного СД, также воссоздает нарушения СД 1 типа. В России модели СД 2 типа в эксперименте от-

сутствуют.

Целью настоящего исследования явилось обоснование пригодности мутантных мышей линии C57BL/KsJYLeprdb/+ для использования в качестве экспериментальной модели СД 2 типа.

### Материал и методы

Патофизиологические изменения в организме при СД 2 типа изучали на мутантных мышах C57BL/KsJYLeprdb/+(B/Ks-Leprdb/+), которые несут рецессивный ген *leptin receptor-Leprdb-(db)* (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). Ген *db* в гомозиготном состоянии вызывает диабет, обусловленный снижением рецептор-опосредованной чувствительности клеток организма к эндогенному инсулину. Мыши-диабетики B/Ks-Leprdb/Leprdb (db/db) обоих полов

бесплодны [5, 9, 10, 17]. Для контроля динамики развития СД 2 типа использовали 2 группы здоровых мышей: фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии В/Кs-Lep<sup>rdb</sup>/(db/+) и мыши линии С57BL/10 (В10). В работе было использовано 330 мышей: 150 мышей – в опытной группе и 180 мышей – в контрольных группах. Изучали патофизиологические закономерности развития СД 2 типа. Фиксировали массу тела, суточное количество принятой пищи и выпитой воды, продолжительность жизни животных. В цельной крови исследовали содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>), показатели липидного обмена – общий холестерин (ОХ), триглицериды (ТГ), а также липопротеиды высокой и низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП). В динамике проводили гисто-

логические исследования внутренних органов, участвующие в патогенезе СД 2 типа.

### Результаты исследования и обсуждение

В настоящее время в России не существует биомодели для изучения СД 2 типа. В НЦБМТ РАМН имеются линии мышей, генетически предрасположенные к СД 2 типа. Учитывая это обстоятельство, на мышах линии С57BL/КsJYLepr<sup>rdb</sup>/(В/Кs-Lep<sup>rdb</sup> db/+), выведенных в Центре, изучалась возможность использования животных этой линии в качестве генетической модели СД 2 типа. Была дана объективная патофизиологическая характеристика динамики состояния мутантных мышей линии В/Кs-Lep<sup>rdb</sup> db/+.

**Таблица 1**  
Содержание глюкозы, HbA<sub>1c</sub> и показатели массы тела у мышей разных линий и возраста

Показатели углеводного обмена и массы тела	Линии мышей		
	db/db (СД 2) 1-я группа	db/+ (контроль) 2-я группа	В10 (контроль) 3-я группа
Возраст 1 месяц			
Глюкоза, ммоль/л	10,3±2,4* (n=90)	5,4±0,5 (n=30)	5,6±0,3 (n=30)
HbA <sub>1c</sub> , %	4,9±1,0*	3,5±0,07	3,0±0,08
Масса тела, г.	19±2,5*	13±1,2	15±1,8
Возраст 2 месяца			
Глюкоза, моль/л	18,7±3,83*(n=90)	5,8±0,42 (n=30)	5,9±0,03 (n=30)
HbA <sub>1c</sub> , %	7,9±1,11*	3,6±0,1	3,2±0,13
Масса тела, г.	35±2,37*	15±2,69	18±2,49
Возраст 4 месяца			
Глюкоза, моль/л	25,5±3,49*(n=78)	4,6±0,39 (n=30)	4,9±0,69 (n=30)
HbA <sub>1c</sub> , %	8,6±1,16*	3,7±0,25	3,7±0,22
Масса тела, г.	40±2,68*	19±2,26	21±2,27
Возраст 6 месяцев			
Глюкоза, моль/л	27,4±2,09*(n=23)	5,7±0,65 (n=30)	5,4±0,38(n=30)
HbA <sub>1c</sub> , %	8,9±1,25*	3,9±0,57	3,8±0,49
Масса тела, г.	17±2,35*	24±1,80	27±1,64

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными группами.

**Значения показателей липидного обмена  
у мышей разных линий к 4 месяцу после рождения**

Группа	Линия мышей	ОХ, ммоль/л	ЛПВП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л
1	db/db (СД 2) (n=40)	3,23±0,50	1,74±0,26	0,69±0,15**	1,0±0,45*
2	db/+(контроль) (n=30)	3,02±0,32	1,28±0,39	0,85±0,33	1,42±0,48
3	В10(контроль) (n=30)	2,98±0,28	1,96±0,38	0,81±0,11	0,7±0,35

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой 2.

\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой 3.

**Клиническая и биохимическая характеристика** генетической модели СД 2 типа у мутантных мышей линии В/Кs-Lep<sup>r</sup> db/+. При динамическом исследовании показателей углеводного обмена у гомозиготных мышей опытной группы – db/db с момента рождения было установлено, что уже на 3-4 неделе жизни уровень глюкозы в крови у мышей db/db повышается с 4,3-6,0 ммоль/л. (исходный уровень сразу же после рождения) до 9-13 ммоль/л. и в среднем достигает 10,3±2,4 ммоль/л. Содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1c) повышается с 3,0-3,5% до 4,9±1,0%, а уже к 6-7 неделе превышает 5,2-6,1%. Результаты измерения указанных показателей достоверно отличаются от аналогичных показателей в контрольных группах у генетически здоровых мышей (табл. 1).

Анализ динамических измерений содержания в крови глюкозы и HbA1c в опытной и контрольных группах мышей показывает, что у мышей db/db на 1, 2, 4 и 6 месяцев после рождения нарушения углеводного обмена прогрессируют и достоверно отличаются от аналогичных показателей в контрольных здоровых группах гетерозиготных мышей db/+ и В10. Отдельные показатели липидного

обмена через 4 месяца после рождения в группе мышей db/db также достоверно отличаются от аналогичных показателей у мышей контрольных групп (табл. 2).

Недостаточно более высокие цифры ОХ (3,23±0,50 ммоль/л.) в опытной группе мышей db/db (1 группа) по сравнению с контрольными группами 2 и 3 (табл. 2) не доказывают, однако, отсутствия нарушений жирового обмена у этих животных. Полученные данные (без учета липопротеидов очень низкой плотности – ЛПОНП) позволяют нам высказать предположение, что у мышей db/db имеются нарушения не только углеводного, но и жирового обмена. Достоверно более низкие значения в крови ТГ, ЛПНП у мышей db/db к 4 месяцу после рождения, по сравнению с фенотипическим контролем (животные 2 группы) следует, вероятно, рассматривать как результат активного 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, становится развитие жировой дистрофии печени уже ко 2

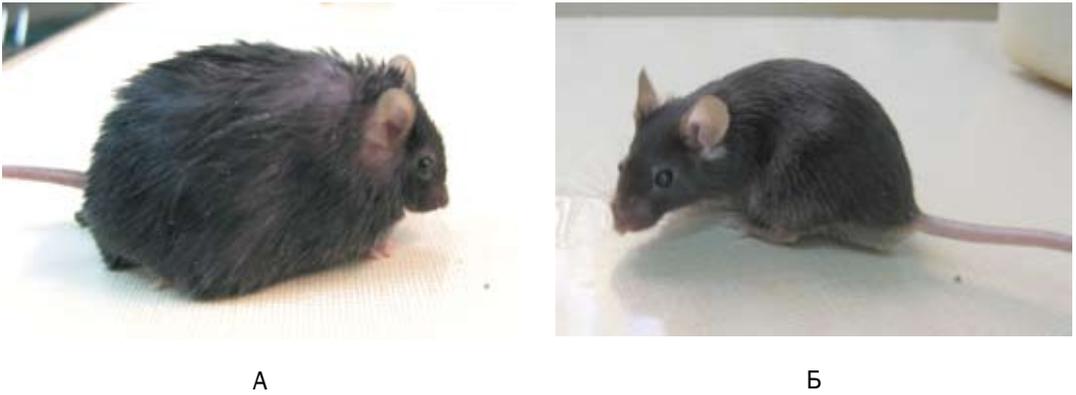


Рис. 1. Различия в массе тела опытной – db/db-мыши и контрольной – db/+-мыши той же линии в возрасте 4 мес. А – Опытная мышь (гомозиготная) db/db, масса тела – 41г. Б – Контрольная мышь (гетерозиготная) db/+, масса тела – 22г.

месяцу, что было выявлено нами гистологическими методами исследований (рис. 6). Из-за невозможности аппаратного обеспечения измерений ЛПОНП, которые являются основной дислипидемической субстанцией [13, 14, 15, 16, 18], более глубокая интерпретация результатов измерения (ТГ, ЛПВП и ЛПНП) у мышей db/db опытной и контрольных групп, нами не проводилась. Однако прогрессирующее увеличение массы тела у мышей db/db по сравнению с контролем, свидетельствует о появлении ожирения, типичного для СД 2 типа (табл. 1), и, следовательно, о нарушениях жирового обмена у этих животных. Так у мышей db/db к 1 месяцу после рождения масса тела повышалась до  $19 \pm 2,5$  г, ко 2 месяцу – до  $33 \pm 2,37$  г; к 4 месяцу – до  $39 \pm 2,68$  г (табл. 1 и рис. 1), причем масса тела некоторых особей к 4 месяцу достигала  $48 \pm 4,9$  г. ( $n=7$ ); у 4-х мышей наблюдалось более быстрое повышение массы тела до 68-70 г, что намного превышало значения веса у контрольных животных к аналогичному сроку.

Для мышей db/db были характерны

и другие клинические признаки СД 2 типа, такие как полидипсия и полиурия; которые становились отчетливо выраженными со 2 месяца после рождения. В среднем в сутки они выпивали до 25-30 мл ( $25,74 \pm 1,18$ ) воды, тогда как животные контрольных групп в среднем 4-5 мл ( $4,69 \pm 0,35$ ;  $p < 0,05$ ), у них развивалась полифагия, т.к. они в 2,4 раза больше съедали кормов (брикетированного корма, г) за сутки ( $8,86 \pm 0,29$ ;  $p < 0,05$ ), чем в контрольных группах ( $3,74 \pm 0,096$ ;  $p < 0,05$ ); у мышей db/db развивалась также мацерация кожных покровов. Мацерация возникала в области холки у (20-25%,  $n=20-23$ ) животных (рис. 2) и, как правило, внезапно в возрасте 120-158 дней, в виде небольшого расчесывания с корочкой или без, которая в течение 5-14 дней становилась обширной незаживающей раной и оставалась у животного вплоть до его гибели.

Отмечено также, что у мышей db/db в период с 4-го по 6-й месяцы жизни наступает быстрая потеря массы тела и животное принимает вид «заморыша» (рис. 3), причем уровень глюкозы и HbA1c в



А



Б



В

Рис. 2. Развитие мацерации кожного покрова у мышей db/db.

А – Начало возникновения мацерации на 123 сутки после рождения.

Б – Образование кожных ран на 128 сутки после рождения.

В – Кожная рана в области холки в возрасте 135 суток после рождения.

крови продолжает оставаться высоким (табл. 1).

С 4-го месяца после рождения течение СД приобретает признаки сходные с клиникой СД 1 типа (у животных на фоне гипергликемии выражены признаки полидипсии, полиурии и происходит быстрое снижение массы тела). За 3-5 дней до гибели у животных наступает истощение (вес тела может достигать  $11,5 \pm 1,66$  г;  $p < 0,05$ ), развивается гипогликемия (уровень глюкозы в крови составляет  $0,8 \pm 0,21$  ммоль/л;  $p < 0,05$ ), снижается аппетит (в 5 раз) и потребление воды (в 10 раз). Средний срок жизни мышей db/db составлял  $169 \pm 30$  дней [11], тогда как у контрольных линий – фенотипически здоровых гетерозиготных мышей db/+ срок жизни составляет  $656 \pm 20$  дней; у здоровых мышей линии B10 –  $785 \pm 13,9$  дней [5, 7, 9].

**Морфологические изменения** в паренхиме внутренних органов при СД 2 типа у мутантных мышей линии V/Ks-Lepr db/+. Гистологически у гомозиготов db/db мышей этой линии были выявлены нарушения в структуре поджелудочной железы, печени, почек и селезенки, типичные для СД 2 типа.

**Поджелудочная железа (ПЖ).** Исследования показали, что ко 2-му месяцу жизни островковый аппарат ПЖ у мышей db/db характеризовался отчетливо выраженными адаптационными перестройками. Островки Лангерганса (ОЛ) в ПЖ умеренно гипертрофировались, увеличивались по площади ( $99269,5 \pm 1250$   $\mu\text{km}^2$ ) и количеству в них клеток ( $294 \pm 27$ ) по сравнению с группами контрольных здоровых животных (табл. 3), причем в ОЛ мышей db/db доминировали базофильные  $\beta$ -клетки (рис. 4А), что позволяло предполагать достаточно высокий уровень выработки ими инсулина. Однако к 4-му и особенно к 6-му месяцу количество ОЛ и их размеры достоверно



А



Б

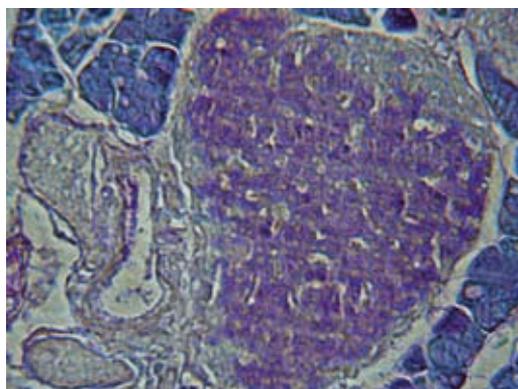
Рис. 3. Масса тела мыши db/db в разные возрастные сроки. А – в возрасте 4 месяца – 38 г. Б – в возрасте 6 месяцев – 18 г.

уменьшались, контуры ОЛ становились размытыми, снижались площадь ОЛ и количество в них клеток, в том числе базофильных (рис. 4Б).

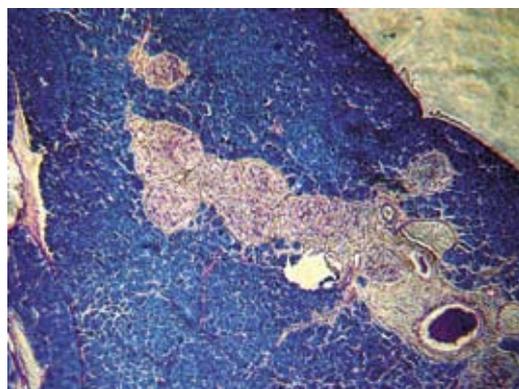
К 6-му месяцу жизни у животных db/db отмечалось выраженное и до-

стоверное уменьшение площади ОЛ ( $9910,6 \pm 634 \text{ mkm}^2$ ), а также снижение содержания в них клеток ( $75 \pm 19$ ), по сравнению с контрольными группами (табл. 3 и рис. 4).

В ПЖ у 4-6 месячных животных, страдающих СД 2 типа, нами отмечались явления выраженного перидуктального и интралобулярного склероза с атрофией



А



Б

Рис. 4. Морфологические изменения активности островков Лангерганса в ПЖ у мышей db/db в динамике развития СД 2 типа; окраска альдегид-фуксином по Гомори. А – в возрасте 2 месяцев после рождения; доминируют базофильные  $\beta$ -клетки в ОЛ. Ув. 400. Б – в возрасте 4 месяцев после рождения; снижение количества базофильных  $\beta$ -клеток ОЛ. Ув. 200.

**Морфометрическое исследование ПЖ, селезенки и массы селезенки  
мышей разных линий и возрастов**

Возраст, мес.	Морфометрические показатели	Линии мышей		
		db/db (СД 2)	db/+ (контроль)	В10 (контроль)
2	Площадь ОЛ, мкм <sup>2</sup>	99269,5±1250 *	58954,7±1017	60838,7±1352
	Количество клеток ОЛ	294 ±27 * (n=20)	226±34 (n=20)	234±22 (n=20)
4	Площадь ОЛ, мкм <sup>2</sup>	29569,8±1017 *	58954,7±1051	60838,7±1250
	Количество клеток ОЛ	101±41 * (n=20)	226±38 (n=20)	234±47 (n=20)
6	Площадь ОЛ, мкм <sup>2</sup>	9910,6±634 *	58954,7±690	60838,7±512
	Количество клеток ОЛ	75±19 * (n=20)	226±40 (n=20)	234±57 (n=20)
6	Площадь фолликулов селезенки, мкм <sup>2</sup>	26123,9±320 *	83207,4±405	85769,6±398
	Масса селезенки, г	0,036±0,02 *	0,089±0,016	0,099±0,013

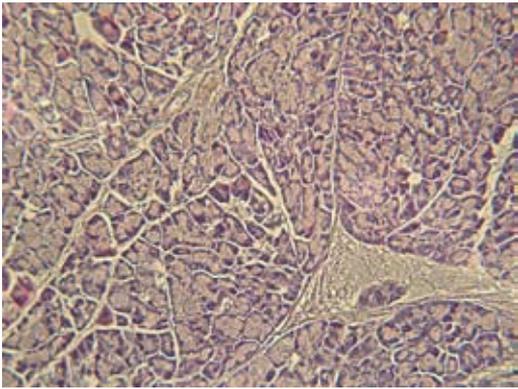
\* – p<0,05 по сравнению со значениями аналогичных показателей контрольных групп.

паренхимы железы, а так же интра- и перилобулярного липоматоза (рис. 5).

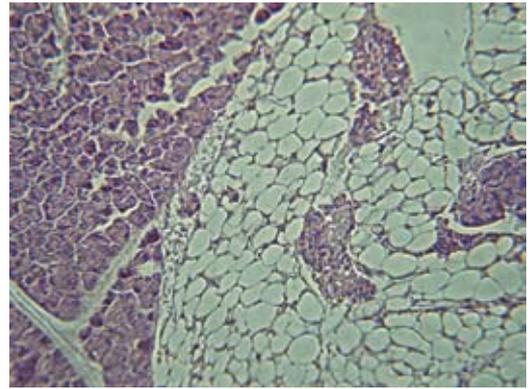
В некоторых наблюдениях между прослойками соединительной и жировой ткани определялись очень мелкие замурованные атрофические панкреатические островки, представленные скоплением небольшого количества базофильных клеток (от 9 до 15 в группе).

**Печень.** Макро- и микроскопические изменения печени у мышей db/db становились резко выраженными к 4-6 месяцам жизни, хотя уже у 2 месячных животных (рис.6Б) мы отмечаем прогрессирующее снижение накопления гликогена в гепатоцитах по сравнению с контролями и появление на периферии долек признаков средне-крупнокапельной жировой дистрофии. Печень у 4-6 месячных животных

была дряблой консистенции, желтовато-красного цвета, с жирным налетом. Количество гликогена в гепатоцитах значительно уменьшалось, иногда определялось в следовых количествах (рис.6Г) или полностью отсутствовало. Одновременно развивалась выраженная жировая дистрофия печени. Гепатоциты всех отделов дольки находились в состоянии мелко-крупнокапельной жировой дистрофии (рис. 6Д). Таким образом, обнаруженные нами изменения в печени у мышей, страдающих СД 2 типа, подтверждают данные литературы [12, 13, 14, 19] об снижении интенсивности гликолиза и синтеза гликогена, с усилением глюконеогенеза, что подтверждается избыточным отложением жира, связанным с инфильтрацией печени липидами на фоне прогрессирующей дислипидемии и холестеринемии.



А



Б

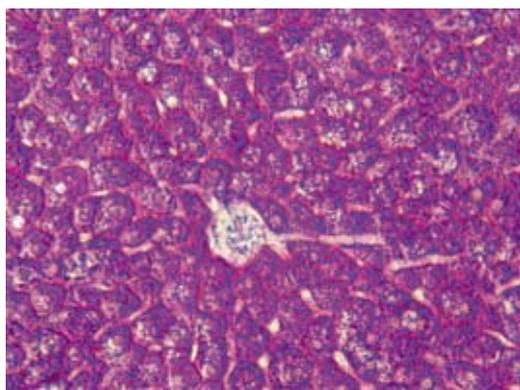
Рис. 5. Морфологические изменения в островковой ткани поджелудочной железы мышей db/db с СД 2 типа после в возрасте 5 мес. после рождения. А – уменьшение площади и клеточного количества ОЛ за счет перидуктального и интралобулярного склероза ПЖ (указано стрелкой), окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400. Б – уменьшение площади и клеточного количества ОЛ за счет пери- и интралобулярного липоматоза (указаны стрелками) ПЖ, окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

**Селезенка.** У мышей db/db были также выявлены выраженные изменения в иммунокомпетентных органах – селезенке и региональном лимфатическом узле ПЖ. Селезенка у этих мышей подвергалась прогрессирующей гипоплазии, начиная с 4 месяца. К 6 месяцу масса ее ( $0,036 \pm 0,02$ ) была почти в 2,5-2,8 раза меньше, чем в контрольных группах (табл. 3). Лимфоидные фолликулы селезенки были также с явлениями гипоплазии и атрофии (рис. 7), в большинстве наблюдений рисунок строения был стерт, фолликулы без центров размножения.

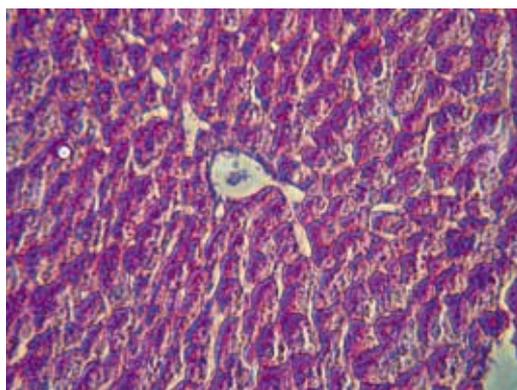
Площадь лимфоидных фолликулов как в селезенке ( $26123,9 \pm 320 \text{ мкм}^2$ ), так и в региональном лимфатическом узле были уменьшены более чем в 2 раза по сравнению с контрольными группами:  $65404,2 \pm 405 \text{ мкм}^2$  и  $54669,6 \pm 398 \text{ мкм}^2$ , соответственно. Сопоставление веса селезенки с морфометрическими исследованиями площади фолликулов в селезенке, а также в лимфатическом узле

подтверждает (табл. 3), что в группе db/db на поздних сроках развития болезни возникают отчетливые признаки развития иммунного дисбаланса (иммунодефицитного состояния) в организме, что также является обязательным сопутствующим признаком развития СД 2 типа.

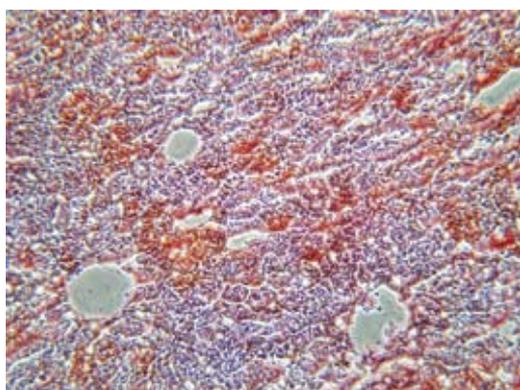
**Почки.** Помимо оценки морфологических изменений, возникающих в ПЖ, печени и селезенке оценивались изменения, происходящие в почках у контрольных мышей и у мышей с СД 2 типа. В группе мышей с СД 2 типа, т.е. мышей db/db, почки к 4-6 месяцам претерпевали изменения, которые можно было охарактеризовать как диабетическая микроангиопатия. Морфологически это проявлялось утолщением базальной мембраны эндотелиальной выстилки капилляров за счет накопления в ней PAS-положительных субстанций (липоглианлин), а в некоторых участках отмечалось диффузное утолщение мезангиального



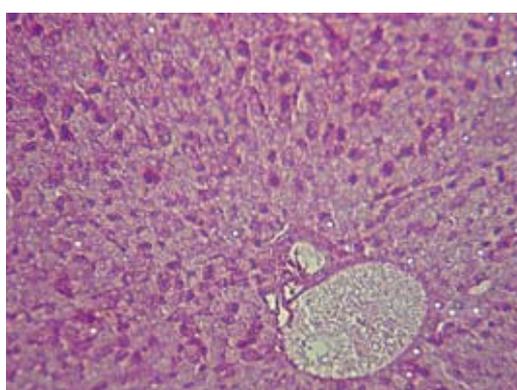
А



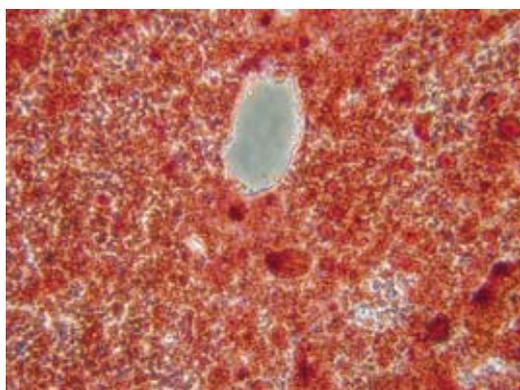
Б



В



Г



Д

Рис. 6. Гистологическое состояние ткани печени в контроле и в опытной – группе мышей db/db в динамике развития СД 2 типа. А – контроль (норма) содержание гликогена в печени гетерозиготных мышей; окраска PAS – реакцией. Ув. 200. Б – снижение накопления гликогена в гепатоцитах печени мышей db/db через 2мес. после рождения; окраска PAS – реакцией. Ув. 400. В – средне-крупнокапельная жировая дистрофия печени мышей db/db через 2мес. после рождения; окраска Суданом III. Ув. 400. Г – гликоген в следовых количествах в гепатоцитах печени мышей db/db через 6мес. после рождения; окраска PAS – реакцией. Ув. 200. Д – мелко-крупнокапельная жировая дистрофия во всех слоях печени мышей db/db через 6мес. после рождения; окраска Суданом III. Ув. 400.

матрикса и умеренная пролиферация мезангиальных клеток (рис. 8 Б), местами гиалиновые массы были локализованы

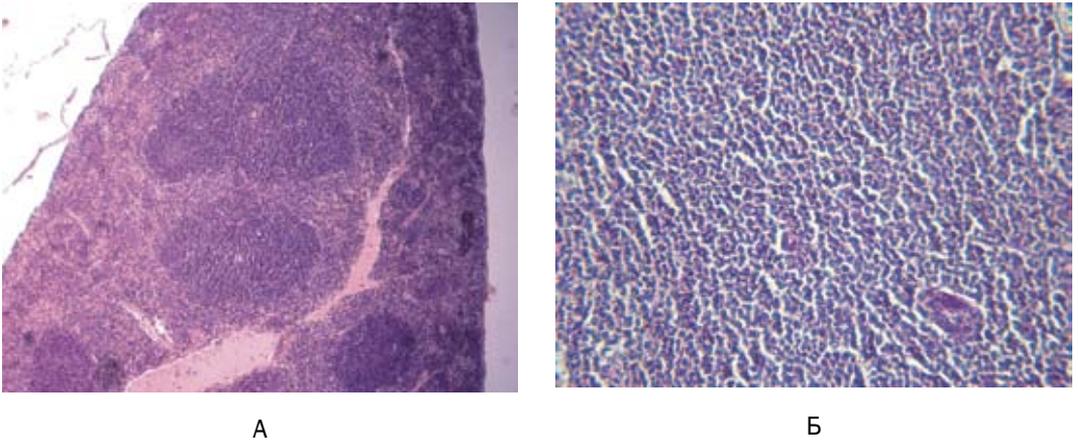


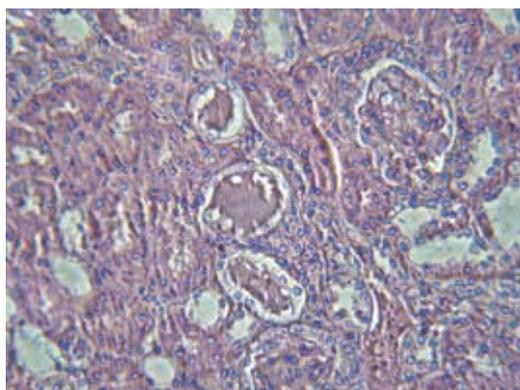
Рис. 7. Морфологические изменения в ткани селезенки мышей с СД 2 типа в возрасте 4 мес., окраска гематоксилином и эозином. А – ткань селезенки контрольной мыши. Ув. 100; Б – гипоплазия ткани селезенки у мышей db/db. Ув. 200.

в центре мезангия и были окружены капиллярными петлями. Гиалиновые массы в виде диффузных и узелковых отложений окрашивались в малиновый цвет (PAS-положительны).

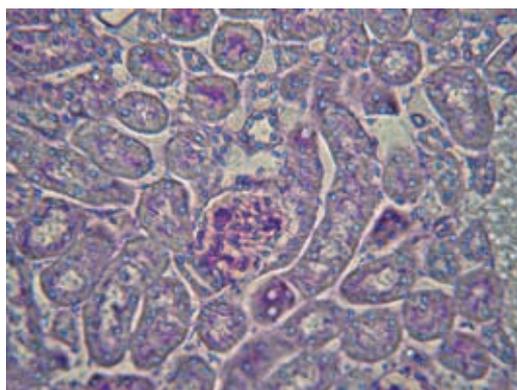
В части препаратов отмечался слабо выраженный интрагломерулярный и перигломерулярный склероз и спадение капиллярных петель. Эпителий дистальных и проксимальных канальцев местами был с явлениями атрофии, местами с признаками белковой и жировой дистрофии, просветы канальцев несколько расширены, заполнены гомогенными эозинофильными массами – (PAS-положительными), вероятнее всего сахаросодержащими веществами, такими как гликопротеины и гликолипиды; аналогичные включения наблюдались в просвете канальцев мозгового вещества почки (собираательные трубочки). Гистологические признаки белковой и жировой дистрофии подтверждают наличие умеренной протеинурии у мышей db/db, однако при окраске PAS-реакцией часть эозинофильных масс, а также содержимое канальцев

вблизи апикальных поверхностей эпителиальных канальцев окрасились в сиреневый цвет, что не исключает наличия в содержимом углеводов.

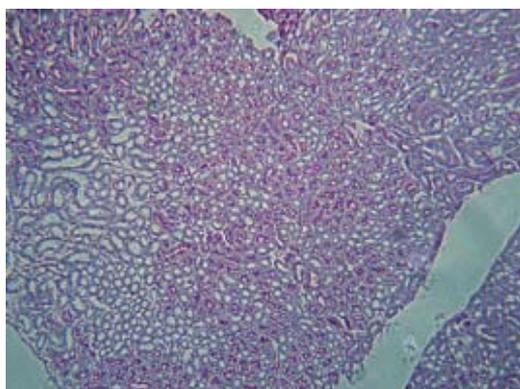
Таким образом, проведенное исследование показало, что генетическая модель СД на мутантных мышах линии В/Ks-Lep<sup>rd</sup>b/+ у db/db (гомозиготы) воспроизводит клинические, биохимические и морфологические нарушения в организме, характерные для СД 2 типа. У мышей db/db наблюдаются раннее и прогрессирующее повышение в крови содержания глюкозы и HbA<sub>1c</sub>, полифагия, полидипсия, полиурия и нарастающее ожирение. СД 2 типа проходит отчетливые стадии в своем развитии, которые характеризуются отчетливыми клиническими и морфологическими признаками. I стадия – ранняя (до 1-2 мес. после рождения); II – стадия развернутых клинических и морфологических изменений (3-4 мес. после рождения); III стадия – стадия декомпенсации функциональных систем (5-6 мес. после рождения). Морфологически в ПЖ развивается сначала



А



Б



В

Рис. 8. Морфологические изменения в ткани почки мыши с СД 2 типа в возрасте 4 месяцев после рождения. А – просветы канальцев заполнены гомогенными эозинофильными белковыми массами (указаны стрелками), окраска гематоксилин-эозином. Ув. 400. Б – клеточный клубочек, накопление в нем PAS-положительных субстанций (указан стрелкой). Ув.  $\times 400$ . В – PAS-положительные массы в просвете канальцев. Ув. 200.

гипертрофия, а затем постепенно атрофия островковой ткани, прогрессирующая жировая дистрофия печени, белковая дистрофия канальцев и ангиопатия в клубочковом аппарате почек. Прогрессирующая гипоплазия ткани селезенки и лимфатического узла свидетельствуют о развитии иммунной дисрегуляции в организме. Полученные результаты позволяют признать изученную нами генетическую модель СД адекватной моделью СД 2 типа, которая пригодна для поиска и оценки новых эффективных способов лечения этого заболевания в эксперименте. Это модель воспроизводит характерные признаки стадийности развития

СД 2 типа. На ранних сроках (1-2 мес.) развивается резистентность тканей к инсулину, которая компенсируется гипертрофией ОК. На сроке 3-4 мес. развивается стадия истинной инсулиновой недостаточности, как и при СД 1 типа. На сроке 5-6 мес. развивается терминальная стадия СД, которая приводит к глубокому нарушению метаболизма, кахексии и гибели животных.

## Выводы

Мутантные мыши линии C57BL/KsJYLeprdb/+ отвечают всем требованиям экспериментальной генетической модели СД 2 типа, т.к. воспроизводят стадийность течения заболевания и соответствующие патогенетические, функциональные и структурные изменения в организме. Развитие СД 2 типа у мышей

db/db проходит 3 стадии:

1-я стадия (на 1-2 месяце со дня рождения) – стадия инсулинорезистентности характеризуется гипергликемией, гипертрофией и гиперплазией островков Лангерганса в поджелудочной железе.

2-я стадия (на 3-4 месяце со дня рождения) – стадия выраженных изменений со стороны внутренних органов характеризуется снижением количества функционирующих  $\beta$ -клеток в островках Лангерганса, ожирением и недостаточностью иммунной системы (гипоплазия лимфоидной ткани).

3-я стадия (на 5-6 месяцах после рождения) – стадия необратимых изменений внутренних органов характеризуется развитием кахексии, которая заканчивается гибелью животного.

Полученная линия мышей C57BL/KsJYLeprdb/+ может быть использована в качестве адекватной модели СД 2 типа в эксперименте, включая отработку новых способов лечения и профилактики СД 2 типа, в том числе и методами клеточной терапии.

## Литература

1. Александров А.А. Сахарный диабет: болезнь «взрывающих бляшек» // *Consilium Medicum*, т. 6, № 10, с. 567-571, 2001.
2. Александровский Я.А. Сахарный диабет эксперименты и гипотезы. – М.: СИП РИА, 2005.
3. Балаболкин М.И. Молекулярные основы патогенеза сосудистых осложнений сахарного диабета // *Медицинская кафедра*, № 1(9), с.48-57, 2004.
4. Балаболкин М.И. Сахарный диабет. – М.: Медицина, 1994.
5. Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука, 1983.
6. Бокарев И.Н., Великов Б.К., Шубина О.И. Сахарный диабет. – М.: Медиц. Информ. Агентство.(М.И.А.), 2006.
7. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В. и др. Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. – М.–Воронеж: ИСТОКИ, 2004.
8. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет. Руководство для врачей. – М.: УНИВЕРСУМ ПАБЛИШИНГ, 2003.
9. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2004.
10. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. – М.: Техносфера, 2007.
11. Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В. и др. Мутантные мыши линии C57BL/KsLeprdb/+ как генетическая модель сахарного диабета 2-го типа // *Бюлл. exper. биол. и мед.*, № 12, с. 664-667, 2007.
12. Уильямз Г., Пикал Дж. Руководство по диабету. / Пер. с англ. – М.: Мед. пресс-информ, 2003.
13. Bierman E.L., Glomset J.A. Disorders of lipid metabolism // *Wilson J.D., Foster D.W. (eds.). Williams Textbook of Endocrinology*, ed. 7. – Philadelphia, W.B. Saunders Co., pp. 1108-1136, 1985.
14. Brown M.S., Goldstein J.L. Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias // *Gilman A.G., Rall T.W., Murad F. (eds.) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. 7. – New York, Macmillan Publishing Co, pp. 827-845, 1985.

15. Brown M.S., Goldstein J.L. How LDL receptor influence cholesterol and atherosclerosis // *Sci. Am.*, p. 251, 58, 1984.

16. Farguhar J.W., Olefsky J., Stern M. et al. Obesity, insulin and triglycerides // Bray G.A. (ed). *Obesity in Perspective*, vol. 2, Fogarty International Center Series on Preventive Medicine, Washington, DC, US Government Printing Office, part 2, p. 313, 1975.

17. 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*, 319 (3): 501-512, 2005.

18. Hammad S.M., Otvos J.D., Lyons T.J. Lipoprotein subclass profiles of hyperlipidemic diabetic mice measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Metabolism*, vol. 52, No 7, 916-921, 2003.

19. Kahn C.R., Baird K.L., Jarrett D.B., Flier J.S. Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 75, pp. 4209-4213, 1978.

### THE MUTANT MICE C57BL/KsJYLeprdb/+ AS THE GENETIC MODEL OF DIABETES 2 TYPE

**O.I.Stepanova, V.N.Karkischenko, O.V.Baranova, H.H.Semenov, T.B.Beskova,  
T.V.Galahova, N.A.Onischenko, N.V.Kasinskaya**

*Research Center of Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Scientific Research Center of Transplantology and Artificial organs name  
of Shumakov V.I., Moscow*

The genetic model of diabetes 2 type was investigated with clinic, biochemical and morphological methods of analysis. This model simulated all stages of the disease, and all pathogenetic, functional and structural changes in organism.

**Key words:** diabetes of 2 type, mice db/db, pancreas, carbohydrate metabolism.

## Моделирование дегенеративных изменений межпозвонковых дисков (остеохондроза) у кроликов: макроскопическое и гистологическое изучение

А.Б.Шехтер<sup>1</sup>, В.А.Басков<sup>2</sup>, О.Л.Захаркина<sup>3</sup>, А.Е.Гуллер<sup>1</sup>, И.А.Борщенко<sup>4</sup>, И.Ю.Колышев<sup>1</sup>, Г.Д.Капанадзе<sup>5</sup>, А.В.Басков<sup>2,4</sup>, Э.Н.Соболь<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова, Москва

<sup>2</sup>Кафедра нейрохирургии Российской медицинской академии последипломного образования, Москва

<sup>3</sup>Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк, Московская область

<sup>4</sup>Клиника Ортоспайн, Москва

<sup>5</sup>Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Целью работы является воспроизведение, а также детальное изучение пункционной модели остеохондроза позвоночника у кроликов при длительном динамическом наблюдении (до 40 недель). Установлено, что в пунктированных дисках формируются остеофиты, происходит деструкция гиалинового хряща замыкательной пластинки, а ткань пульпозного ядра некротизируется и постепенно замещается фиброзным хрящом. В дальнейшем развиваются вторичная дистрофия этой ткани и дезорганизация структуры внутреннего и среднего слоев фиброзного кольца, а также образуются щели между замыкательной пластинкой и фиброзным кольцом. В интактных межпозвонковых дисках, расположенных на ближайших анатомических уровнях с дисками, подвергавшимися экспериментальному воздействию, обнаруживаются умеренные дистрофические процессы в пульпозном ядре, вероятно, связанные с нестабильностью позвоночника. Выявленные изменения близки к дегенеративным изменениям межпозвонковых дисков при остеохондрозе позвоночника у человека, то есть представляют собой адекватную модель для оценки результатов и определения механизмов различных методов лечения данного заболевания, в том числе лазерной реконструкции межпозвонковых дисков.

**Ключевые слова:** модель остеохондроза, кролики, межпозвонковый диск, морфология.

Дегенерация межпозвонковых дисков (остеохондроз позвоночника) – это хронический процесс, сопровождающийся такими клиническими расстройствами, как боль в спине, ишиалгия, грыжа диска, стеноз позвоночного канала, миелопатия. Традиционный арсенал лечебных воздействий (и хирургических, и терапевтических) направлен, преимущественно, на ликвидацию острых симптомов болезни. И хотя исследования ме-

ханизмов возрастной и патологической дегенерации межпозвонковых дисков (МПД) и поиск подходов к лечению остеохондроза позвоночника ведутся весьма активно [7, 12], имеющаяся информация, остается неполной, поскольку число эффективных методов, обеспечивающих замедление процесса дегенерации или восстановление утраченных в результате патологических процессов хрящевых структур, до сих пор невелико.

Возможности получения биопсийного материала МПД человека ограничены по этическим и юридическим причинам. Поэтому для изучения механизмов и динамики остеохондроза позвоночника часто используют моделирование дегенеративных изменений МПД в экспериментах на животных [18]. В литературе представлен широкий спектр моделей дегенерации дисков, созданных у разных видов животных, и обладающих определенными преимуществами и недостатками [30]. Подробный обзор различных моделей с анализом морфогенетических, биохимических, биомеханических и других различий МПД животных и человека, а также адекватности моделированных изменений дегенеративным заболеваниям человека, представлен в работах [4, 19].

Большое место в литературе о моделях отведено созданию дегенеративных изменений дисков у кроликов [10, 13, 16, 23, 34]. В пользу проведения экспериментов на кроликах свидетельствует то, что исследованию тканей МПД этих животных посвящено значительное число публикаций [6, 8, 11, 14, 26, 29]. Анализ литературы позволяет сделать вывод о сходстве структуры МПД кроликов и человека, как в норме, так и при дегенерации.

Создание и изучение моделей у животных связано не только с фундаментальными аспектами исследования дегенерации МПД, но направлено на использование их для разработки новых методов лечения [15, 21, 22] и, в частности, малоинвазивных хирургических процедур.

В 1999 году нами был предложен новый подход к лечению дегенеративных заболеваний МПД, основанный на нераз-

рушающем термомеханическом воздействии модулированного лазерного излучения – лазерная реконструкция дисков (ЛРД) [2]. Процедура ЛРД представляет собой пункцию МПД, подведение лазерного излучения через иглу в область пульпозного ядра (ПЯ) и лазерное облучение данной области с целью создания условий для запуска репаративных процессов в ткани. Целенаправленное исследование разных режимов лазерного воздействия на интактные МПД кроликов позволило выявить такие режимы необляционного лазерного воздействия, которые индуцируют репаративные процессы: пролиферацию хондроцитов фиброзного кольца (ФК) и ПЯ, метаплазию внутренних слоев ФК и поврежденного ПЯ в переходный фиброгиалиновый или типичный гиалиновый хрящ [1, 32, 33]. Полученные результаты создали фундамент для разработки нового метода в малоинвазивной спинальной хирургии – лазерной реконструкции межпозвоночных дисков, успешно внедряемого в клиническую практику [3].

С целью оценки эффективности неповреждающего лазерного воздействия в отношении индукции регенерации в дегенеративно-измененных тканях МПД и дальнейшего развития метода ЛРД нами был проведен новый длительный комплексный эксперимент. Он состоял в воспроизведении модели дегенерации дисков у кроликов и последующем лечении индуцированной патологии методом ЛРД. В качестве модели была выбрана методика [20, 31], использующая минимальное и дозируемое хирургическое повреждение тканей МПД (неполнослойный прокол ФК), в результате которого развивается дегенерация, протекающая сходно с дегенерацией МПД у человека.

Данная модель является хорошо воспроизводимой и обеспечивает контролируемое прогрессирующее дегенеративное изменение МПД, что является важным при испытании лечебных средств, которые могут быть использованы уже на ранних стадиях остеохондроза позвоночника.

Для оценки дегенеративных изменений МПД в работах [20, 31] использовались рентгенография, магниторезонансная томография и гистологические исследования. Однако систематическое исследование макроскопических изменений и гистологическое изучение дисков в ходе развития индуцированной дегенерации не проводилось. Сопоставление данных макроскопических наблюдений с результатами микроскопии ранее также не было выполнено. Кроме того, максимальный срок наблюдения после индуцирующего дегенерацию экспериментального воздействия в большинстве исследований не превышал полугод. Отсутствовало изучение интактных дисков у экспериментальных животных, хотя на другой модели остеохондроза у кроликов (артродез) было показано [25] наличие мягких дегенеративных изменений в интактных дисках, ближайших по анатомической локализации к искусственно поврежденным дискам. Поэтому мы попытались восполнить указанные пробелы, выполнив сравнительный анализ результатов макроскопического и гистоморфологического исследований и увеличив срок послеоперационного наблюдения.

В настоящей работе мы приводим результаты первого этапа данного исследования. Этот этап включал в себя воспроизведение пункционной модели дегенерации МПД и сопоставление данных

тщательного макроскопического наблюдения, гистологического и гистохимического анализа изменений как интактных, так и дегенеративно-измененных дисков кроликов на протяжении 9-месячного эксперимента. Кроме того, изучались диски с повторным (через 5 недель после первого) проколом ФК с целью: 1) изучения изменений, которые могут возникнуть в результате повторной травмы диска, и 2) получения контрольных образцов для сравнения с облученными лазером дисками, которые пунктировались аналогичной иглой.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на 20 скелетно-зрелых физиологически здоровых кроликах породы Шиншилла весом 2,8-3,4 кг. Кролики были получены из филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. Животных содержали в виварии НЦБМТ в соответствии с зооигиеническим требованиям. Кормление осуществляли гранулированными комбикормами, поение – очищенной водой вволю. Перед постановкой эксперимента животные прошли карантин. Один кролик оставался контрольным, никаких манипуляций на нем не проводилось. На остальных кроликах эксперимент проводился в 2 этапа. На первом этапе в 4-х поясничных дисках каждого из 19-ти кроликов были инициированы дегенерационные изменения по методу, описанному в статье [31]. Операции проводились под общим наркозом (Zoletil 50, 10 мг/кг и Rometar, 2%, 0,2 мл/1 кг, внутримышечно) в соответствии с нормами GLP. После антибиотикопрофилактики (Цефазолин 1,0 внутримышечно) был произведен доступ к МПД L1-L6 позвонков. Операция выполнялась через

срединный лапаротомный разрез по белой линии живота. Производилась смещение внутренних органов вправо от средней линии. Выполнялось тупое рассечение париетальной брюшины, предпозвоночной фасции, при этом сохранялись все сосудистые образования, благодаря чему операция проходила практически бескровно. Тупым путем осуществлялось скелетирование передней поверхности поясничных позвонков и МПД. На уровне диска L2-L3 на поясничной мышце слева фиксировалась лавсановая метка, которая служила ориентиром при последующем вмешательстве. В вентральной или вентрально-латеральной области 4 поясничных МПД иглой для инъекций 18G со специальным ограничителем выполнялся неполнослойный прокол ФК на глубину 5 мм. Операция завершалась послойным ушиванием операционной раны узловыми швами. Длительность операции в среднем составляла 20 мин. Кровопотеря в среднем составляла 5-10 мл. В течение 5 дней после операции оперированным животным проводилась антибиотикопрофилактика (Cefazolin 1,0 внутримышечно).

На втором этапе через 5 недель после начала эксперимента 19-ти животным была выполнена повторная операция по вышеописанной схеме с использованием того же хирургического доступа (по предыдущему рубцу). Выполнялось разделение рубцов тупым методом, скелетировались позвонки и МПД. По наличию лавсановой метки и внешних изменений выбирали 4 ранее пунктированных диска для повторного воздействия. В вентральной или вентрально-латеральной области 3-х дисков выполнялся полнослойный прокол ФК в область ПЯ пункционной иглой 20G. В 2 диска через иглу вводи-

лось оптическое волокно, через которое было произведено лазерное облучение области ПЯ в различных неабляционных режимах. Один диск после второго прокола не облучался. Длительность операции в среднем составляла 30 мин., а кровопотеря – 5-10 мл. В течение 5 дней после операции проводилась антибиотикопрофилактика. Один кролик после повторной операции не вышел из наркоза.

Таким образом, в результате двух проведенных операций у каждого животного первый диск служил для изучения развития дегенерации, второй – для влияния дополнительного прокола на эти дегенеративные изменения, а два диска – для исследования эффективности лазерного воздействия на дегенеративно-измененные ткани МПД.

Животные выводились из эксперимента с помощью передозировки барбитурата (Pentobarbital sodium 1,2 г/кг). Животные опытной группы были забиты через 6 недель (4 кролика), 10 (3 кролика), 18 (4 кролика), 32 (4 кролика) и 40 (3 кролика) недель после начала эксперимента.

Фрагменты позвоночника (Th12-S1 позвонков) вырезали сразу после вскрытия и механически отделяли от мышечной ткани и связок. По местоположению лавсановой метки проводилась идентификация дисков, как интактных, так и дисков с одним или двумя проколами.

Всего для макроскопического и морфологического исследования было получено 120 межпозвоночных дисков. Из них 48 дисков были интактными, 18 дисков с моделированием дегенерации, 18 дисков с повторным проколом и 36 дисков, подвергнутых лазерному воздействию. Часть дисков была извлечена вместе с костными фрагментами при-

лежащих позвонков для приготовления в дальнейшем гистологических срезов, отражающих структуру дисков в сагиттальной плоскости. При выделении другой части дисков вырезку проводили параллельно видимым границам замыкательных пластин (ЗП) и тел позвонков; гистологические препараты для этой части биопсийного материала отражали структуру срезов дисков во фронтальной плоскости.

До погружения биоптатов в фиксирующий 10%-й раствор нейтрального формалина были проведены измерения высоты МПД в вентральной и обеих латеральных областях (по наружной поверхности дисков). При наличии остеофита измеряли его внешний диаметр. Кроме того, для дисков, вырезанных вдоль поверхностей ЗП, были измерены максимальный (продольный, между двумя крайними латеральными точками) и минимальный (поперечный, между крайними спинальной и вентральной точками) размеры диска в целом и ПЯ в отдельности, а также высота остеофита (при его наличии). Кроме того, выполнялось фотографирование дисков, их детальное визуальное изучение и систематическое описание, включавшее оценку по 18 наборам признаков.

После фиксации и декальцинации биоптатов изготавливали парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону для изучения коллагеновых волокон, а также толуидиновым синим для выявления протеогликанов. Препараты исследовали и фотографировали с использованием светового микроскопа OLYMPUS BX51, оснащенного цифровой видеокамерой Sanyo, при увеличении от 40х до 1000х.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен при помощи стандартного пакета статистических программ SPSS 13.0 for Windows и стандартной программы Microsoft Excel 2000. Описание и анализ морфометрических параметров и макроскопических признаков интактных и дегенеративно-измененных дисков проводились с использованием параметрических и непараметрических статистических тестов с учетом типов переменных и вида распределения их значений. Сравнение наблюдаемых частот проявлений номинальных признаков, а также выявление признаков, между которыми существует статистически значимая связь, проводили путем анализа таблиц сопряженности с использованием критерия Крамера (V) и точного критерия Фишера (F). Для оценки статистической значимости различий морфометрических признаков МПД применяли дисперсионный анализ ANOVA (при условии нормальности распределения значений исследуемых признаков), Н-тест Краскела-Уоллиса (KW) и U-тест Манна-Уитни (MW). Взаимосвязи количественных, а также порядковых и дихотомических признаков изучали с использованием корреляционного анализа (коэффициент корреляции Спирмэна, Rs). Во всех случаях использовали двусторонние критерии при 5%-м уровне значимости.

## Результаты

### *Макроскопическое исследование межпозвонковых дисков*

**Интактные диски.** Со стороны фронтальных поверхностей интактные МПД кроликов имеют специфическую анатомическую форму, в целом, при-

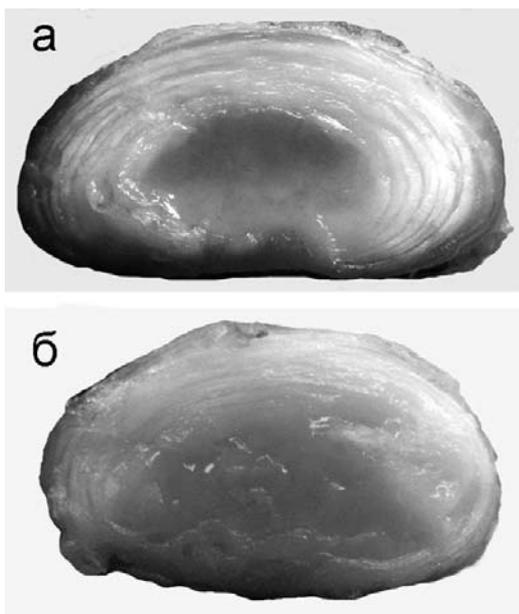


Рис. 1. Интактные диски; а - диск L7-S1; срок 6 недель. Отчетливо видны слоистое ФК и полупрозрачное ПЯ; б - диск L6-L7; срок 32 недели. Диффузное помутнение ПЯ.

ближенную к бобовидной, с выпуклой вентральной поверхностью и небольшим подковообразным изгибом, направленным к центру диска, на спинальном полюсе. В дисках, расположенных краинальнее (L1-L2, L2-L3), этот изгиб выражен сильнее, чем в дисках, находящихся в каудальной части поясничного отдела позвоночника (L5-L6, L6-L7, L7-S1). ПЯ интактных дисков обладает овальной или округлой формой и, как правило, расположено в центре диска.

Ткань ПЯ – желеобразная, на ощупь мягкоупругая. В дисках контрольного кролика и более чем в половине дисков опытных животных она полупрозрачная (рис. 1а), однако, в других интактных дисках наблюдается очаговое или диффузное помутнение ткани ПЯ различной степени. В дисках каудальной части поясничного отдела помутнение и уплотне-

ние ткани обнаруживается чаще. Данное наблюдение подтверждается обнаруженной положительной корреляцией между признаками «Анатомическая позиция МПД» и «Выраженность диффузного помутнения ткани ПЯ» ( $R_s=0,7$ ;  $p = 0,016$ ;  $N= 47$ ) (рис. 1б).

Граница ФК и ПЯ во всех интактных дисках выделяется отчетливо, благодаря различиям в цвете и консистенции ткани. Ткань ФК – молочно-белая, блестящая, с различной волокнистостью, плотная. Толщина ФК в интактных дисках относительно равномерная, иногда (в задних поясничных дисках) отмечается утолщение ФК в боковых порциях.

Высота интактных МПД, измеренная по средней линии вентральной поверхности, изменялась от 3,5 (для дисков L1L2) до 6,5 мм (для дисков L7S1) и составляла, в среднем,  $4,7\pm 0,9$  мм. В боковых порциях дисков она была несколько меньше ( $3,8\pm 0,5$  мм), минимальные значения этого показателя отмечались в верхних дисках поясничного отдела позвоночника (2,6 мм в L1L2), а максимальные – в нижних дисках (4,8 мм в L7S1).

Расстояние между двумя крайними латеральными точками МПД (максимальный диаметр) было, в среднем, равно  $11,3\pm 2,1$  мм. Минимальный диаметр (расстояние между крайней спинальной и крайней вентральной точками диска) –  $6,6\pm 1,1$  мм. Значения обоих указанных параметров были наибольшими для дисков каудальной части поясничного отдела (в L7S1 максимальный диаметр до 15,5 мм и минимальный диаметр до 8,0 мм) и наименьшими – для верхних поясничных дисков (в L1L2 максимальный диаметр до 9,0 мм и минимальный диаметр до 5,0 мм).

Максимальный и минимальный диа-

Таблица 1

**Динамика морфометрических параметров интактных МПД кроликов за время эксперимента**

Этап эксперимента	Показатель	Н1, мм	Н2, мм	Дмакс, мм	Дмин, мм	ПЯ макс, мм	ПЯ мин, мм
Начальный (до 6 недель)	Среднее±Ст. откл.	4,7±0,9	3,8±0,5	11,3±2,1	6,5±0,9	6,6±1,0	3,8±0,6
	N	19	19	9	9	9	9
Промежуточный (10-18 недель)	Среднее±Ст. откл.	4,2±0,5	3,7±0,4	10,3±1,7	6,0±0,6	7,5±0,7	3,5±0,1
	N	10	10	5	5	2	2
Заключительный (32 –40 недель)	Среднее±Ст. откл.	4,1±0,6	3,6±1,0	12,7±1,0	6,6±0,4	7,7±1,0	3,5±0,6
	N	14	14	4	4	4	4
Всего	Среднее±Ст. откл.	4,4±0,7	3,7±0,7	11,3±1,9	6,4±0,8	7,0±1,1	3,6±0,5
	P1 (тест KW)	0,10	0,45	0,16	0,11	0,28	0,49
	Rs	-0,325*	-0,192	0,214	-0,008	0,417	-0,307
	P2 (Rs)	0,033	0,217	0,393	0,975	0,122	0,265
	N	43	43	18	18	15	15

Н1 – высота диска, измеренная по средней линии вентральной поверхности;  
 Н2 – средняя высота диска, измеренная по боковым поверхностям;  
 Дмакс – максимальный диаметр диска; Дмин – минимальный диаметр диска; ПЯмакс – максимальный диаметр пульпозного ядра; ПЯмин – минимальный диаметр пульпозного ядра;  
 P1 – статистическая значимость различий между группами по данным теста KW;  
 P2 – статистическая значимость коэффициента корреляции Rs;  
 Rs – коэффициент корреляции Спирмена между морфометрическими признаками и этапом эксперимента.

метры ПЯ заметно варьировали даже у дисков, располагавшихся на одном и том же анатомическом уровне у разных животных (различия до 1-1,5 мм). В среднем, максимальный и минимальный диаметры ПЯ составляли примерно 59±8% от соответствующих диаметров интактных МПД.

В целом, отмечалось увеличение размеров дисков, располагающихся на различных анатомических уровнях, в

направлении от краниального к каудальному концам поясничного отдела позвоночника. Однако статистически значимые различия между дисками по перечисленным морфометрическим признакам отсутствовали. Вместе с тем, в интактных дисках все описанные морфометрические признаки статистически значимо коррелировали между собой (т.е. изменение геометрии диска по какой-либо оси сопровождалось измене-

нием по другим осям).

За время эксперимента (9 мес.) в интактных дисках наблюдался ряд изменений макроскопических признаков и морфометрических параметров (табл. 1), которые можно интерпретировать как проявление естественных процессов (старение), а также результат спонтанной дегенерации, обусловленной механической нестабильностью позвоночника, возникшей после экспериментального повреждения других МПД поясничного отдела при создании модели (см. Обсуждение результатов).

Высота интактных дисков, измеренная по средней линии их вентральной поверхности, за все время эксперимента уменьшалась. Об этом свидетельствует слабая статистически значимая отрицательная корреляция между значениями данного морфометрического признака и сроком наблюдения ( $R_s = -0,348$ ;  $p = 0,016$ ;  $N = 47$ ). Кроме того, по данным U-теста Манна-Уитни, этот показатель статистически значимо снижается к концу периода наблюдения (не ранее 32-й недели), по сравнению с начальным этапом эксперимента ( $MW, p = 0,037$ ;  $N = 33$ ). Статистически значимых изменений высоты МПД в латеральных порциях, максимальных и минимальных диаметров интактных дисков и ПЯ за время эксперимента не наблюдалось. Эти факты свидетельствуют о действии на вентральные отделы интактных МПД сжимающей нагрузки, направленной вдоль оси позвоночника и возникающей, вероятно, как вторичный эффект пункционной модели дегенерации дисков.

По мере увеличения срока наблюдения, в интактных дисках увеличивалась частота встречаемости диффузного помутнения ПЯ ( $R_s = 0,630$ ;  $p = 0,004$ ;  $N =$

19), а также выраженность диффузного помутнения ( $R_s = 0,651$ ;  $p = 0,003$   $N = 19$ ).

Начальные признаки формирования остеофитов отмечались в 4 из 48 интактных дисков (на 18-й и 32-й неделях эксперимента). В одном из интактных дисков на 40-й неделе эксперимента был обнаружен сформированный остеофит. Все остеофиты локализовались на вентролатеральных поверхностях МПД. Образование остеофитов происходило вне связи с каким-либо конкретным анатомическим уровнем, а также не было различий между «верхними» и «нижними» дисками по частоте развития остеофитов.

Форма ПЯ и толщина ФК интактных дисков изменялись незначительно. Граница между ФК и ПЯ была хорошо различима в течение всего периода наблюдения.

**Пункционная модель дегенерации МПД.** Макроскопически было изучено 18 дисков, подвергавшихся однократному неполнослойному проколу, из них 6 дисков – вырезанных вдоль поверхностей ЗП (с обнажением фронтальных поверхностей) и 12 дисков, вырезанных вместе с прилежащими фрагментами тел позвонков.

Морфометрическое исследование не выявило статистически значимых различий высот и диаметров дисков, а также диаметров ПЯ между модельными и интактными дисками. Однако, в отличие от интактных МПД, высота и другие морфометрические параметры дисков, подвергшихся проколу, статистически значимо не изменялась за весь период наблюдения. Нельзя исключить, что стабилизация морфометрических параметров обусловлена изменением механических характеристик пунктированных дисков.

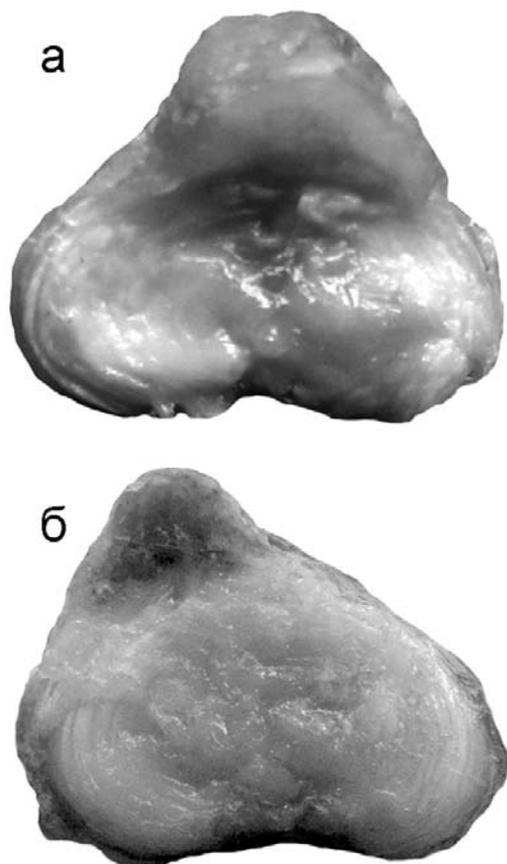


Рис. 2. Дегенеративно-измененные диски; а - диск L4-L5, срок 6 недель; вверху крупный хрящевой остеофит; диффузно-очаговое помутнение ПЯ; участки гомогенизации ФК; б - диск L3-L4, срок 32 недели; вверху костнохрящевой остеофит; резко выраженное помутнение ПЯ и отсутствие четкой границы между ФК и ПЯ.

Диски, подвергавшиеся однократному проколу, резко отличались от интактных по своим макроскопическим признакам на всех этапах эксперимента (табл. 2). Уже к 6-й неделе после операции в половине пунктированных дисков отмечались начальные признаки образования остеофитов, а, начиная с 12-й недели эксперимента, у большинства из них обнаруживались сформированные

остеофиты. Они возникали в зоне прокола ФК на вентральной или левой вентролатеральной стороне диска. На ранних сроках (6-10 недель) остеофиты состояли преимущественно из хрящевой ткани, позже они, как правило, были костнохрящевыми (рис. 2а, б).

Наибольшие изменения в дегенеративно-измененных дисках, по сравнению с интактными, претерпевает ткань ПЯ. В ранние сроки наблюдения на фоне всегда выраженного диффузного помутнения ткани ПЯ имеются локальные уплотнения молочно-белого цвета. В дальнейшем область ПЯ замещается рыхлой молочно-белой непрозрачной тканью, по цвету почти неотличимой от ФК (рис. 2а, б). На сроке 40 недель ФК и ПЯ практически не различаются по структуре, цвету и консистенции. В ткани ПЯ наблюдаются также дефекты: полости и трещины.

Граница между ФК и ПЯ становилась нечеткой, определялась только за счет разницы в консистенции тканей (с 6-й по 10-ю недели эксперимента), а затем практически полностью исчезала (начиная с 18-й недели наблюдений). Выраженность границы ФК и ПЯ отрицательно статистически значимо коррелировала со сроком эксперимента ( $R_s = -0,840$ ,  $p = 0,036$ ;  $N = 6$ ). В двух дисках в зоне контакта ФК и ПЯ были обнаружены отдельные небольшие (0,5 мм) каменно-плотные зерна, вероятно, кальцинаты. В некоторых дисках на отдельных участках границы ФК и ПЯ определялась борозда.

В ФК происходило выраженное увеличение толщины внутреннего слоя, который приобретал молочно-белый цвет и сходную с тканью ПЯ консистенцию. Волокнистость ФК сохранялась только в его наружной трети. На спинальном

Таблица 2

## Сравнение макроскопических признаков дегенеративно-измененных и интактных дисков

Признак	Субкатегории признака	Контроль, % от числа наблюдений	Модель, % от числа наблюдений	Результаты статистического анализа
Формирование остеофитов	Нет признаков	89,6	5,9	V, $p < 0,001$ ; N=65; Rs=0,810, $p < 0,001$ ; N=65
	Начальные признаки	8,3	35,3	
	Сформированный	2,1	58,8	
Частота встречаемости диффузного помутнения в ПЯ		47,4	100	F, $p = 0,051$ ; N= 25; V, $p = 0,022$ ; N=25; Rs=0,459; $p = 0,021$ ; N=25
Выраженность диффузного помутнения в ПЯ	Отсутствует	21,1	0	V, $p = 0,003$ ; N= 25; Rs=0,650; $p < 0,001$ ; N=25
	Слабое	36,8	0	
	Умеренное	26,3	0	
	Выраженное	15,8	100	
Выраженность границы ФК и ПЯ	Граница почти не различима	0	66,7	V, $p < 0,001$ ; N= 25; Rs= - 0,786; $p < 0,001$ ; N=25
	Различима	21,1	33,3	
	Четко выражена	78,9	0	
Плотность ткани ПЯ	Однородная	89,5	50,0	F, $p = 0,070$ ; N= 25; V, $p = 0,035$ ; N=25; Rs=0,421; $p = 0,036$ ; N=25
	Неоднородная	10,5	50,0	
Очаговое истончение ФК	Отсутствует	89,5	33,3	F, $p = 0,015$ ; N= 25; V, $p = 0,005$ ; N=25; Rs=0,561; $p = 0,004$ ; N=25
	Имеется	10,5	66,7	
«Гомогенизация» ФК в спинальной области диска	Отсутствует	84,2	33,3	F, $p = 0,032$ ; N=25; V, $p = 0,016$ ; N=25; Rs=0,484; $p = 0,014$ ; N=25
	Имеется	15,8	66,7	

полусе ткань ФК в наибольшей степени становилась визуально гомогенной. В крайней спинальной точке некоторых дисков обнаруживалось резко выраженное истончение ФК.

Статистически значимые различия по частоте встречаемости и выраженности ряда макроскопических признаков между дегенеративно-измененными МПД, подвергавшимися однократному неполнослойному проколу и интактных дисков, представлены в табл. 2.

**Дегенеративно-измененные диски, подвергавшиеся двум последовательным проколам.** При сравнении МПД, подвергавшихся однократному неполнослойному проколу (модель дегенерации), с дисками, где был произведен вторичный (полнослойный) прокол, было обнаружено принципиальное сходство наблюдаемых макроскопических изменений. Статистически значимых различий по частоте встречаемости и выраженности каких-либо отдельных макроскопи-

ческих изменений, а также по значениям морфометрических параметров дисков между указанными двумя подгруппами также не выявлено.

***Гистологическое и гистохимическое изучение интактных и дегенеративно-измененных межпозвоноковых дисков***

Были изучены 8 МПД из поясничного отдела позвоночника (включая диски, пограничные с грудным и крестцовым отделами) одного контрольного животного, а также 40 интактных дисков, которые не подвергались никаким воздействиям, от 18 опытных животных. Кроме того, изучались 18 дисков с моделированием дегенерации и 18 дисков, которые вторично пунктировались через 5 недель после первой пункции. Так как статистически значимых различий между двумя последними группами дисков по 18 макроскопическим и 36 микроскопическим показателям не было обнаружено ни макро-, ни микроскопически, то мы приводим их общее описание.

**Интактные диски.** На сагиттальных гистологических срезах МПД состоит из ФК, ПЯ, занимающего центральную область диска, и ЗП, отделяющих ФК от костной ткани позвонков. ЗП в свою очередь состоит из наружного слоя гиалинового хряща и внутреннего слоя костной ткани, которая чаще непосредственно граничит с наружными пластинами ФК, реже отделена от них очень тонким слоем (2-3 ряда клеток) гиалинового хряща. Этот слой обнаруживается не во всех дисках и только в его средней части. Такая слоистая структура ЗП, характерная для кроликов, отличает ее от ЗП человека, состоящей только из гиалинового хряща.

Хрящевой слой ЗП образован типичными для гиалинового хряща хондроци-

тами, окруженными широкой лакуной (рис. 3а). Клетки образуют колонки. Межклеточный матрикс гомогенный, базофильный при окраске гематоксилином и эозином. При окраске толуидиновым синим матрикс хряща ярко метакроматичен, что указывает на высокое содержание протеогликанов (агреканов). Костный слой ЗП имеет структуру, идентичную костной ткани позвонков: губчатая кость с широкими трабекулами, формирующими полости, заполненные костным мозгом.

Диск на сагиттальных срезах вытянут в вентрально-спинальном направлении, имеет форму песочных часов, так как ЗП на его середине несколько вдавливается в диск. ФК образовано фиброзным (волокнистым) хрящом и состоит из плотно прилегающих друг к другу пластин (ламелл). Ламеллы имеют циркулярную структуру, окружая со всех сторон ПЯ. При этом на спинальном полюсе ламеллы образуют крутой остроугольный изгиб, а на вентральном изгибаются плавно (U-образно). На каудальной стороне диска структуры ФК истончаются, и ткань ядра часто контактирует с костным слоем ЗП, либо с внутренними тонкими прослойками гиалинового хряща. ПЯ на сагиттальных срезах имеет удлиненную овальную форму или форму песочных часов. На фронтальных (т. е. перпендикулярных оси позвоночника) срезах весь диск и ПЯ в его центре имеют слабо вытянутую форму овала.

Ламеллы ФК образованы коллагеновыми волокнами приблизительно одинаковой толщины, которые ориентированы в соседних ламеллах под углом друг к другу. Наиболее плотно волокна в ламеллах и сами ламеллы упакованы в наружном слое ФК. Клетки там представлены,

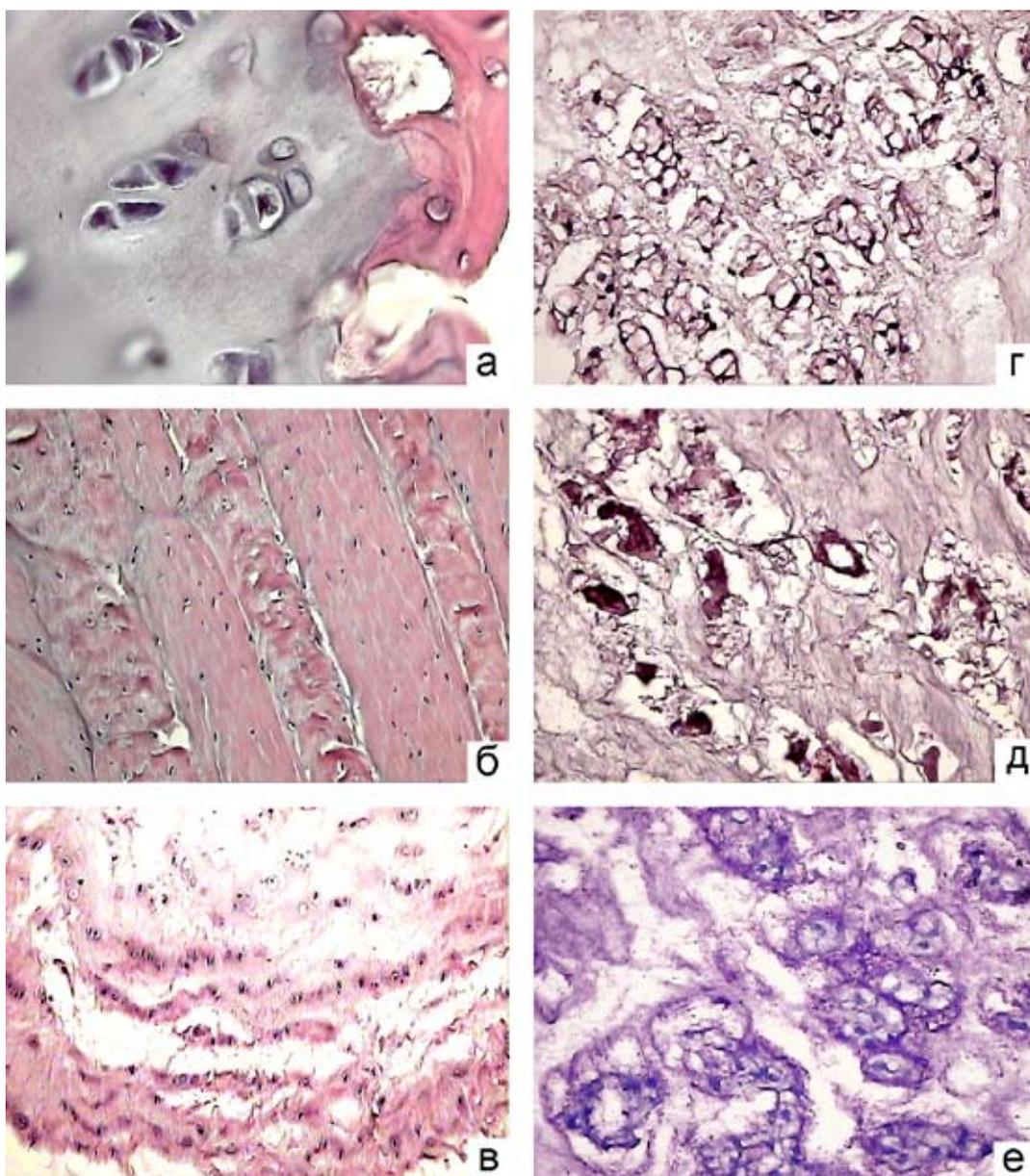


Рис. 3. Нативные структуры МПД в интактных дисках.

а - диск L1-L2, срок 6 недель. Замыкательная пластинка. Справа - костная ткань тела позвонка, слева - гиалиновый хрящ ЗП. Ув. 1000. б - диск L7-S1, срок 6 недель. Наружный слой ФК. Видны ламеллы, прочно прилежащие друг к другу, между коллагеновыми волокнами - хондроциты. Ув. 200. в - диск L7-S1, срок 6 недель. Внизу - внутренний слой,верху - переходной слой ФК. Ув. 200. г - диск L7-S1, срок 6 недель. ПЯ с рыхлым матриксом, кластерами нотохордальных клеток. Ув. 200. д - диск L7-S1, срок 6 недель. ПЯ с уплотненным матриксом, кластеры хондроцитоподобных клеток. Ув. 400. е - диск L7-S1, срок 6 недель. Накопление протеогликанов вокруг одиночных клеток и кластеров ХПК в ПЯ. Ув. 400. а-д - окраска гематоксилином и эозином; е - окраска толуидиновым синим.

в основном, фибробластоподобными, вытянутыми элементами, чаще всего без лакун. В среднем слое клетки имеют овальные ядра, слабо вытянутую цитоплазму, но, часто и округлые ядра с четкими лакунами (рис. 3б).

Внутренний слой ФК представлен более рыхлой тканью, а ламеллярная структура выражена менее четко. Клеточные элементы внутреннего слоя ФК имеют округлые или овальные ядра, часто четкую лауну. Тонкий переходный слой, расположенный на границе ФК и ПЯ, содержит небольшое количество клеточных элементов и рыхлый матрикс (рис. 3в). При окраске по Ван-Гизону коллагеновые волокна наружного и среднего слоя ФК ярко фуксинофильны, а во внутреннем и переходном слое они окрашиваются слабее, особенно в рыхлых участках. Содержание протеогликанов во всех слоях высокое.

ПЯ состоит из очень рыхлого богатого протеогликанами матрикса, образованного двумя компонентами – тонкофибриллярным и тонкогранулярным. Преобладает тонкофибриллярный компонент, который окрашивается по Ван-Гизону в розовый цвет. В матриксе неравномерно распределены многоклеточные кластеры (рис. 3г), содержащие от 3 до 20 клеток. Они состоят из нотохордальных клеток (НХК), имеющих округлое плотное ядро и светлую, сильно вакуолизированную цитоплазму. Среди этих клеток (особенно в спинальной части ПЯ) имеется от 10 до 20% так называемых хондроцитоподобных клеток (ХПК). У этих клеток цитоплазма плотная, эозинофильная, ядра мелкие, округлые. ХПК в основном расположены отдельно, но местами формируют небольшие кластеры (рис. 3д). Матрикс в участках скопления ХПК богаче

тонковолокнистыми структурами и протеогликанами, он плотнее, чем в зонах, содержащих кластеры НХК (рис. 3е).

Такая нативная структура имела в подавляющем числе изученных дисков контрольного кролика и интактных дисков опытных кроликов через 5 недель после начала опыта. Однако в диске L7-S1 у контрольного животного и в таком же диске у одного из опытных животных во внутренней трети ФК отмечаются дистрофические изменения, проявляющиеся в кариорексисе и кариолизе части ядер, наличии пустых лакун, разрыхлении матрикса. В ПЯ часть ядер в кластерах НХК имеет признаки кариопикноза и кариолиза, видны также относительно крупные бесклеточные участки матрикса (рис. 4а). При окраске толуидиновым синим в рыхлой ткани внутреннего слоя ФК метакромазия матрикса ослабевает и остается интенсивной в основном вокруг клеток. В ПЯ метакроматическая субстанция матрикса более интенсивно окрашивается вокруг кластеров НХК. Особенно большое содержание протеогликанов обнаруживается вокруг кластеров и одиночных ХПК. Там они иногда формируют слоистые ободки (чехлы).

Через 10 недель после начала эксперимента в интактных дисках у опытных животных структура ЗП, наружного и среднего слоев ФК не меняется. Внутренний слой ФК и ПЯ у большинства животных также остаются неизменными. Только в диске L5-L6 одного из животных во внутреннем и промежуточном слоях ФК, в также в ПЯ часть клеток имеет признаки дистрофии, а другая часть – крупное ядро и цитоплазму, занимающую практически всю лауну (рис. 4б). Вокруг последних клеток отмечается пояс отложения протеогликанов (яркая

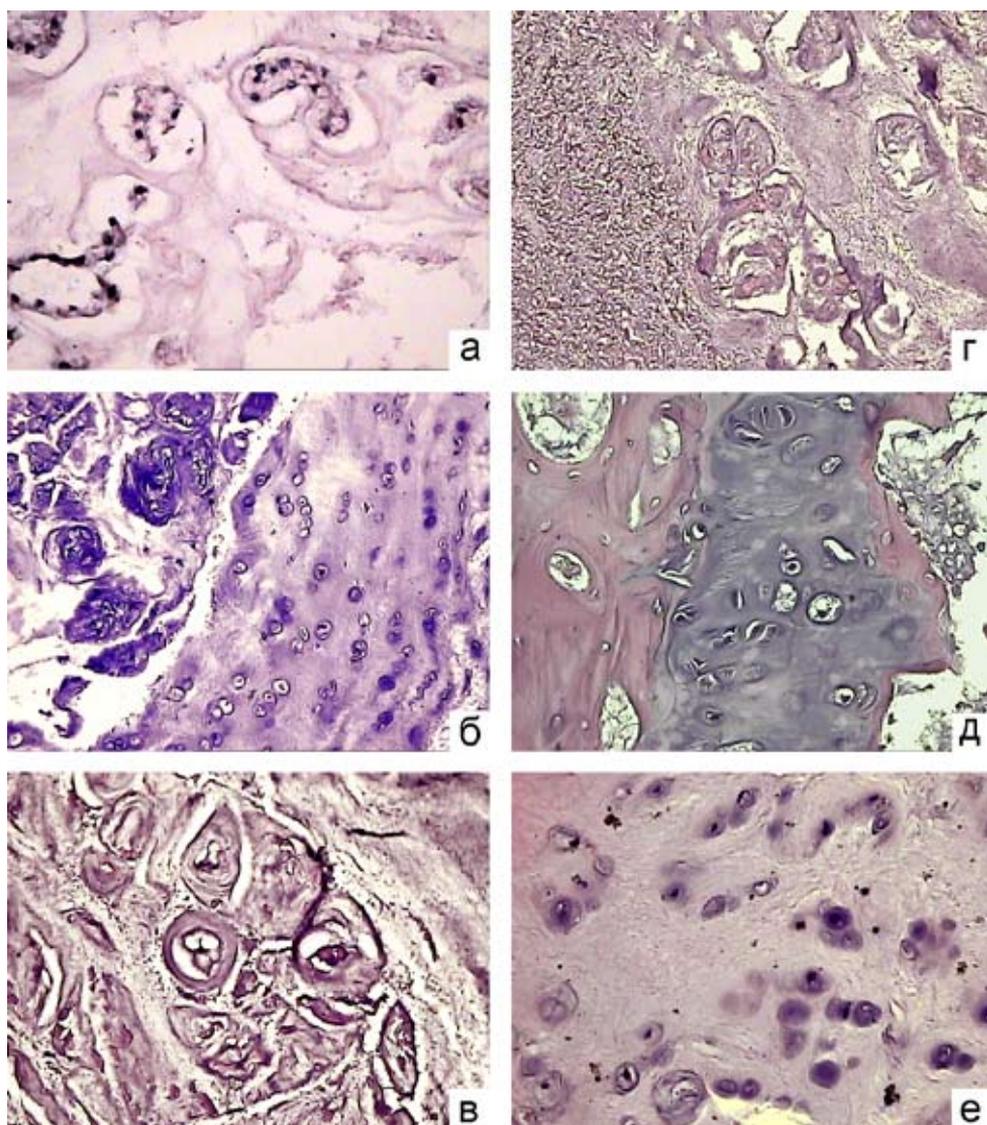


Рис. 4. Гистологические изменения интактных дисков.

а - диск L7-S1 контрольного кролика. Участок ПЯ с дистрофически измененными НХК. Ув. 400. б - диск L5-L6, срок 10 недель. Во внутреннем и промежуточном слоях ФК часть клеток в состоянии дистрофии, часть - пролиферирующие активные хондроциты. В ПЯ большие кластеры дистрофически измененных НХК, внутри и вокруг них протеогликаны. Ув. 200. в - диск L1-L2, срок 18 недель. Участок ПЯ с уплотненным матриксом («чехлы») вокруг клеточных кластеров и отдельных ХПК. Между кластерами зернистый распад матрикса. Ув. 400. г - диск L6-L7, срок 32 недели. ПЯ с уплотненным матриксом вокруг кластеров и дистрофией клеток в них. Слева - поля зернистого распада матрикса и некроз клеток. Ув. 200. д - диск L1-L2, срок 40 недель. Гиалиновый слой ЗП, участки некроза, оссификации и фибриллизации матрикса, видны также реактивные хондробласты. Ув. 400. е - диск L1-L2, срок 40 недель. Участок измененной структуры во внутреннем и переходном слоях ФК. Преобладают крупные активные хондроциты, но слева видны дистрофически измененные клетки. Ув. 400. а, в-г - окраска гематоксилином и и эозином; б - окраска толуидиновым синим.

метахромазия). Это признаки биосинтетической активности хондроцитов в ответ на дистрофию и некроз части клеток. В ПЯ увеличивается также доля ХПК.

Через 18 недель в интактных дисках прогрессируют дегенеративные изменения. У трех животных из четырех в большей или меньшей степени выявляются эти изменения, причем не только в задних, но и в передних дисках. В хрящевом слое ЗП обнаруживаются небольшие участки истончения, дистрофии и некроза клеток, кальциноза и оссификации хряща. Большую часть ПЯ занимают ХПК, между которыми видны маленькие кластеры НХК. На вентральном полюсе ПЯ матрикс рыхловолокнистый, но значительно более плотный, чем в интактном ПЯ ранних сроков. На противоположном полюсе видны участки, где кластеры НХК окружены ободком из плотной метахроматичной субстанции (рис. 4в). Видны также крупные поля бесклеточного матрикса. Кроме того, редко встречаются небольшие фокusy зернистого распада ткани. Клетки при этом подвергаются дистрофии, либо частично исчезают. И только в центре ядра сохраняются участки, где видны кластеры НХК, отдельные клетки ХПК, а матрикс такой же рыхлый, как в норме. В ряде дисков во внутреннем и промежуточном слоях ФК наряду с участками дистрофии увеличивается содержание активных хондроцитов с тонким ободком из протеогликанов.

Через 32 недели после начала опыта дегенеративные изменения еще больше усиливаются. В хрящевом слое ЗП увеличивается число и размеры участков кальциноза, оссификации, деструкции ткани, дистрофии и некроза хондроцитов. В одном диске у одного животного

в ПЯ видны крупные поля деструкции клеток и матрикса с образованием зернистой вакуолизированной массы (рис. 4г). В других дисках грубые некротические изменения отсутствуют, ПЯ сохраняет кластерную структуру, НХК во все большей степени замещаются ХПК, матрикс уплотняется, особенно вокруг клеток и кластеров. Во внутреннем слое ФК продолжается процесс дистрофии хондроцитов.

Через 40 недель интенсивность дегенеративных процессов уже мало увеличивается, но они захватывают большую часть интактных дисков у всех животных, хотя в задних дисках эти изменения выражены несколько сильнее, чем в передних. Хрящевой слой ЗП несколько истончен (больше с краниальной стороны), имеет участки оссификации, дистрофии клеток и фибриллизации матрикса (рис. 4д), т.е. обнажения его коллагеновых структур вследствие очагового распада протеогликанов. ПЯ в двух дисках имеет крупные участки зернистого распада матрикса с некрозом клеток: в основном ХПК, не образующих кластеров. Такие участки занимают часть ПЯ, а другая часть сохраняет кластерную структуру. Матрикс сгущен вокруг кластеров, а внутри кластеров имеются дистрофические изменения клеток. В других дисках такая деструкция отсутствует, но имеются участки с уплотненным, богатым протеогликанами матриксом. Общее количество как НХК, так и ХПК значительно уменьшено, оставшиеся кластеры сдавлены матриксом, большая часть клеток в них имеет дистрофические и некротические изменения.

Во внутреннем и переходном слоях ФК обнаруживаются такие же изменения, как и в предыдущем сроке. В одном

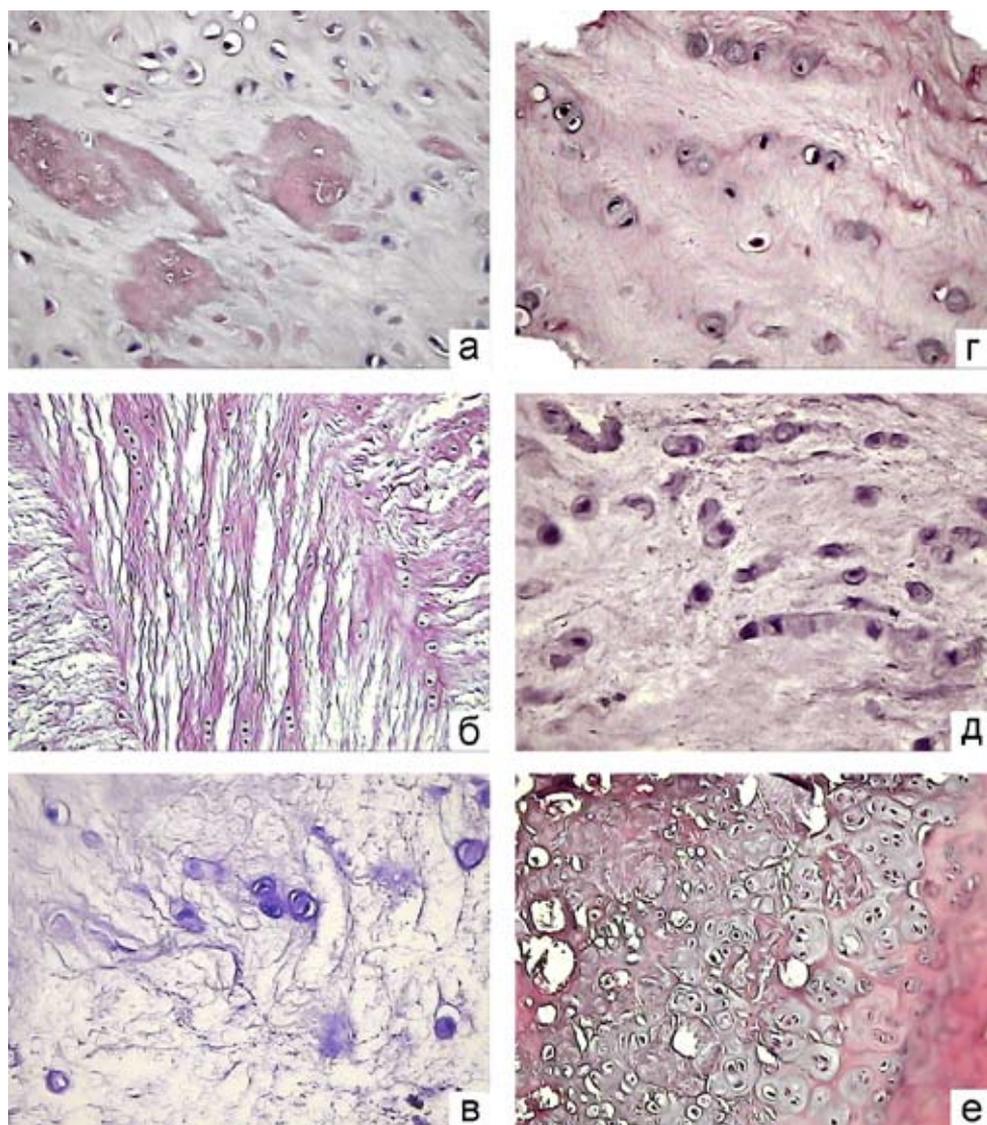


Рис. 5. Дегенеративно-измененные диски (модель) через 6 недель после начала опыта  
а – диск L5-L6 (один прокол). Остеофит. Среди хрящевой ткани гиалинового и фиброзного типов видны провизорные остеоидные балки. Ув.400. б – диск L5-L6 (один прокол). Средний слой ФК, разрыхление коллагенового каркаса в пластинах, округлые и овальные хондроциты разных размеров. Ув. 200. в – диск L5-L6 (один прокол). Рыхлая ткань внутреннего слоя ФК с сетчото-ячеестым строением. Часть клеток с дистрофическими изменениями. Видны также крупные активные клетки с метахромазией цитоплазмы и окружающего матрикса. В матриксе метахромазия снижена. Ув. 400. г – диск L5-L6 (один прокол). Фрагмент ПЯ с началом перехода в фиброзный хрящ. Ув. 400. д – диск L3-L4 (один прокол). Трансформация ткани ПЯ в фиброзный хрящ. Видны многочисленные активированные хондроциты и небольшие изогенные группы. Матрикс тонковолокнистый. Ув. 200. е – диск L1-L2 (один прокол). Утолщение и дезорганизация хрящевого слоя ЗП, многочисленные изогенные группы, перемешивание хрящевой ткани и костных трабекул, кальциноз и оссификация хряща. Ув.200. а, б, г-е – окраска гематоксилином и эозином; в – окраска толуидиновым синим.

диске в этих слоях имеются участки ткани, близкой по структуре к фиброзному хрящу (рис. 4е): матрикс тонковолокнистый, клетки в основном активные, хондроциты с толстыми «чехлами» вокруг. Однако в участках, граничащих с ПЯ, много клеток в состоянии дистрофии и некроза.

**Модель дегенерации межпозвоночных дисков.** Через 6 недель после начала опыта во всех дисках с одним или двумя проколами на наружной поверхности в местах прокола иглой обнаруживаются остеоциты разных размеров, состоящие на этот срок в основном из хрящевой ткани. Костная ткань представлена в виде отдельных сравнительно небольших балок внутри хряща (рис. 5а). Большую же часть ткани занимает хрящевая ткань, местами гиалинового, местами фиброзного типов. При окраске толуидиновым синим матрикс этой ткани резко метакроматичен, а при окраске по Ван-Гизону умеренно фуксинофилен. Непосредственно под остеоцитами часто видны крупные области некроза в наружной части ФК (результат первоначального прокола).

В большинстве дисков, за исключением области прокола, наружный слой ФК практически не изменен, но в среднем слое ФК в отличие от интактных дисков часто встречаются крупные поля в вентральной части диска, где ткань резко разрыхлена и практически не прослеживается циркулярная структура ламелл. Ламеллы резко истончены, разрыхлены, вплоть до формирования тонких и беспорядочно ориентированных волокон (рис. 5б). Реже аналогичные по структуре участки, но меньших размеров, имеются в среднем слое ФК и на спинальном полюсе диска. В основном, однако, в

среднем слое ФК ламеллярная структура и клеточные элементы сохранены.

Внутренний слой ФК и ПЯ у разных животных изменены в разной степени. В четырех дисках из восьми на этот срок ПЯ еще сохраняет свою структуру, хотя и претерпевает изменения, более выраженные, чем в интактных дисках даже на поздних сроках. Внутренний слой ФК в этих дисках отличается очень рыхлой структурой матрикса, местами сетчатоячеистой. Большая часть клеток находится в состоянии дистрофии или некроза. При окраске толуидиновым синим (рис. 5в) в этой очень рыхлой ткани резко снижается метакромазия матрикса. Она остается лишь в цитоплазме отдельных активных клеток и вокруг них.

Ткань ПЯ в участках, расположенных ближе к вентральному полюсу, полностью лишена клеток. Матрикс в этой области рыхлый, имеет сетчатоячеистую структуру и беден протеогликанами. В центре ПЯ матрикс становится более плотным, там сохраняются клетки, относящиеся, практически, только к ХПК. Часть клеток находится в состоянии дистрофии, вплоть до некроза. Клетки не образуют кластеров. Ближе к спинальному полюсу диска ткань ПЯ имеет рыхло-волокнистый матрикс, но значительно более плотный, чем в нативном ПЯ. Часть клеток не имеют лакун, отличаются умеренно окрашенным ядром и слабо оксифильной цитоплазмой (ХПК). Другая часть клеток представлена окруженными лакунами клетками с округлым плотным ядром, нечетко видимой цитоплазмой (хондроциты) (рис. 5г). Обе субпопуляции клеток перемешаны между собой и распределены в пространстве неравномерно. Все это свидетельствует о том, что в этом участке ПЯ начинает за-

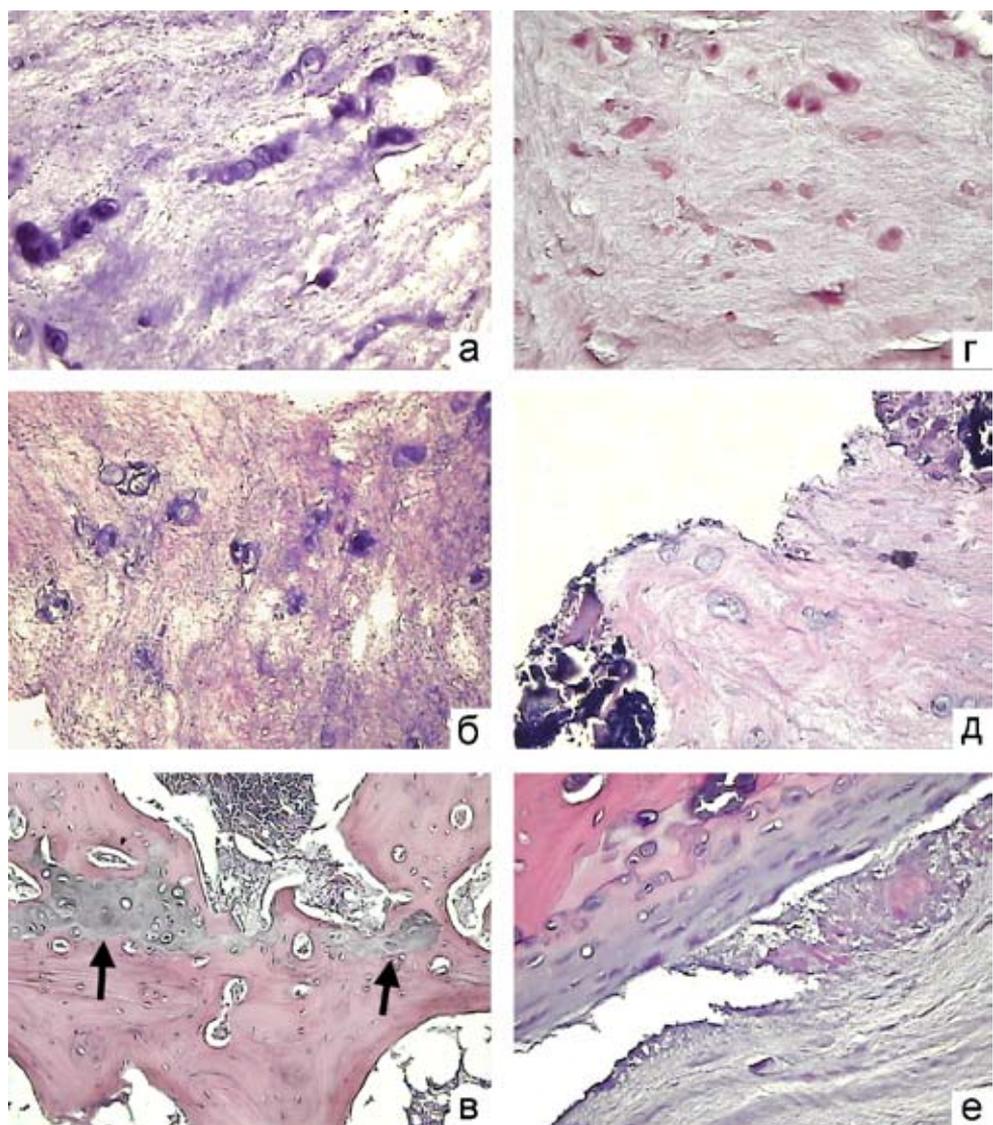


Рис. 6. Дегенеративно-измененные диски (модель) через 10 и 18 недель после начала опыта. а - диск L2-L3 (два прокола), срок 10 недель. Участок во внутреннем слое ФК с увеличением числа активных хондроцитов и мелкой зернистостью в матриксе (отложение солей извести). Ув. 400. б - диск L2-L3 (два прокола), срок 10 недель. Фрагмент ПЯ фиброзного типа с дистрофически измененными клетками и отложением извести в матриксе. Матрикс местами разрыхлен. Ув. 400. в - диск L5-L6 (один прокол), срок 10 недель. Истончение, фрагментация и деструкция хрящевого слоя ЗП; пазушное рассасывание кости. Стрелками обозначены фрагменты хряща. Ув. 200. г - диск L2-L3 (один прокол), срок 10 недель. Ткань фиброзного хряща заместившего ПЯ Ув. 400. д - диск L3-L4 (один прокол), срок 18 недель. Фиброзный хрящ во внутреннем слое ФК с некротически измененными клетками и очагами кальциноза (справа вверху и слева внизу). Ув. 400. е - диск L5-L6 (один прокол), срок 18 недель. Между ЗП и ФК видны слой гиалинового хряща и щель между ЗП и диском, заполненная зернистым распадом ткани, правее - фиброзный хрящ ФК. Ув. 200. а- е - окраска гематоксилином и эозином.

мещаться фиброзным хрящом, т.к. ХПК дифференцируются в хондроциты.

У двух животных на этот срок ПЯ уже полностью замещено тканью, имеющей структуру фиброзного хряща. В одних участках этой ткани клеточные структуры многочисленны. Там преобладают активизированные хондроциты с большими ядрами и вакуолизированной цитоплазмой. Местами они соединяются в двух- трехклеточные изогенные группы. Матрикс в этих участках тонко фибриллярный, но значительно более плотный, чем в нативном ПЯ (рис. 5д). Внутренний слой ФК имеет аналогичную структуру, видимая граница между ними отсутствует.

На сагиттальных срезах отмечаются изменения хрящевого слоя ЗП, особенно на краниальной стороне диска. В этом слое видны участки дистрофии и некроза части хондроцитов, очаги разрыхления и фибриллизации матрикса вплоть до резорбции хрящевой ткани и образования микрополостей. В двух дисках имеются обширные участки утолщения хрящевого слоя ЗП с краниальной стороны. В таких участках в хрящевой ткани видны фокусы костной ткани, т.к., по-видимому, происходит одновременный процесс оссификации хряща и вставания гиалиновой хрящевой ткани в костный слой ЗП и в кость позвонка. В хрящевом слое ЗП полностью нарушена колончатая архитектура клеток, преобладают многоядерные изогенные группы хондроцитов и много активных одиночных молодых клеток (хондробластов), при этом видны участки дистрофии клеток с отложением там извести (рис. 5е). Таким образом, деструкция ЗП, дистрофические и некротические изменения в хрящевом ее слое и оссификация хряща сочетаются с ре-

активными репаративными процессами роста хрящевой ткани.

Кроме того, в двух дисках, в которых ПЯ замещено фиброзным хрящом, образуются разрывы между ЗП и телом позвонка или между оссифицированной и неоссифицированной частями хрящевого слоя. Возможно, это происходит потому, что в результате разрушения и замещения ПЯ возникает перераспределение механической нагрузки вследствие изменения плотности ткани ПЯ.

Через 10 недель остеофиты выявляются во всех дисках, ткань их созревает, что выражается в появлении зрелых костных балок и сосудов. Однако основания остеофитов по-прежнему состоят из гиалинового и/или фиброзного хряща.

Наружный слой ФК изменен мало, за исключением области прокола, окруженного очагами некроза и регенерации за счет активных хондробластов и изогенных групп клеток. В среднем слое ФК есть участки, где в ламеллах происходит разрыхление упаковки и усиление волнистости коллагеновых волокон, а также расщепление самих ламелл.

Во внутреннем слое ФК есть небольшие участки разрыхления, но преобладают участки уплотнения коллагеновых волокон. Клетки в участках уплотнения в основном активные гипертрофические хондроциты, иногда с вакуолизированной цитоплазмой (рис 6а). Часть клеток подвергается дистрофическим изменениям. Характерно, что в таких участках на большом увеличении видно отложение мелкозернистого материала, (известь). Матрикс волокнистый, ламеллярная структура отсутствует.

Ткань ПЯ замещена фиброзным хрящом разной структуры. Местами матрикс состоит из плотноупакованных, но очень

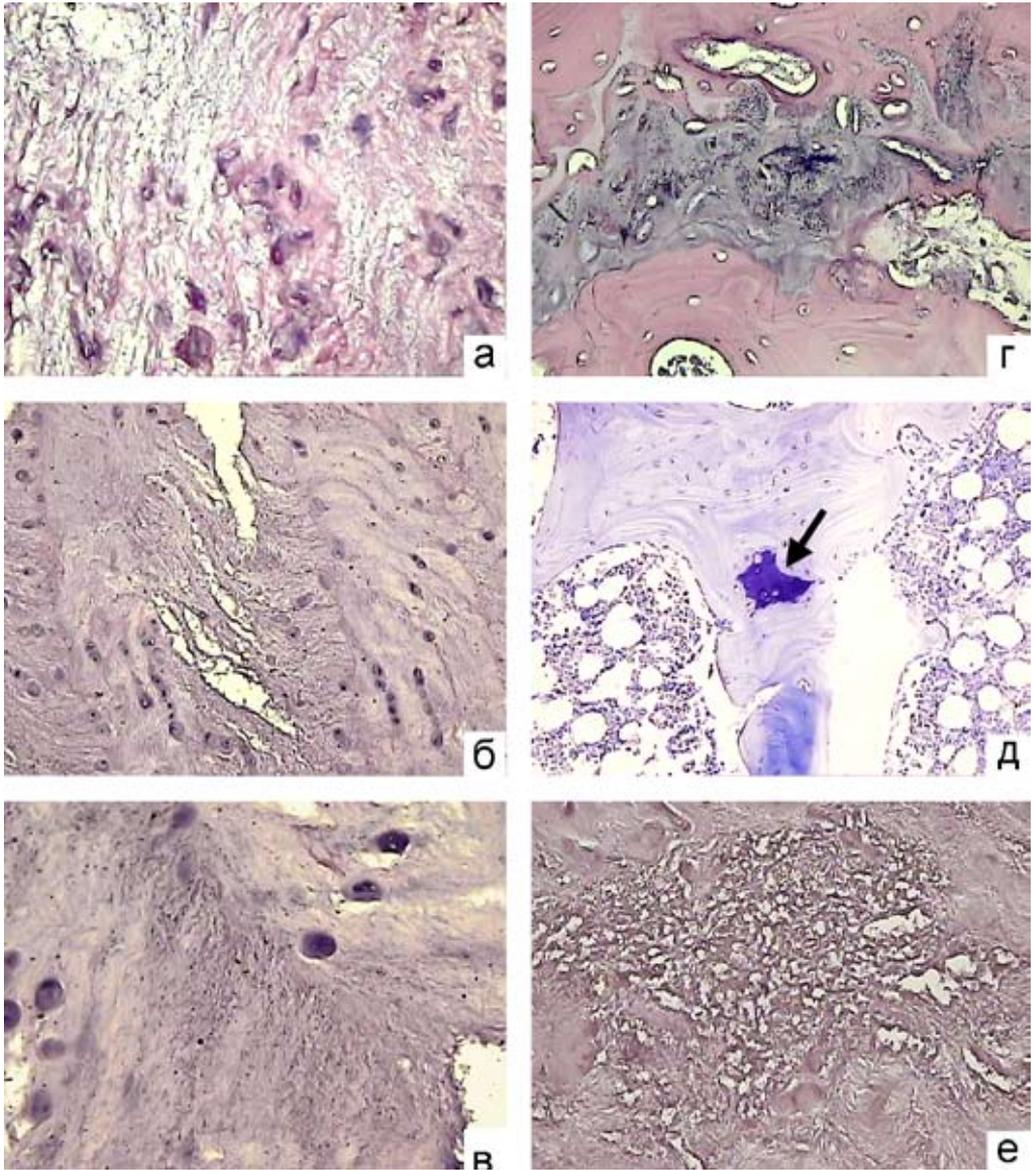


Рис. 7. Дегенеративно-измененные диски (модель) через 32 и 40 недель после начала опыта  
а – диск L4-L5 (один прокол), срок 32 недели. ПЯ, замещённое фиброзным хрящом. Справа – участок уплотнения, слева – разрыхления матрикса. Хондроциты дистрофически изменённые и не активные. Ув. 400. б – диск L2-L3 (один прокол), срок 40 недель. Граница внутреннего и среднего слоя ФК, в середине участок некроза и разрыхления с образованием трещин. Ув. 200. в – диск L2-L3 (один прокол), срок 40 недель. Участок фиброзного хряща с зернистой деструкцией волокон матрикса. Ув. 400. г – диск L5-L6 (два прокола), срок 40 недель. Отложение солей извести (гранулы) и участки деструкции в хрящевой ткани ЗП. Ув. 400. д – диск L3-L4 (один прокол), срок 40 недель. В центре небольшой фрагмент гиалинового хряща (стрелка), остающегося после резорбции гиалинового слоя ЗП. Ув. 200. е – диск L2-L3 (два прокола), срок 40 недель. Фокус зернисто-вакуольной деструкции ткани в среднем слое ФК. Ув. 400.  
а- г, е – окраска гематоксилином и эозином; д – окраска толуидиновым синим.

тонких волокон с умеренной метахромазией, а клетки частично дистрофичны. а частично представлены гипертрофическими активными хондроцитами. Местами в клетках и матриксе имеются мелкогранулярные отложения извести. Таким образом, внутренний слой ФК и ПЯ состоят из ткани типа фиброзного хряща, но с выраженными дистрофическими изменениями и отложением извести (рис. 6б).

В хрящевом слое ЗП видны участки резорбции хрящевой ткани, замещенные костной тканью. При этом на краниальной стороне дисков таких участков больше, а гиалиновый хрящ истончен в большей степени, чем на каудальной стороне (рис. 6в). Кроме того, вблизи участков наибольшей резорбции хряща происходит также пазушное рассасывание костных балок. Местами в гиалиновом слое встречаются локальные очаги утолщения гиалинового хряща, вдающегося в костную ткань позвонка.

На сагитальном срезе диск имеет форму овала, сужающегося в середине. Наружные слои ФК не изменены, средние слои имеют участки разрыхления. Внутренние слои неотличимы от ПЯ. Последнее представлено фиброзным хрящом, оно смещено к краниальной стороне диска. Ткань, заместившая ПЯ, состоит из относительно тонких, местами плотно упакованных, в других участках рыхло упакованных коллагеновых волокон и крупных клеток в основном без лакун (единичные клетки с лакунами) (рис. 6г). Плотность упаковки матрикса неравномерная – есть рыхлые и плотные участки.

Кроме того, в ПЯ обнаруживаются небольшие очаги зернистой деструкции ткани и мелкие кисты, оставшиеся, по-видимому, после резорбции бывших

участков некроза. Только в одном диске в ПЯ остается фрагмент ядра, где сохранились кластеры НХК, но преобладают ХПК. Показательно, что вокруг сохранившихся кластеров и отдельных клеток видны «чехлы», состоящие из протеогликанов. Следует отметить, что клетки окруженные «чехлами» находятся в состоянии выраженной дистрофии либо деструкции. При окраске толуидиновым синим «чехлы» уплотнены и метахроматичны, а ткань между ними более рыхлая, хотя также сохраняет метахромазию. В других фрагментах ПЯ некротизировано, ткань уплотнена, но бесклеточна.

Следует отметить, что в части дисков отмечается обратный (в сторону центра) изгиб ламелл среднего и внутреннего слоя ФК на вентральном и каудальном полюсе – ретракция ламелл.

Через 18 недель после начала опыта остеофиты обнаружены во всех дисках. В большинстве дисков они состоят в основном из костной ткани, в основании остается гиалиновый хрящ. В одном диске обнаружен небольшой незрелый остеофит, состоящий преимущественно из хрящевой ткани.

В среднем слое ФК есть участки разрыхления и расслоения ламелл, извитых волокон. Наружные ламеллы ФК по полюсам диска изменены мало, но средние ламеллы изгибаются к центру. С вентральной и каудальной сторон ламеллы прослеживаются нечетко. Ткань там состоит из тонких коллагеновых волокон, образующих кримпы, в клетках имеются дистрофические изменения. Во внутреннем слое изменения заключаются в уплотнении матрикса, в котором коллагеновые волокна расположены более беспорядочно, чем в интактном диске, а также в значительном увеличении размеров

клеток. Хондроциты округлые с умеренным увеличением цитоплазмы, с четким и относительно широким ободком плотной метахроматической субстанцией вокруг клеток.

ПЯ большей частью представлено фиброзным хрящом, близким по строению к внутреннему слою ФК. Отмечается множество клеток, аналогичных выше описанным, но волокнистый матрикс более рыхлый. В самом центре в некоторых дисках сохраняются небольшие участки ПЯ с некротизированными ХПК, вокруг которых еще остается «чехол» из протеогликанов.

Необходимо отметить, что на этот срок в большей части дисков усиливаются дистрофические и даже некротические изменения в фиброзном хряще, заместившем внутренний слой ФК и ПЯ. Во внутреннем слое ФК на границе с ПЯ видны участки ткани с тонковолокнистым матриксом, большая часть клеток которых некротизирована. Там же имеются несколько фокусов тканевого распада с отложением солей кальция (рис. бд). ПЯ полностью замещено фиброзным хрящом. Однако, в отличие от ткани, заместившей внутренний слой ФК, в ней преобладают дистрофически измененные, либо некротизированные клеточные элементы, а крупные округлые клетки с «чехлами» выявляются лишь в небольшой части ПЯ. При окраске толуидиновым синим новообразованная ткань, заместившая ПЯ, имеет сравнительно слабую метахромазию, но там, где клеток больше, метахромазия выше. В ПЯ имеются фокусы зернистого распада.

На сагиттальных срезах отмечается одновременное протекание двух противоположных процессов в слоях гиалинового хряща ЗП: деструктивных и ре-

паративных. На краниальной стороне усиливается фрагментация этого слоя, т.к. значительные его участки замещены костной тканью. Остаются фокусы деструкции и некроза хряща, но одновременно в ряде дисков на краниальной и каудальной стороне усиливаются репаративные процессы в виде пролиферации активных молодых хондробластов с гиперхромным ядром. Эти клетки не имеют лакун, иногда образуют изогенные группы. Часто они встречаются вокруг очагов некроза и замещают их.

В части дисков с краниальной стороны между ЗП и ФК сформирована относительно узкая прослойка гиалинового хряща. Клетки в этой прослойке имеют дистрофические изменения, часть из них отличаются вытянутой формой. Между этой прослойкой и ФК формируется щель, частично заполненная тканью, находящейся в состоянии зернистой деструкции (рис. бе).

Через 32 недели зрелые костнохрящевые остеоциты обнаруживаются во всех дисках.

Гиалиновый слой ЗП с обеих сторон, особенно с краниальной стороны, имеет многочисленные участки дезорганизации и оссификации хрящевой ткани, а также выраженные признаки регенерации, в виде образования комплексов активных хондробластов и немногочисленных небольших изогенных групп.

Средний и внутренний слои ФК вогнуты в сторону центра диска. Внутренний слой ФК и ПЯ не отличаются друг от друга, так как трансформированы в фиброзный хрящ с практически одинаковой структурой. В этой ткани есть участки резко разрыхленного и уплотненного матрикса. Клетки в обоих этих участках представлены в основном дистрофиче-

скими формами или хондроцитами без признаков биосинтетической активности (рис. 7а). Матрикс в этих участках разрыхленный; содержание протеогликанов снижено.

Через 40 недель после начала опыта во всех дисках имелись остеофиты. Наружный слой ФК мало изменен, в среднем слое видны участки разрыхления, расщепления ламелл, местами нечетко выраженное ламеллярное строение. Внутренний слой ФК и ПЯ в основном замещены тканью фиброзного хряща, в котором остаются большие некротические бесклеточные зоны. Там же образуются множественные щели (трещины) (рис. 7б). Характерно, что сохранившиеся клетки принадлежат к активным хондроцитам с «чехлами» в то время, как рядом много дистрофических и некротизированных клеток. Матрикс в основном тонковолокнистый, но местами он разрушается, и формируются очаги зернистого распада (рис. 7в). Все это свидетельствует об усилении вторичной дистрофии и дезорганизации фиброзного хряща, замещившего ПЯ в этот срок.

Гиалиновый слой ЗП в одних дисках на каудальной стороне сохранен, но в нем имеются участки оссификации, деструкции и регенерации. На краниальной стороне слой истончен, местами сильно фрагментирован. В сохранившейся хрящевой ткани видно отложение солей извести (рис. 7г). В других дисках на краниальной стороне гиалиновый слой практически исчез. На его месте в костной ткани ЗП остается лишь несколько небольших фрагментов хрящевой ткани (рис. 7д). Наружный слой ФК обычный, средний и внутренний слои изогнуты в сторону ФК. В среднем слое имеются несколько фокусов разрыхления, вплоть

до распада ткани, где отсутствуют клетки (рис. 7е). Внутренний слой ФК, как и ПЯ, замещен фиброзным хрящом, однако в зоне бывшего ПЯ в этом хряще видны несколько глубоких щелей. Они образуются в дистрофически измененной ткани, где сохраняется плотный волокнистый матрикс, но большая часть клеток подвергается дистрофическим и некротическим изменениям.

### Обсуждение результатов

Одной из целей данного исследования было изучение изменений в интактных МПД кроликов при моделировании дегенерации в других дисках опытных животных

Из литературы известно, что диски кроликов, в основном ПЯ, подвергаются определенным возрастным изменениям [9]. С возрастом в ПЯ происходит постепенное замещение НХК на ХПК. При этом происходит уплотнение матрикса ПЯ. У 4-5-летних животных изменения МПД достигают степени дегенерации [36]. Известно также, что у человека выраженные возрастные изменения МПД, начинаются уже со второго десятилетия жизни [5, 28].

В наших исследованиях у контрольных животных в возрасте 6-7 месяцев, а также в интактных дисках опытных животных, через 6 недель после начала эксперимента в подавляющем числе дисков изменения отсутствуют. ФК сохраняет характерную ламеллярную структуру, а ПЯ свой рыхлый матрикс и кластеры преимущественно НХК. Макроскопически этому соответствуют плотное слоистое ФК и мягко-упругое полупрозрачное ПЯ с четкой границей между ними. Только в единичных дисках (2-х из 19)

в ПЯ обнаруживались очаги дистрофических изменений НХК вплоть до их некроза, а также уплотнение матрикса вокруг клеток. Характерно, что оба этих диска располагались в каудальной части позвоночника (L7-S1). Макроскопически ПЯ в этих дисках имело диффузное помутнение и уплотнение.

Начиная с 10-й недели опыта и до его окончания через 40 недель, гистологически постепенно нарастали дистрофические и некротические изменения в ПЯ: все большее замещение НХК хондроцитоподобными клетками, уплотнение матрикса вокруг кластеров, уменьшение содержания протеогликанов, некроз клеток, появление бесклеточных участков и очагов зернистого распада ткани (клеток и коллагеновых волокон). Во внутреннем слое ФК возникают очаги перестройки ткани с исчезновением ламеллярной структуры. Развиваются дистрофия и некроз части хондроцитов. В гиалиновом слое ЗП появляются небольшие очаги деструкции. Подобные изменения структуры дисков в среднем выражены сильнее в МПД каудального полюса поясничного отдела позвоночника (L6-L7 и L7-S1), чем в дисках краниального полюса. Все эти изменения, однако, не достигают степени разрушения ПЯ, которое, в основном, сохраняет свою нативную кластерную структуру и не трансформируется в фиброзный хрящ. Гистологические изменения подтверждаются макроскопическим исследованием: постепенно нарастающим диффузным и очаговым помутнением ПЯ и менее четкой границей между ФК и ПЯ в ряде дисков, особенно на поздних сроках.

Возникает вопрос – являются описанные изменения проявлением возрастной инволюции дисков или связаны с нарастаю-

щей нестабильностью позвоночника, причиной которой становятся дегенеративные процессы в других дисках этих животных, вызванные моделированием? В работе [25] описаны гистологические особенности интактных МПД кроликов, соседних с дегенеративно измененными дисками (модель с использованием артрореза).

В наших исследованиях мы сравнивали интенсивность дистрофических изменений в интактных дисках в зависимости от того, расположены ли они в непосредственном соседстве с моделированными дисками или отстоят от них на два позвонка. Оказалось, что относительно выраженные изменения были только в первом случае, независимо от того спереди или сзади находились эти диски по отношению к дискам, подвергавшимся экспериментальному воздействию. Это позволяет думать, что нестабильность позвоночника является более важным фактором для изменений в интактных дисках, чем возраст животных. Тем более что даже в конце опыта возраст животных был равен в среднем 80-ти неделям (это не является большим возрастом для кроликов, живущих в среднем 6-8 лет). Кроме того, по нашим данным в дисках, расположенных на границе поясничного и крестцового отделов, дегенеративные изменения выражены сильнее; возможно, на них больше влияет нестабильность позвоночника.

Моделирование дегенеративных изменений в МПД (независимо от одного или двух последовательных проколов ФК) ведет к значительно более выраженным изменениям диска, чем вышеописанные изменения интактных дисков. В местах проколов на наружной поверхности ФК уже через 6 недель возникают остеофиты; в последующем они лишь по-

степенно созревают от преимущественно хрящевой (гиалиновый и фиброзный хрящ) до преимущественно костной структуры путем энхондральной ossификации хряща. Следует отметить, что остеоциты по данным литературы являются неперменной и важной составляющей дегенеративно-измененных дисков у человека при остеохондрозе, а также при экспериментальном моделировании [17, 31].

Наиболее важные изменения при использованной нами модели дегенерации возникают в ПЯ и внутреннем слое ФК. Эти изменения обнаруживаются уже через 6 недель после начала опыта и постепенно прогрессируют вплоть до его окончания (40 недель). Уже в 6 недель в половине дисков (4 из 8) ПЯ и внутренний слой ФК полностью замещаются фиброзным хрящом, в котором отсутствует ламеллярная структура. Наряду с отдельными некротизированными клетками бывшего ПЯ в этом хряще преобладают активные хондроциты, синтезирующие коллаген и протеогликаны, формирующие волокнистый матрикс. В других дисках ПЯ сохраняется, но частично некротизируется, частично в нем происходит замещение НХК на ХПК, которые затем либо некротизируются, либо дифференцируются в хондроциты. Так как в этот период во внутреннем слое ФК преобладают дистрофические процессы, и отсутствует пролиферация хондроцитов, можно считать, что основным источником клеток, формирующих новообразованный фиброзный хрящ, являются ХПК пульпозного ядра, а не клетки ФК. Макроскопически этому соответствует разная степень уплотнения, диффузного или очагового помутнения ПЯ и исчезновения границы между ФК и ПЯ.

В последующие сроки (10, 18, 32 и 40 недель) процесс замещения ПЯ и внутреннего слоя ФК фиброзным хрящом усиливается. Из 26 дисков на эти сроки только в 5-ти оставались фрагменты ПЯ с признаками некроза клеток в кластерах и формированием ободка сгущенного матрикса вокруг них, очагами зернистого распада матрикса, отложением солей извести, бесклеточными полями рыхлого матрикса.

В большинстве дисков ПЯ и внутренний слой ФК полностью замещены фиброзным хрящом. Начиная с 10-й недели опыта, клетки этой ткани представлены в основном формами с ослабленной биосинтетической активностью. Особенно важно отметить, что уже с этого срока в фиброзном хряще, заместившем ПЯ, возникают дистрофические и некротические изменения клеток, появляются бесклеточные участки, отложения извести в матриксе. Снижается также содержание протеогликанов, а коллагеновые волокна подвергаются частичной деструкции. Все это свидетельствует о начинающейся дистрофии хрящевой ткани, которая прогрессирует в дальнейшем. Мы обозначаем это явление как вторичную дистрофию ПЯ по сравнению с первичной дистрофией, возникающей в первый месяц после прокола ФК.

С 18-й недели усиливаются дистрофические и некротические изменения в фиброзном хряще; помимо некроза клеток появляются очаги зернистого распада матрикса. В отдельных дисках возникают мелкие щели (трещины) и полости в замещенном ПЯ, а также крупные щели, отделяющие ЗП от измененной ткани диска. Часть щелей заполняется зернистыми массами тканевого распада. Это свидетельствует о том, что именно деструкция в диске является причиной образования

щелей. Наиболее часто щели в новообразованном фиброзном хряще и между ЗП и диском обнаруживаются через 32-40 недель после начала опыта. В эти же сроки максимально усиливаются дистрофия и некроз клеток фиброзного хряща, увеличиваются поля бесклеточной ткани и зернистого распада.

Следует отметить также своеобразное изменение архитектоники ФК в дегенеративно измененных дисках, которое начинается уже с 10-й недели в части дисков и усиливается в следующие сроки уже во всех дисках. Ламеллы среднего слоя ФК и той части внутреннего слоя, которая еще не подверглась структурной реорганизации, разрыхляются, расщепляются и приобретают извитую форму. При этом ламеллы, ранее имевшие строго циркулярную форму, на вентральном и спинальном полюсе совершают обратный изгиб в сторону центра, т.е. к внутренней области, занятой новообразованным фиброзным хрящом. Это происходит, вероятно, потому, что ПЯ с его уникальной гелеобразной, насыщенной жидкостью, упругой структурой, трансформируясь в фиброзную структуру, уже не давит на ламеллы ФК, а напротив, уменьшаясь в объеме, как рубцовая ткань, ведет к ретракции ткани. Подобное же переориентирование силовых напряжений ведет к отрыву диска от ЗП в участках, где ПЯ ранее наиболее близко подходило к ЗП и где, потом формируются щели.

Нативная структура ФК и ПЯ при отсутствии сосудов в диске обеспечивает питание ткани путем диффузии питательных веществ и кислорода из сосудов костной ткани позвонков и ЗП. В новых условиях при фиброзировании ПЯ, отрыве диска от ЗП, изменении архитектоники и биомеханической функции диска

диффузия питательных веществ затруднена, что и является основной причиной вторичных дистрофических изменений в дегенеративном диске.

Следует также обратить внимание на выраженные изменения в гиалиновом слое ЗП, которые начинаются уже с 6-й недели и затем усиливаются: некроз, деструкция, кальциноз, оссификация, истончение и фрагментация гиалинового хряща, сопровождаемые репаративной реакцией. К 40-й неделе в части дисков в ЗП остаются лишь отдельные фрагменты хряща, окруженные костной тканью. Эти изменения, очевидно, индуцируются резким снижением амортизирующей функции диска при фиброзировании ПЯ, но, в свою очередь, влияют на биомеханику и питание диска. Подобные изменения, особенно оссификация ЗП, были отмечены при моделировании дегенеративных изменений в МПД у кроликов [24], а также при старении и дегенерации МПД у человека [28].

Изменение архитектоники ламелл и разрыхление коллагенового каркаса ФК ведет к ослаблению биомеханической прочности ФК. В условиях использованной нами экспериментальной модели это не приводило к образованию протрузий и грыж (во многом из-за быстрого фиброирования ПЯ), но в человеческой патологии эти осложнения остеохондроза являются важнейшими в его клинических проявлениях.

Таким образом, изученная нами на кроликах модель дегенерации МПД по своим морфологическим проявлениям весьма близка к остеохондрозу человека [27, 35] и может быть адекватно использована для изучения механизма действия различных лечебных факторов, в том числе лазерно-индуцированной реконструкции МПД.

## Выводы

1. Экспериментальная модель дегенерации межпозвонковых дисков у кроликов с помощью одного или двух последовательных проколов фиброзного кольца дает результаты, близкие к остеохондрозу человека.

2. Наблюдались некроз и деструкция ткани пульпозного ядра, которое замещается фиброзным хрящом с постепенным развитием в нем вторичных дистрофических и некротических изменений. Возникает дезорганизация и последующая реорганизация внутреннего и среднего слоев фиброзного кольца с расщеплением ламелл, их ретракцией, разрыхлением коллагеновых волокон. Одновременно наступает деструкция гиалинового хряща замыкательной пластинки с частичным отрывом ее от фиброзной капсулы, в местах проколов формируются остеофиты.

3. В интактных дисках опытных животных (особенно ближайших с дегенеративно-измененными) в результате нестабильности позвоночника возникают изменения в виде дистрофии и некроза нотохордальных клеток и замещения их хондроцитоподобными, частичной деструкции ткани пульпозного ядра, но без замещения его фиброзным хрящом.

Авторы благодарят РФФИ (грант 07-02-12080-офи), МНТЦ (грант 3360) и корпорацию Аркью Медикал Инк. за финансовую поддержку работы.

## Литература

1. Басков А.В., Шехтер А.Б., Соболев Э.Н. и др. Влияние лазерного излучения на процессы регенерации хрящевой ткани межпозвонковых дисков. 1. Предварительное сообщение // *Лазерная медицина*, № 6(2), с.18-23, 2002.

2. Лазерная инженерия хрящей. / Под ред. В.Н. Баграташвили, Э.Н. Соболя,

А.Б. Шехтера. – М.: Физматгиз, 2006.

3. Соболев Э.Н., Басков А.В., Свиридов А.П., Захаркина О.Л. Технология и оборудование для лазерной реконструкции межпозвонковых дисков // *Альманах клинической медицины*, № 17(2), с.242-245, 2008.

4. Alini M., Eisenstein S.M., Ito K. et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? // *Eur Spine J.*, 17:2-19, 2008.

5. Boos N., Weissbach S., Rohrbach H. et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science // *Spine*, 27(23):2631-44, 2002.

6. Cavanaugh J.M., Kallakuri S., Ozaktay A.C. Innervation of the rabbit lumbar intervertebral disc and posterior longitudinal ligament // *Spine*, 20(19):2080-2085, 1995.

7. Freemont A.J., Watkins A., Le Maitre C. et al. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy // *J. Pathol.* 196: 374–379, 2002.

8. Gan J.C., Ducheyne P., Vresilovic E.J. et al. Intervertebral disc tissue engineering I: characterization of the nucleus pulposus // *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (411):305-314, 2003.

9. Green P.W.B., Fox R.R., Sokoloff L. Spontaneous degenerative spinal disease in the laboratory rabbit // *J. Orthop. Res.*, 2:161-168, 1984.

10. Hadjipavlou A.G., Simmons J.W., Yang J.P. et al. Torsional injury resulting in disc degeneration: I. An in vivo rabbit model // *J. Spinal Disord.*, 11(4):312-317, 1998.

11. Hirano N., Tsuji H., Ohshima H. et al. Analysis of rabbit intervertebral disc physiology based on water metabolism. I. Factors influencing metabolism of the normal intervertebral discs // *Spine*, 13(11):1291-1296, 1988.

12. Ireland D. Molecular mechanisms involved in intervertebral disc degeneration and potential new treatment strategies //

*Bioscience Horizons*, 2(1):83-89, 2009.

13. Iwahashi M., Matsuzaki H., Tokuhashi Y. et al. Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits to explicate intervertebral disc disorders caused by smoking // *Spine*, 27(13):1396-401, 2002.

14. Kim K.W., Lim T.H., Kim J.G. et al. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs // *Spine*, 28(10):982-990, 2003.

15. Kroeber M.W., Unglaub F., Wang H. et al. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration // *Spine*, 27(23): 2684-2690, 2002.

16. Lipson S.J., Muir H. Experimental intervertebral disc degeneration: morphologic and proteoglycan changes over time // *Arthritis Rheum.*, 24(1): 12-21, 1981.

17. Lipson S.J., Muir H. Vertebral osteophyte formation in experimental disc degeneration. Morphologic and proteoglycan changes over time // *Arthritis Rheum.*, 23(3): 319-24, 1980.

18. Lotz J.C., Ulrich J.A. Innervation, inflammation, and hypermobility may characterize pathologic disc degeneration: review of animal model data // *J. Bone Joint. Surg. Am.*, 88 Suppl. 2:76-82, 2006.

19. Lotz J.C. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned // *Spine*, 29(23):2742-50, 2004.

20. Masuda K., Aota Y., Muehleman C. et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration // *Spine*, 30(1):5-14, 2005.

21. Masuda K., Imai Y., Okuma M. et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model // *Spine*, 31(7):742-54, 2006.

22. Nomura T., Mochida J., Okuma M. et al. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration // *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (389):94-101, 2001.

23. Omlor G.W., Lorenz H., Engelleiter K. et al. Changes in gene expression and protein distribution at different stages of mechanically induced disc degeneration - an in vivo study on the New Zealand white rabbit // *J. Orthop. Res.*, 24(3):385-92, 2006.

24. Peng B., Hou S., Shi Q., Jia L. The relationship between cartilage end-plate calcification and disc degeneration: an experimental study // *Chin. Med. J. (Engl.)*, 114(3):308-12, 2001.

25. Phillips F.M., Reuben J., Wetzel F.T. Intervertebral disc degeneration adjacent to a lumbar fusion. An experimental rabbit model // *J. Bone Joint Surg. Br.*, 84-B:289-294, 2002.

26. Poiraudreau S., Monteiro I., Anract P. et al. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. Comparison with cartilage cells from the same animals // *Spine*, 24(9):837-844, 1999.

27. Roberts S. Disc morphology in health and disease // *Biochem. Soc. Trans.* 30(6):864-86, 2002.

28. Roughley P.J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix // *Spine*, 29(23):2691-9, 2004.

29. Scott N.A., Harris P.F., Bagnall K.M. A morphological and histological study of the postnatal development of intervertebral discs in the lumbar spine of the rabbit // *J. Anat.* 130(Pt 1):75-81, 1980.

30. Singh K., Masuda K., An H.S.

Animal models for human disc degeneration // *Spine J.* 5:267S–279S, 2005.

31. Sobajima S., Kompel J.F., Kim J.S. et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology // *Spine*, 30(1):15-24, 2005.

32. Sobol E., Baskov A., Shekhter A. et al. Laser regeneration of spine discs cartilage: mechanism, in vivo study and clinical applications // *Proceedings of Light-Activated Tissue Regeneration and Therapy Conference*; R. Waynant and D.R. Tata eds.; Springer pp. 259-266, 2008.

33. Sobol E., Zakharkina O., Baskov A., Shekhter A. et al. Laser engineering of spine discs // *Laser Physics*, 19(4):825-835, 2009.

34. Unglaub F., Guehring T., Lorenz H. et al. Effects of unisegmental disc compression on adjacent segments: an in vivo animal model // *Eur. Spine J.*, 14(10): 949-955, 2005.

35. Urban J.P.G., Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc // *Arthritis. Res. Ther.*, 5:120-130, 2003.

36. Yoon S.T., Kim K.S., Li J. et al. Age related intervertebral disc degeneration in the rabbit // 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, poster #0888, 2005.

### SIMULATION OF THE INTERVERTEBRAL DISCS DEGENERATIVE CHANGES (SPINE OSTEOCHONDROSIS) IN RABBITS: MACROSCOPIC AND HISTOLOGICAL STUDY

**A.B.Shekhter, V.A.Baskov, O.L.Zakharkina, A.E.Guller, I.A.Borschenko,  
I.Yu.Kolyshev, G.J. Kapanadze, A.V. Baskov, E.N. Sobol**

*I.M.Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow*

*Neurosurgical Department, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow*

*Institute on Laser and Information Technologies RAS, Troitsk, Moscow Region*

*“ORTHOSPINE” Clinic, Moscow*

*The Research center for biomedical technologies RAMS, Moscow*

The study was aimed at the longitudinal observation (up to 40 weeks) and detailed description of the structural changes occurring in the intervertebral discs of rabbits after surgically induced degeneration. It was founded that after the single and double punctures the osteophytes were formed at the point of stabbing. Moreover, in the model intervertebral discs the hyaline cartilage of the end-plates was failed and the tissue of the nucleus pulposus was gradually replaced by fibrous cartilage. Subsequent secondary dystrophy of the fibrous cartilage filling the nucleus area was observed as well as the disorganization of the inner and middle thirds of the annulus fibrosus and arising of the cracks between the end-plates and the external part of the annulus. The moderate dystrophic processes were revealed in the nucleus pulposus of the intact intervertebral discs located next to the stabbed discs anatomic levels. We suggest the instability of the spine, probably, was the main reason of these changes.

The observed degeneration of the intervertebral discs is close to the changes characteristic to human spinal osteochondrosis. Adequacy of the model allows studying the effects and mechanisms of various treatments for this disease, including the method of laser reconstruction of intervertebral discs.

**Key words:** animal model of spinal osteochondrosis, rabbits, intervertebral discs, morphology.



## Модулирование действия ядерных рецепторов и регуляция биотрансформации лекарств

С.Н.Ларина, Н.В.Чебышев, Е.В.Ших, В.Н.Каркищенко

*ММА им. И.М.Сеченова, Москва*

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Ядерные рецепторы являются транскрипционными факторами, которые играют важную роль в ходе эмбрионального развития, поддержании дифференцировки клеток, метаболизме. Лиганд-регулируемый ядерный PXR рецептор, взаимодействует с разнообразными химическими лигандами и лекарственными препаратами и регулирует экспрессию генов, которые участвуют в метаболизме ксенобиотиков и лекарств. Строение этого рецептора обеспечивает связывание с широким спектром лигандов, которые могут действовать как агонисты или антагонисты. Изучение модуляции действия ядерных рецепторов важно для разработки лекарственных препаратов, регулирующих метаболизм, а также при изучении взаимодействия лекарств.

**Ключевые слова:** ядерные рецепторы, PXR рецептор, биотрансформация ксенобиотиков, CYP3A4 цитохром.

Ядерные рецепторы являются транскрипционными факторами, которые играют важную роль в ходе эмбрионального развития, поддержании дифференцировки клеток, метаболизме и клеточной гибели. Нарушение сигнальной функции ядерных рецепторов ведет к болезням обмена веществ, таким как рак, бесплодие, ожирение, диабет, нарушениям пролиферации клеток. Гены ядерных рецепторов включают лиганд-зависимые и лиганд-независимые транскрипционные факторы. Фармацевтические препараты-агонисты или антагонисты ядерных рецепторов, такие как тамоксифен для эстрогенового рецептора, (используемый в лечении рака молочной железы), тиазолидиндионы для рецептора PPAR- $\gamma$  (при лечении диабета типа 2) или дексаметазон для глюкокортикоидного рецеп-

тора (при лечении воспалительных заболеваний) являются одними из наиболее часто используемых лекарств. Ряд ядерных рецепторов регулируют экспрессию генов биотрансформации ксенобиотиков и лекарств.

Структура ядерных рецепторов включает N-концевой активируемый домен и консервативные ДНК-связывающие и лиганд-связывающие домены. Ядерные рецепторы, выполняющие ключевую роль в регуляции биотрансформации ксенобиотиков, функционируют как лиганд-зависимые транскрипционные факторы. После активации лигандом происходит связывание со специфическими последовательностями ДНК; т.н. распознаваемыми элементами внутри регуляторной области промоторов соответствующих генов-мишеней. Каждый

такой элемент состоит из последовательности (AGGTCA). Эта последовательность может присутствовать в виде одного элемента или двух tandemных повторов в разных направлениях (прямом, инвертированном или развернутом). Эти последовательности обеспечивают связывание ядерных рецепторов в виде мономеров, гомодимеров или гетеродимеров. Ряд ядерных рецепторов, в том числе и RXR, образует гетеродимеры, которые могут связываться с распознаваемыми участками ДНК и активировать экспрессию генов-мишеней [28]. Лиганд-связывающие домены имеют структуру, состоящую из 12 альфа-спиралей с центральным гидрофобным карманом, который непосредственно связывается с рядом гормонов, липидов, синтетических лигандов. Структура многих ядерных рецепторов при связывании с агонистами принимает чрезвычайно сходную активную конформацию в различных ядерных рецепторах [4]. Ядерные рецепторы активируют или подавляют экспрессию генов-мишеней через лиганд-зависимые взаимодействия с дополнительными белками, известными как коактиваторы и корепрессоры. Эти кофакторы образуют комплексы из многих субъединиц, которые локально модифицируют структуру хроматина и собирают транскрипционный механизм на промоторах генов [6]. Коактиваторы и корепрессоры распознают изменение конформации AF2 рецепторного участка ядерных рецепторов при связывании с лигандом. В ходе многочисленных исследований была выявлена центральная роль ядерных рецепторов, в качестве сенсоров различных липидов образуемых в организме и ксенобиотиков. Действие рецепторов может моделироваться с использованием

соответствующих лекарственных препаратов, которые являются лигандами агонистами или антагонистами.

### **Примеры модулирования действий ядерных рецепторов с помощью лекарств**

Тамоксифен стал первым селективным модулятором эстрогенового рецептора, который был разработан и использован для клинического применения при лечении рака груди [8]. Он проявляет себя как агонист или антагонист в зависимости от транскрипционных факторов, которые присоединяются к промотору и от строения распознаваемого ДНК-элемента в промоторе эстрогенового рецептора и состава клетки. Ралоксифен является другим классическим модулятором, который имел положительный защитный эффект в отношении костных тканей и антипролиферативное действие в отношении клеток опухоли молочной железы. Действие тамоксифена как агониста определяется через связывание рецептора с промотором, который не содержит классического ДНК-элемента эстрогеновых рецепторов. В ответ на лиганды изоформы эстрогеновых рецепторов ER- $\alpha$  и ER- $\beta$  могут регулировать транскрипцию генов, связываясь со специфическими ERE элементами в промоторах генов-мишеней, либо путем связывания с другими транскрипционными факторами, действуя на определенные участки белков активаторов (AP-1) и (SP1) [5]. Связывание эстрогенового рецептора с соответствующим элементом ERE является, по-видимому, путем, через который эстрадиол модулирует транскрипцию гена, включает клеточную дифференцировку. Взаимодействие эстрогенового рецептора с AP1

и SP1 участками белка-активатора, возможно, влияет на клеточную пролиферацию. Можно предположить, что эстрадиол опосредует дифференцировку и пролиферацию различными путями. При разработке селективных лигандов, целью является не только достижение селективности в отношении ER $\alpha$  и ER $\beta$ , но также селективности для взаимодействия с ERE элементами (эстрадиол-индуцируемая дифференцировка) в противоположность взаимодействию с AP1 участкам (эстрадиол-индуцируемая пролиферация). Эта схема, тем не менее, еще требует окончательного подтверждения.

Эффект комплекса тамоксифен-ER $\alpha$  противоположен эффекту комплекса тамоксифен-ER $\beta$  [18]. Если комплекс ER $\alpha$  ингибирует пролиферацию, то ER $\beta$  комплекс усиливает ее. В таком случае присутствие ER $\beta$  в клетках рака груди может значительно подавлять антипролиферативные эффекты тамоксифена. Транскрипционная активация опосредованная ER основана на подборе нескольких коактиваторов и ацетилировании гистонов. Эстрогеновые рецепторы ER связанные с антагонистом, взаимодействуют с корепрессорами такими как NCoR1, NCoR2, набором HDAC [26]. В клетках млекопитающих как тамоксифен, так и ралоксифен индуцируют подбор корепрессоров на промоторах генов-мишеней, однако, в клетках эндометрия тамоксифен, но не ралоксифен действует подобно эстрадиолу, т.е. подбирает коактиваторы на некоторых генах. Эстрадиол подобная активность тамоксифена в матке требует высокого уровня экспрессии коактиватора ядерного рецептора (N Co A1, также известного, как коактиватор стероидного рецептора 1 (SRC1) [27]. При связывании рецептора с лигандом происходят

определенные изменения конформации, которые препятствуют связыванию с коактиватором или способствуют взаимодействию с корепрессором.

Концепцию селективных модуляторов эстрогенового рецептора, по видимому, можно обобщить в отношении других ядерных рецепторов. Возможно, для других членов суперсемейства ядерных рецепторов существуют лиганды, которые не являются только антагонистами, но также имеют ткане-селективное фармакологическое действие (агонисты в одних тканях, антагонисты в других и смешанного действия в третьих). В случае эстрогенового рецептора, было показано противоположное действие тамоксифена в тканях грудных желез (антагонист) и матки (агонист). Действие тамоксифена зависело от условий взаимодействия между ER $\alpha$  и специфическим ко-активатором SRC1, который присутствует в не значительно большем уровне в клетках матки, чем в клетках молочных желез [27].

Особое место в фармакологии ядерных рецепторов занимают так называемые «орфановые» рецепторы. «Орфановые» рецепторы определялись как рецепторы, не имеющие эндогенных лигандов. Они модулируют действие других ядерных рецепторов и, следовательно, могут изменять их фармакологическую активность. Эти рецепторы способны связываться с ксенобиотиками или эндогенными лигандами.

В некоторых случаях были найдены специфические лиганды для орфановых рецепторов. Первыми клонированными рецепторами (например, ER, GR и TR) являются рецепторы для гидрофобных гормонов, которые связываются с высокой аффинностью и специфичностью.

Большинство орфановых рецепторов, для которых были найдены лиганды (например, PXR PPAR, CAR и т.д.) связываются с этими молекулами с низкой аффинностью и широкой специфичностью. Для того чтобы различать их с классическими высоко-аффинными и специфичными рецепторами такими, как рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов, эти рецепторы называют (рассматривают как) сенсоры, т.к. их функция заключается в регуляции определенного физиологического состояния организма (например, количества жирных кислот или холестерина) и тонкой регуляции гомеостаза [5]. Изучение свойств ядерного рецептора PXR и подбор соответствующих лигандов позволит регулировать процессы метаболизма ксенобиотиков и взаимодействия лекарств.

### **Роль PXR в биотрансформации ксенобиотиков и регуляция его активности**

Ядерный прегнан X рецептор (PXR; NR1I2, также известный как SXR и PAR [10]) является членом семейства ядерных рецепторов – лиганд-зависимых факторов транскрипции и ключевым регулятором генов, вовлеченных в метаболизм ксенобиотиков и эндобиотиков. Считалось, что PXR выполняет функцию выявления эндогенных прегнанов [9], но в последствии его стали рассматривать как центральный рецептор ксенобиотиков, отвечающий на многие лекарственные вещества. PXR функционирует как гетеродимер с ретиновым X рецептором  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) и связывается с различными распознаваемыми элементами (прямыми повторами DR-3, DR-4, DR-5 и развернутыми наружу повторами ER-6, ER-8) в промоторных областях генов-мишеней. Его умеренная

основная активность и повышение регуляции транскрипции опосредуется подбором коактиваторов семейства p160, например, коактиватор стероидного рецептора (SRC). Подавление генной экспрессии включает физический контакт с корепрессорами транскрипции.

PXR рецептор экспрессируется преимущественно в печени и активируется разнообразными лигандами, которые способны индуцировать экспрессию генов CYP450, играющих ключевую роль в метаболизме лекарств [22]. К соединениям, индуцирующим CYP450 относятся фенobarбитал, рифампицин, дексаметазон, нифедипин, таксол, гиперфорин и другие. PXR регулирует активность генов I фазы метаболизма лекарств (CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9), карбоксиэстеразы, дегидрогеназы, а также ферментов, участвующих в образовании гема [22]. PXR является главным регулятором экспрессии CYP3A4, который метаболизирует более 50% лекарств. PXR также контролирует экспрессию генов фазы II метаболизма, кодирующих UDP-глюкуронозилтрансферазы и глутатион-S-трансферазы, а также белки III фазы выведения, такие как белок множественной устойчивости 1 к лекарствам и белок множественной устойчивости 2. Таким образом, PXR является важным и эффективным регулятором экспрессии генов участвующих во всех фазах метаболизма и экспрессии лекарств [1, 3, 12, 14].

PXR также активируется различными эндогенными лигандами, включая прегнаны, желчные кислоты, гормоны и витамины [9]. В ответ на желчные кислоты и окистеролы PXR регулирует экспрессию генов, участвующих в метаболизме и транспорте желчных кислот, включая CYP7A, Oatp2 и 3-гидрокси-3-

метилглутарилкофермент-А синтетазы. Эти данные и последующие исследования на животных моделях с холестатической болезнью печени установили, что PXR играет решающую роль в гомеостазе холестерина и защищает ткани от потенциально токсических эндобиотиков [30].

Подобно большинству членов суперсемейств ядерных рецепторов PXR содержит ДНК-связывающий участок (DBD) связанный через гибкий «шарнирный» участок с лиганд-связывающим доменом (LBD), который содержит область с функцией лиганд-зависимой активации (AF-2). ДНК-связывающие участки проявляют высокую консервативность у различных видов животных, более чем 90% сходства внутри DBD. Однако в отличие от большинства других ядерных рецепторов лиганд-связывающие участки LBD PXR различных видов значительно различаются. Например, изоформы PXR млекопитающих имеют менее 80% сходства последовательностей внутри LBD. Профиль активации PXR различными лигандами соответствует активации цитохромов CYP3A. При этом, чем ближе структурное сходство PXR разных видов, тем более сходен профиль активации различными лигандами рецепторов PXR и соответствующих цитохромов. Хотя каждый из этих PXR является «неразборчивым» в связывании с лигандами (отвечая на соединения различные по размеру, форме, химическому составу), PXR определенного вида животных является относительно специфическим [33].

### **Взаимодействие с другими ядерными рецепторами**

Функциональная активность PXR перекрывается с активностью CAR (конститу-

тивный андростановый рецептор) по связыванию с лигандами и активацией генов. PXR является центральным регулятором генов CYP3A [9], тогда как CAR взаимодействует с ДНК-элементами, расположенными на генах CYP2B [7]. В 2000 г. Moore с соавторами [20] показали, что оба рецептора могут быть активированы некоторыми одинаковыми ксенобиотиками и эндобиотиками, включая рифампицин и фенобарбитал. Затем было показано, что CAR и PXR имеют общие ДНК-связывающие участки, PXR может активировать экспрессию CYP2B генов, используя те же регуляторные элементы, что и CAR, и наоборот CAR, может регулировать CYP3A гены [34]. Таким образом, PXR и CAR работают согласованно, связываясь с одинаковыми лигандами и регуляторными элементами. Недавние исследования показали, что PXR, CAR и функционируют совместно, регулируя экспрессию различных генов – мишеней, играющих центральную роль в метаболизме лекарств и глюконеогенезе [11, 13, 16, 29].

PXR может также индуцировать недостаточность витамина D, метаболизма Ca и заболевания костей благодаря способности взаимодействовать с ДНК-элементами, которые связываются с рецептором витамина D. Рецептор витамина D (VDR) также является членом суперсемейства ядерных рецепторов. Связываясь с соответствующими распознаваемыми ДНК-элементами, он регулирует экспрессию генов-мишеней, которая приводит к различным физиологическим эффектам, включая метаболизм кальция, костный метаболизм, рост клеток, образование ренина и инсулина. В условиях избытка витамина D рецептор VDR индуцирует его разрушение, усиливая экспрессию соответствующе-

го цитохрома CYP24 [24]. Длительное использование противозепилептических препаратов и ряда лекарств, таких как, рифампицин, карбамазепин, глюкокортикоидов и противовирусных препаратов приводит к нарушению костной минерализации. Общим свойством этих препаратов является способность индуцировать цитохромы печени, связываясь с PXR как лиганды. PXR имеет 60% гомологии в аминокислотной последовательности ДНК-связывающего участка с ДНК-связывающим участком рецептора витамина D – VDR. Это позволяет PXR рецептору связываться с соответствующими генами-мишенями VDR, в том числе и CYP24, что приводит к разрушению витамина D. Кроме того, было показано, что лиганд-связывающие домены VDR и PXR имеют 37% идентичности и литохлевая кислота и ее производные являются активаторами как VDR так и PXR. Таким образом, активаторы PXR влияют на экспрессию CYP24, контролируемую VDR. Длительное применение ряда препаратов-лигандов PXR могут усиливать разрушение витамина D, приводя к его недостаточности и нарушению метаболизма в костной ткани.

### **Связывание с лигандами определяет структура PXR**

PXR у различных видов связываются с широким спектром эндогенных и экзогенных лигандов, различающихся по химическому строению. PXR активируется путем непосредственного связывания лигандов внутри лиганд-связывающей полости в рецепторе [10]. Агонисты PXR включают природные и синтетические стероиды, такие как 5 $\beta$ -прегнан-3,20 дион и эстрадиол и ксенобиотики, по-

добные холестерол понижающему препарату ловастатину и SR12813 [17], и противораковым лекарствам тамоксифену и таксолу, антибиотику рифампицину, и активному компоненту экстракта зверобоя – гиперфорину. Эти лиганды широко варьируют по форме, химическим свойствам и имеют массу от 250 до более 800 Da [22]. Ядерные рецепторы PXR имеют настолько широкий спектр связывания с лигандами, какого нет ни у одного другого ядерного рецептора [10]. Кристаллографическое изучение строения PXR выявило новый участок (вставку) в LBD наряду с большим и вместительным «карманом» для связывания [33]. Эти структуры позволяют объяснить как видоспецифичность, так и широкий спектр связывания рецепторов. В настоящее время определены кристаллические структуры LBD PXR в различных состояниях: не связанном (апо-) состоянии, в комплексе с активирующими лигандами и фрагментами корегуляторов транскрипции. Опубликованные данные включают LBD PXR, связанный с SR 12813, LBD PXR в присутствии и в отсутствие пептида коактиватора SRC-1, в комплексе с гиперфоринном и макролидным антибиотиком рифампицином [22]. Подобно другим ядерным рецепторам лиганд связывающий домен LBD PXR рецептора состоит из 12  $\alpha$ -спиралей, которые укладываются, образуя гидрофобный карман в структуре белка. Однако LBD PXR имеют несколько уникальных характеристик, которые отличают его от других членов суперсемейства ядерных рецепторов. Объем лиганд-связывающего кармана составляет более 1300  $\text{Å}^3$ , что значительно больше, чем лиганд-связывающие карманы других ядерных рецепторов. Большой объем достигается присутствием двух

дополнительных цепочек  $\beta$ -складчатого листа, которых нет у других ядерных рецепторов. Кроме того, LBD PXR имеет уникальную гладкую эллиптическую форму. Сочетание большого объема и гладкой формы, по-видимому, обеспечивает широкую субстратную специфичность PXR [24, 25].

Способность центральных областей LBD PXR изменять конформацию является определяющей для связывания с соединениями различного размера и формы. Недавние данные о строении PXR в комплексе с большим макролидным антибиотиком рифампицином показали важность этого свойства гибкости в связывании рецептора с лигандом. Когда в 2001 г. впервые сообщалось об апоструктуре LBD PXR, было показано, что рецептор-связывающий карман хотя и является большим, все же недостаточно велик для связывания PXR – агониста рифампицина [33]. Последующее изучение структуры комплекса PXR-рифампицин показало, что три области LBD изменяют свою упорядоченность, создавая пространство, необходимое для связывания с агонистом размером 823 Da. Это изменение конформации позволяет расширяться лиганд-связывающему карману от 1280  $\text{Å}^3$  по объему при образовании комплекса с SR12813 до более чем 1600  $\text{Å}^3$  в комплексах с другими соединениями [22].

Выделяют шесть аминокислотных остатков, которые постоянно вовлечены в связывание с лигандом во всех структурах LBD PXR, которые определены на сегодняшний день: три полярных остатка (Met243, Trp299, Phe420). Направленное (детерминированное) разнообразие в связывании, проявляемое различными видами PXR может быть частично обусловлено изменениями в этих аминокис-

лотных остатках, участвующих в связывании с лигандами. Например, остатки Gln285, His407 и Met243 не сохраняются в PXR мыши. Этот рецептор проявляет меньшую степень разнообразия в связывании и не проявляет или имеет минимальную активность в отношении SR12813, гиперфорина или рифампицина. Подобная тенденция наблюдается в отношении PXR рыбки *Danio rerio*. Анализ аминокислотных последовательностей PXR млекопитающих показывает, что наибольшее сходство обнаруживается между рецепторами человека и макаки-резус (96%). Проявляется консервативность тех же самых шести аминокислотных остатков и оба рецептора взаимодействуют практически с теми же самыми соединениями [21]. Движущей силой в формировании свойств PXR, по-видимому, являются различия в диете разных видов животных и человека. Желчные кислоты служат основными лигандами, обеспечивающими эволюцию PXR в сторону увеличения разнообразия связывания.

Были получены мутантные варианты с точечными мутациями PXR, в которых были заменены различные аминокислоты. Некоторые из этих мутаций приводят к повышению основного уровня активации [22] рецепторов, что приводит к стабилизации связывания с коактиватором и увеличению основной транскрипционной активности. В других случаях структурные изменения в результате мутаций нарушали связывание рецептора с корепрессором или усиливали связь с коактиватором. Напротив, некоторые мутации повышали связывание с корепрессором или снижали связывание с коактиватором, приводя к частичной или полной потере основной (базовой)

активности. Наряду с получением мутантных вариантов PXR, к настоящему времени для PXR человека выявлено 55 аллельных вариантов и три основных варианта, возникающих при альтернативном сплайсинге [24]. Принимая во внимание различные уровни экспрессии всех этих изоформ PXR, а также их различный транскрипционный потенциал можно ожидать огромного разнообразия уровня экспрессии генов-мишеней и соответствующих индивидуальных различий активации генов биотрансформации ксенобиотиков.

### Гетеродимеризация с RXR

Подобно многим другим ядерным рецепторам PXR контролирует транскрипцию в качестве гетеродимера с ретиноидным X рецептором RXR $\alpha$ , что так же может служить дополнительным уровнем регуляции. PXR связывается, по меньшей мере, с четырьмя различными элементами ДНК включая как прямые, так и инвертированные повторы. Некоторые другие рецепторы, которые образуют гетеродимеры с RXR $\alpha$ , также используют как прямые DR, так и развернутые (ER – everted repeat) ДНК – элементы. К ним относятся CAR, рецептор витамина D, рецептор тиреоидного гормона [2].

Ретиноидный X рецептор (RXR), который так же является членом суперсемейства ядерных рецепторов, служит общим партнером при образовании гетеродимеров с группой других ядерных рецепторов. Гетеродимеры связываются с ДНК-элементами целевых генов и активируют их экспрессию [19]. Многочисленные исследования последних лет выявили центральную роль этих гетеродимеров как сенсоров различных экзо-

эндогенных липидов. Партнерами RXR рецептора могут служить такие ядерные рецепторы как RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , VDR-рецептор витамина D, TR $\alpha$  и TR $\beta$  (рецепторы тиреоидных гормонов), PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , а также рецепторы ксенобиотиков CAR и PXR. Лекарственные средства, которые взаимодействуют с RXR и его партнерами используются для лечения рака, дерматологических болезней, нарушений эндокринной системы и в лечении метаболического синдрома

Ядерные рецепторы, которые взаимодействуют с RXR, образуя гетеродимеры, могут быть функционально разделены на пермиссивные и непермиссивные. Гетеродимеры образуемые RXR и пермиссивными рецепторами (например, PPAR, LXR, FXR) могут активироваться агонистами, действующими как на RXR так и на рецептор-партнер [28]. Например, RXR-PPAR гетеродимер может активироваться агонистами RXR и PPAR независимо или совместно, вызывая синергическую активацию. Напротив, гетеродимеры RXR, которые содержат непермиссивные партнеры (например, рецептор витамина D и рецептор тиреоидного гормона) могут активироваться только агонистами рецептора-партнера, но не агонистами RXR. Пермиссивные партнеры служат рецепторами для липидов, поступающих с пищей, и могут активировать RXR для установления постоянного уровня экспрессии ферментов метаболизма и транспортеров. Непермиссивные партнеры функционируют, прежде всего, как рецепторы гормонов и могут ингибировать активацию RXR, для того чтобы взять соответствующие целевые гены под строгий гормональный контроль. В этом случае небольшое изменение концентрации гормона су-

щественно изменит уровень экспрессии целевого гена, что необходимо в физиологии эндокринной системы.

Способность агонистов RXR регулировать целевые гены многих перmissивных партнеров позволяет предположить, что *in vivo* такие соединения могут иметь фармакологическое применение как общие агонисты нескольких важных путей метаболизма [17]. Делеция RXR у мышей в печени приводит к нарушениям путей метаболизма, регулируемых гетеродимерами RXR, что указывает на центральную плейотропную роль RXR [32].

Лигандом RXR рецептора являются 9-цис ретиновая кислота (селективные лиганды RXR называют «рексиноиды» – *retinoids*). Возможность моделирования активности RXR гетеродимеров с помощью этих соединений является очень перспективной. Например, действуя на PPAR $\gamma$  – RXR гетеродимер рексиноиды повышали чувствительность к инсулину на модельных объектах у грызунов при инсулиннезависимом диабете [5]. Исходный рексиноид бексаротен (LGD 1069) давал значительные побочные дефекты, но недавно синтезированные рексиноиды повышали чувствительность к инсулину и имели значительно меньше побочных эффектов

Наряду с ретиноидами, рексиноиды также проявляют противораковую активность. Они могут использоваться либо отдельно, как при лечении кожной Т-клеточной лимфомы [5], и как общие агонисты RAR-RXR комплекса алитретиноин (9-цис ретиновая кислота) для лечения саркомы Капоши. Обсуждается роль ретиноидов и рексиноидов как кандидатов для предупреждения различных видов рака.

## Заключение

Ядерный прегнан X рецептор RXR является ключевым рецептором ксенобиотиков, отвечающим на многие лекарственные вещества. Этот лиганд-регулируемый транскрипционный фактор регулирует экспрессию ферментов и белков-транспортёров разных фаз биотрансформации ксенобиотиков. Взаимодействие с лигандами агонистами или антагонистами позволит регулировать экспрессию соответствующих генов-мишеней. Изучение ядерных рецепторов раскрывает молекулярные и физиологические основы для разработки нового класса фармакофоров, и позволяет предвидеть нежелательные вредные эффекты взаимодействия лекарств. Для этой цели используются различные подходы, включая скрининг химических соединений, изучение структуры лиганда и рецептора, исследования путей регуляции активности ядерных рецепторов, создание каталога ядерных рецепторов их экспрессии и функционирования (Nuclear Receptor Signaling Atlas – [www.nurse.org](http://www.nurse.org)).

## Литература

1. *Barwick J.L., Quattrochi L.C., Mills A.S. et al.* Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes // *Mol. Pharmacol.*, 50:10-16, 1996.
2. *Drocourt L., Ourlin J.C., Pascussi J.M. et al.* Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes // *J. Biol Chem.*, 277:25125-25132, 2002.
3. *Glass C.K.* Differential recognition of target genes by nuclear receptor

monomers, dimers, and heterodimers // *Endocrinol. Rev.*, 15: 391, 407, 1994.

4. *Greschic H., Moras D.* Structure – activity relationship of nuclear receptor – ligand interactions // *Curr. Top. Med. Chem.*, 3:1573-1599, 2003.

5. *Gronemeyer H., Gustaffson J. A., Laudet V.* Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily // *Nature Rev. Drug Discovery*, 3: 950-964, 2004.

6. *Hermanson O., Glass C.K., Rosenfeld M.G.* Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification // *Trends Endocrinol Metab.*, 13:55-60, 2002.

7. *Honkakoski P., Negishi M.* Characterization of a Phenobarbital-responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene // *J. Biol. Chem.*, 272:14943-14949, 1997.

8. *Jordan V.C.* Antioestrogens and selective oestrogen receptor modulators as multifunctional medicines. Clinical considerations and new agents // *J. Med. Chem.*, 46 1081-1111, 2003.

9. *Kliwer S.A., Moore J.T., Wade L. et al.* An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway // *Cell* 92:73-82, 1998.

10. *Kliwer S.A., Goodwin B., Wilson T.M.* The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism // *Endocr. Rev.*, 23:687-702, 2002.

11. *Kliwer S.A.* The nuclear pregnane receptor regulates xenobiotic detoxification // *J. Nutr.* 133: 2444-2447, 2003.

12. *Kocarek T.A., Schuetz E.G., Guzelian P.S.* Differentiated induction of cytochrome P450b/e and P450p mRNAs by dose of Phenobarbital in primary cultures of adult rat hepatocytes // *Mol. Pharmacol.*, 38:440-444, 1990.

13. *Kodama S., Koike C., Negishi M., Yamamoto Y.* Nuclear receptors Car and PXR cross talk with FOXO1 to regulate

genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes // *Mol. Cell Biol.*, 24:7931-7940, 2004.

14. *Kushner P.J. et. Al.* Estrogen receptor pathways to AP-1 // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 74, 311-317, 2000.

15. *Krasowski M.D., Yasuda K., Hagey L.R. et al.* Evolution of the pregnane X receptor: adaptation to cross – species differences in biliary bile salts // *Mol. Endocrinol.*, 19 : 1720-1739, 2005.

16. *Lee C.H., Olson P., Evans R.M.* Lipid Metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors // *Endocrinology*, 144, 2201-2207, 2003.

17. *Lehmann J.M., Mckee D.D., Watson M.A. et al.* The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions // *J. Clin. Unvest.*, 102:1016-1023, 1998.

18. *Liu M.M. et. al.* Opposing action of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  on cyclin D1 gene expression // *J. Biol. Chem.*, 277, 24353-24360, 2000.

19. *Mangelsdorf D.G., Evans R.M.* The RXR heterodimers and orphan receptors // *Cell*, 83:841-850, 1995.

20. *Moore L.B., Parks D.J., Jones S.A. et al.* Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands // *J. Biol. Chem.*, 275:15122-15127, 2000.

21. *Moore L.B., Maglich J.M., McKee D.D. et al.* Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors // *Mol. Endocrinol.*, 16:977-986, 2002.

22. *Orans J., Teotico D.J., Redinbo M.R.* The nuclear xenobiotic receptor Pregnane X Receptor: recent insights and

new challenges // *Mol. Endocrinol.*, 19: 2891-2900, 2005.

23. *Repa J.J., Turley S.D., Lobaccaro J.A., et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers // *Science*, 289:1524-1529, 2000.

24. *Saradhi M., Kumar N., Reddy R.C., Tyagi R.K.* Pregnane and xenobiotic receptor (PXR): a promiscuous xenosensor in human health and disease // *J.E.R.*, 10 (1): 1-12, 2006.

25. *Savas U., Wester M.R., Griffin K.J., Johnson E.F.* Rabbit pregnane X receptor is activated by rifampicin // *Drug Metab. Dispos.*, 28:529-537, 2000.

26. *Shang Y., Hu X., Di Renzo J. et al.* Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription // *Cell*, 103, 843-852, 2000.

27. *Shang Y., Brown, M.* Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs // *Science*, 295, 2465-2468, 2002.

28. *Shulman A.I., Mangelsdorf D.J.* Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome // *N. Engl. J. Med.*, 353:604-615, 2005.

29. *Staudinger J., Liu Y., Madan A. et al.*

Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor // *Drug Metab. Dispos.*, 29:3369-3374, 2001.

30. *Sonoda J., Chong L.W., Downes M. et al.* Pregnane X receptor prevents hepatorenal toxicity from cholesterol metabolites // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:2198-2203, 2005.

31. *Synold T.W., Dussault I., Forman B.M.* The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux // *Nat. Med.*, 7:584-590, 2001.

32. *Wan Y.J., An D., Cai Y. et al.* Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver // *Mol. Cell Biol.*, 20:4436-44, 2000.

33. *Watkins R.E., Wisely G.B., Moore L.B. et al.* The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity // *Science*, 292:2329-2333, 2001.

34. *Xie W., Barwick J.L., Simon C.M. et al.* Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR // *Genes Dev.*, 14:3014-3023, 2000.

## MODELING OF NUCLEAR RECEPTORS ACTIONS AND DRUG INTERACTION BIOTRANSFORMATION

**S.N.Larina, N.V.Tchebyshev, E.V.Shikh, V.N.Karkischenko**

*Moscow Sechenov Medical Academy,  
Research Centre for Biomedical Technologies RAMS, Moscow*

Nuclear receptors are transcription factors that are essential in embryonic development, cellular differentiation, metabolism. Ligand-regulated nuclear PXR receptor responds to diverse array of chemically distinct ligands, xenobiotics, clinical drugs and regulates the expression of genes involved in xenobiotic and drug metabolism. The structural basis of this receptor allows to interact to variety of ligands which are agonists or antagonists. Nuclear receptors researches are important to metabolism regulating drug development and drug interaction studying.

**Key words:** nuclear receptors, PXR receptor, xenobiotic biotransformation, CYP3A4 cytochrome.



## Влияние неингаляционных препаратов для общей анестезии, их сочетаний и схем применения на макак резусах

**А.О.Ревякин, Н.В.Касинская, Л.Н.Зобова**

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва*

Выполнение острых опытов на обезьянах (взятие костного мозга, полостные операции, вживление электродов) возможно только при общем глубоком наркозе. Поэтому подбор оптимальных наркотизирующих препаратов и их комбинаций, с учетом силы и времени действия, а так же безопасности для организма, является ключевым моментом в проведении успешного эксперимента.

**Ключевые слова:** макаки резус, наркоз, золетил, ксилазин, домитор, буторфанол, пропофол, антиседан.

В настоящее время не создано методов полностью заменяющих животных при проведении различных экспериментов. По поведению и выражению эмоций приматы наиболее близки к человеку, чем какие-либо другие животные. Они имеют сложную организацию, схожую с человеком. В силу этого целый ряд экспериментов проводят на приматах. Выполнение острых опытов на обезьянах (взятие костного мозга, полостные операции, вживление электродов) возможно только при общем глубоком наркозе. Главная цель наркоза – подавление реакций организма на оперативное вмешательство, прежде всего ощущения боли. При этом медикаментозный сон, является лишь одним компонентом наркоза. При проведении наркоза также важно подавление или значительное снижение выраженности вегетативных реакций организма на хирургическую травму, которые проявляются увеличением частоты сердечных

сокращений (тахикардия), повышением артериального давления (артериальная гипертензия) и другими явлениями, которые могут иметь место даже при выключенном сознании. Еще один компонент наркоза – миорелаксация, или расслабление мышц, необходимое для обеспечения нормальных условий для работы хирургов.

**Цель исследования:** оценка влияния препаратов zoletil, xylazine, домитор, буторфанол, пропофол при разных схемах введения на макак резусов.

### Материалы и методы исследования

Эксперимент проводился в НЦБМТ РАМН на 5 взрослых самцах макак резус массой 10 кг. Содержание животных – в индивидуальных клетках, кормление согласно нормативам для лабораторных животных, поение – свободный доступ к воде, зоогигиенические показатели – в

пределах нормы. Во время эксперимента фиксировалось время ведения препарата, место введения, время начала действия наркоза и время выхода животного из наркоза (восстановление рефлексов). В постнаркозном периоде оценивалось общее физиологическое и эмоциональное состояние животных. Все препараты кроме пропофола вводились в бедренную мышцу, пропофол – внутривенно.

Для наркоза использовали следующие препараты. **Zoletil** – препарат для общей анестезии, содержащий в качестве действующих веществ тилетамина гидрохлорид и золазепам гидрохлорид. Тилетамин не подавляет глоточный, гортанный, кашлевой рефлексы, не угнетает дыхательную систему. Золазепам угнетает подкорковые области мозга, вызывая анксиолитическое и седативное действия, расслабляет поперечно-полосатую мускулатуру. Золазепам усиливает анестетическое действие тилетамина. Он также предотвращает судороги, вызванные тилетаминем, улучшает мышечную релаксацию и ускоряет восстановление после наркоза. **Zoletil** – это современный, комбинированный препарат, для общей анестезии животных нового поколения, производства компании «Virbac» Франция. Он, как и кетамин, относится к группе диссоциативных анестетиков, но в отличие от последнего, «**Zoletil**» это последнее поколение диссоциативов, он разрешен к применению на территории Российской Федерации.

**Xylazine** – антагонист альфа<sub>2</sub>-адренорецепторов. Является сильнодействующим агонистом альфа<sub>2</sub>-адренорецепторов, относится к седативным анальгетическим препаратам с релаксирующим действием на мышцы. Обладает потенциальным анальгетическим эффектом, за кото-

рым следует доминантный седативный эффект. В зависимости от дозы он вызывает угнетение ЦНС, снижает двигательную активность и часто, в первые несколько минут, наблюдается атаксия. Разные виды животных по-разному чувствительны к ксилазину. Препарат обладает успокаивающим, болеутоляющим, анестезирующим и миорелаксационным действием. Применяется как успокаивающее, в соединении с другими веществами используется для анестезии, аналгезии и миорелаксации.

**Домитор** – действующее вещество медетомидин. Медетомидин- $\alpha$ -2-агонист, основной эффект которого заключается в торможении передачи нервных импульсов в адренергических синапсах за счет конкуренции с норадреналином. Под действием препарата у животных наблюдается угнетение ЦНС и повышение болевого порога. Домитор применяют для получения седативного эффекта и аналгезии собак и кошек при хирургических операциях и различных клинических исследованиях, а также для предупреждения агрессивности животных. Рекомендуются также использовать перед проведением инъекционного и (или) ингаляционного наркоза.

**Буторфанол** относится к группе агонистов-антагонистов опиатных рецепторов, преимущественно возбуждает каппа- и сигмаподтипы опиоидных рецепторов. По воздействию на рецепторы препарат близок к пентазоцину. По силе действия, скорости наступления эффекта и длительности действия близок к морфину, но эффективен в меньших дозах, чем морфин. По сравнению с морфином обладает меньшей способностью вызывать физическую зависимость.

**Пропофол** – средство для неингаляционного наркоза. При в/в введении со-

Таблица

## Влияние различных видов наркоза на макак резусов

Вид наркоза	Описание и время начала действия наркоза	Продолжительность действия
Комбинация: zoletil 100 – 0,4 мл + xylazine – 0,4 мл; антиседан – 0,2 мл	Через 10 мин животное в глубоком наркозе. Через 15 мин после погружения животного в глубокий наркоз вводили антиседан. Через 30 мин животное начинает выходить из наркоза.	Более 15 мин (регулируется антиседаном)
Комбинация: zoletil 100 – 0,4 мл + xylazine – 0,4 мл	Через 10 мин животное в глубоком наркозе	190 мин
Комбинация: домитор – 0,2 мл + буторфанол – 0,1 мл; антиседан – 0,3 мл	После введения первой дозы комбинированного наркоза через 10 минут не наблюдали его действия. Добавляли еще 2 дозы с интервалом в 10 минут. Через 5 минут после последней дозы засыпает. Некоторые рефлексы сохраняются, наркоз неглубокий. Через 10 минут ввели антиседан.	До 10 мин.
Комбинация: домитор – 0,6 мл + буторфанол – 0,3 мл	Через 10 минут животное засыпает, но часть рефлексов сохраняется.	До 50 мин.
Комбинация: домитор – 1,0 мл; через 20 мин пропофол – 9,0 мл; через 40 мин антиседан – 0,3 мл	После введения домитора, животное успокаивалось, через 20 минут внутривенно вводили пропофол. Животное засыпает в течение 30 сек. Через 10 минут после введения антиседана, наркозный эффект проходит.	До 30 мин.

стояние наркоза наступает примерно в течение 30 сек, без выраженных признаков возбуждения. После введения пропофол распределяется по тканям организма, подвергается биотрансформации преимущественно в печени с образованием неактивных конъюгатов. Возникновение наркоза под влиянием пропофола, по-видимому, обусловлено неспецифическим влиянием на липиды мембран нейронов ЦНС, в результате чего нарушается работа ионных каналов, в частности натриевых. Кроме того, показано, что под влиянием про-

пофола усиливаются ГАВА-ергические процессы в мозге. Пропофол практически не обладает анальгезирующим действием. Восстановление функций после прекращения действия пропофола происходит быстро.

#### Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные исследования показывают разные действия (по качеству и времени действия на организм) комби-

наций наркотизирующих препаратов на макак резусах. Так, было установлено, что для серьезных манипуляций (полостные операции и т.п.) лучше использовать комбинацию *zoletil 100* – 0,4 мл + *xylozine* – 0,4 мл. При данной комбинации у обезьян отсутствуют рефлексы, в том числе болевые, мышцы расслаблены, животное находится в глубоком наркозе. По окончании операции при необходимости более быстрого выведения из наркоза можно ввести антиседан (табл.).

**Комбинация домитор (0,6 мл) + буторфанол (0,3 мл)** дает менее сильный эффект. Часть рефлексов сохраняется, животное находится в состоянии поверхностного наркоза (сохранение умеренного роговичного рефлекса и реакции зрачка на свет, слезотечение, расслабление мышц). При такой комбинации наркоза можно производить манипуляции не причиняющие животному сильной боли. Введение антиседана так же ускоряет выведение из наркозного состояния.

В последней комбинации после премедикации домитором внутривенно вводили пропофол. Животное засыпало почти

мгновенно. Наркоз глубокий. Можно проводить любые манипуляции но кратковременные, т.к. наркоз действует не долго. Антиседан и в данном случае ускоряет время выведения животного из наркоза.

При использовании всех изученных комбинаций в постнаркозном периоде у животных не наблюдалось каких-либо физиологических отклонений. После стабилизации координации движений, к животным возвращался аппетит. Явных расстройств желудочно-кишечного тракта выявлено не было. Поведение адекватное для данного вида обезьян.

### Выводы

1. Исследуемые виды наркоза и их комбинации животные переносят хорошо, без каких либо последствий.

2. Определены комбинации для получения длительного и короткого наркозного состояния.

3. Антиседан во всех случаях ускоряет выведение животного из наркоза.

4. Побочных действий препаратов в данной дозировке и комбинации выявлено не было.

## INFLUENCE OF NOT INHALATION PREPARATIONS FOR THE GENERAL ANAESTHESIA, THEIR COMBINATIONS AND APPLICATION SCHEMES ON *MACACUS MULATTA*

A.O.Revyakin, N.V.Kasinskaya, L.N.Zobova

Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Institute of medical and biologic problems of RAS, Moscow

Performance of sharp experiences on *Macacus mulatta* (a capture of a bone brain, abdominal and thorax operations, implantation of electrodes) is possible only at the general deep narcosis. Therefore selection optimum narcotization and combinations of drugs, in view of force and time of action and as safety for an organism, is the key moment in carrying out of successful experiment.

**Key words:** *Macacus mulatta*, narcosis, zoletil, ksilazin, domitor, butorfanol, propofol, antisedan.

# Лабораторкорм

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

## Реализуем:

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



**НАШИ КОРМА**  
полнорационные,  
сбалансированные по  
аминокислотному составу,  
минералами и витаминами

**Доставка в любой регион России**

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

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 648-42-39;  
Телефон/факс: (499) 612-99-09;  
[www.laboratorkorm.ru](http://www.laboratorkorm.ru); e-mail: [info@laboratorkorm.ru](mailto:info@laboratorkorm.ru)



Коллектив НЦБМТ РАМН  
поздравляет сотрудника нашего Центра  
**КАРКИЩЕНКО**  
**ВЛАДИСЛАВА НИКОЛАЕВИЧА**  
с присвоением звания профессора  
по специальности.

Полнотекстовую электронную версию научного журнала  
«Биомедицина» можно найти на сайте Научного центра  
биомедицинских технологий РАМН: [www.scbmt.ru](http://www.scbmt.ru)

С 2010 года объявлена подписка на научный журнал  
«Биомедицина». Подписной индекс в общероссийском каталоге  
«Роспечать. Издания органов НТИ» – 57995