

Научный журнал.

Основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН

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

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

Редакционный совет:

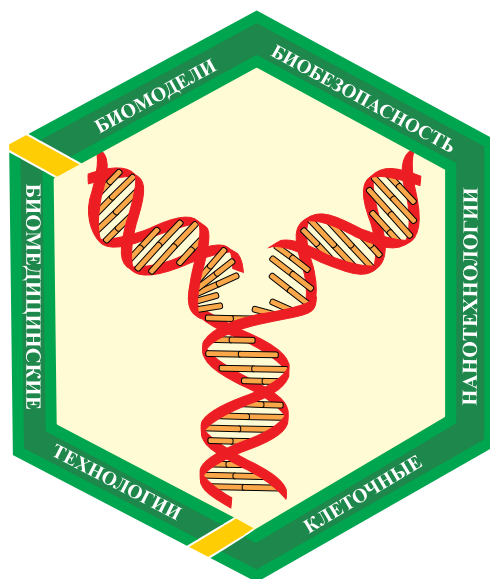
член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, prof. Iorgen Backmen (Германия), акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А. М. Дыгай, prof. Moineao S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С. И. Колесников, акад. РАМН А. А. Кубатиев, акад. РАМН В. Г. Кукес, акад.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

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

Адрес редакции:

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

Отпечатано в типографии «Лин-Интер»
127591, Москва, ул. Дубнинская, д. 83а
Подписано в печать 14.02.2011 г.
Тираж 3 000 экз.



Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н.Каркищенко, Д.Б.Чайванов, А.А.Вартанов

Об эффективности и безопасности ультразвуковой транскраниальной стимуляции головного мозга человека 4

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

Озеров М.Ю., Попов В.Г., Каркищенко Н.Н., Попов Д.В., Пчелинцев С.Ю., Каркищенко В.Н.

Активация рецепторов прорастания спор *B.anthraxis spore germinants* 18

Р.К. Чайлахян, В.И. Юсупов, Ю.В. Герасимов, П.А. Соболев, А.Х. Тамбиев, Н.Н. Воробьёва, А.П. Свиридов, В.Н. Баграташвили

Влияние лазерных и КВЧ-воздействий на пролиферативную активность стволовых клеток стромы костного мозга *in vitro* 24

Н.В.Касинская, О.И.Степанова Н.Н.Каркищенко, В.Н.Каркищенко, Х.Х.Семенов, Т.Б.Бескова, Г.Д.Капанадзе, А.О.Ревякин, С.Е.Деньгина

Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга 30

Шохин И.Е., Раменская Г.В.

Методы прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ с применением компьютерного моделирования 35

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Онищенко Н.А., Баранова О.В.

Временные показатели коррекции клетками костного мозга состояния мышей

C57BL/KsYJLepr^{db}/+ 41

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Х.Х.Семенов, Н.Н.Каркищенко, Е.Л.Матвеевко

Новые оппозитные линии крыс как биомодель индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии 46

БИОФАРМАЦИЯ

Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко, Ю.И. Кулинич, К.С. Давыдова

Биофармацевтическая модель оценки взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС по их метаболизму и элиминации (BDDCS) 50

СПОРТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

Алфимов М.Н., Абрамова Т.Ф., Арьков В.В., Никитина Т.М.

Компенсаторные механизмы нервно-мышечного дисбаланса у спортсменов высокой квалификации 58

С.Д. Руненко, Е.Е. Ачкасов, Н. Самамикоджеди, Н.Н. Каркищенко, Е.А.Таламбум, О.А. Султанова, Т.В. Красавина, Е.Н. Кекк

Использование современных аппаратно-программных комплексов для изучения особенностей адаптации организма к физическим нагрузкам65

ПРАКТИКУМ

Власов А.М., Башкатова Ю.Н., Савченко А.Ю., Хаитов М.Р., Раменская Г.В.

Определение перхлорона в плазме крови с использованием ВЭЖХ масс-спектрометрическим детектированием.....73

Самотруева М.А., Теплый Д.Л., Сережникова Т.К., Кулешевская Н.Р.

Способ моделирования синдрома хронической усталости в эксперименте.....78

Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н.

IN VIVO модели для изучения анальгетической активности.84

Ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование».....95





Об эффективности и безопасности ультразвуковой транскраниальной стимуляции головного мозга человека

Н.Н.Каркищенко¹, Д.Б.Чайванов², А.А.Вартанов²

¹ — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

² — Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович chaivanov@yandex.ru

В работе проведен анализ возможности применения фокусированного ультразвука для транскраниальной модуляции функционального состояния зон головного мозга человека в контексте психотерапии и экспериментальной физиологии нервной системы. Обсуждаются методы генерации ультразвука, возможности транскраниальной фокусировки ультразвука с помощью фазированных решеток на зонах мозга, механизмы и безопасность воздействия.

Ключевые слова: ультразвуковая транскраниальная нейростимуляция, ультразвуковая транскраниальная нейромодуляция, транскраниальный ультрафонофорез, ультразвуковая фазированная решетка.

В работе проведен анализ возможности применения фокусированного ультразвука для транскраниальной модуляции функционального состояния зон головного мозга человека в контексте психотерапии и экспериментальной физиологии нервной системы. Обсуждаются методы генерации ультразвука, возможности транскраниальной фокусировки ультразвука с помощью фазированных решеток на зонах мозга, механизмы и безопасность воздействия.

Ключевые слова: ультразвуковая транскраниальная нейростимуляция, ультразвуковая транскраниальная нейромодуляция, транскраниальный ультрафонофорез, ультразвуковая фазированная решетка.

Предпосылки ультразвуковой транскраниальной стимуляции

Методы ультразвуковых исследований широко используются в биологии и медицине. Ультразвук вызывает разнообразные и мощные биологические эффекты. Это проявляется в виде механических, тепловых и физико-химических явлений. Активизация обменных процессов в органах и тканях, улучшение кровоснабжения достигается при интенсивностях ультразвука до 1-2 Вт/см². Более высокие интенсивности вызывают разрушение белков, гликолипопротеидов и других биологических веществ. Этот феномен используется в хирургической практике.

В наших предыдущих работах подтверждены данные о наличии ультразвуковых сигналов, издаваемых не только мелкими грызунами. Впервые показано, что ультразвуковая вокализация в диапазоне 20-100 кГц свойственна и более высокоорганизованным животным (кролики, мини-свиньи, обезьяны), а также человеку [5]. В предыдущих публикациях [5, 7] подробно освещены вопросы способности генерации ультразвуковых сигналов, показаны сходства и различия информативных параметров животных и человека, позволяющие использовать их как новый инструмент оценки различных психоэмоциональных состояний, стрессорных воздействий и эффектов влияния лекарственных средств.

Нами и другими авторами [5, 18, 23] установлено, что в диапазоне ультразвуковых откликов животные общаются и «сообщают» друг другу о наличии угроз, опасности, дискомфортных состояниях, стресс-воздействиях и т.д. Иными словами в ультразвуковом диапазоне у живых организмов существует механизм передачи и приема жизненно важной информации. Коль скоро ультразвук, генерируемый животными и человеком, проникает в окружающую среду и воспринимается другими особями, можно с высокой долей достоверности говорить о возможности создания технических систем или устройств, генерирующих сигнала

лы в ультразвуковом диапазоне, для воздействия на головной мозг и его исполнительные органы. Ранее нами [5] впервые были зарегистрированы феномены ультразвуковой вокализации у людей и определены их информативные параметры (рис. 1). Для сопоставимости полученных данных результаты были пронормированы и представлены на рисунке 1 в графическом виде, отражающем первый квартиль (25 процентиль), который определяет границу, под которой расположены 25% всех значений в группе данных, а также третий квартиль (75 процентиль), в свою очередь, определяющий границу, над которой расположены 25% всех значений в группе данных.

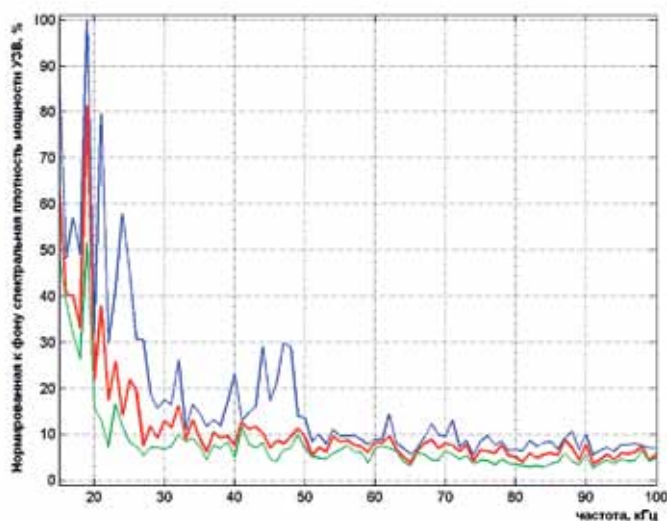


Рис. 1. Диапазоны ультразвуковой вокализации человека (по [5]). По оси абсцисс — частота в кГц. Красная линия — медиана по выборке (N=4, 2-й квартиль). Зеленая линия — 1-й квартиль, 25-й процентиль, синяя линия — 3-й квартиль, 75-й процентиль. По оси ординат — нормированное на фон окружающей среды изменение спектральной плотности мощности ультразвука, выраженное в процентах от максимального изменения.

Место ультразвуковой стимуляции среди других методов

Изучение мозга человека, в отличие от экспериментальных исследований на животных, имеет ряд существенных ограничений. При этом в большинстве своем методы, применяемые в экспериментальной физиологии нервной системы, являются принципиально неприемлемыми при исследовании мозга человека. Отсутствие в ряде случаев возможности использования инвазивных методов исследования, невозможность нанесения дозированных и локальных травматических повреждений ограничивают возможности клинической нейрофизиологии.

В настоящее время одними из наиболее распространенных способов направленной коррекции структурно-функциональной организации мозга человека остаются стереотаксическая нейрохирургия и приемы импульсной стимуляции с помощью долгосрочных вживленных электродов [9]. Понятно, что по этическим соображениям, подобные методы также неприменимы в психологических и клинических экспериментах. Это заставляет искать новые пути, в частности, ультразвуковую транскраниальную стимуляцию головного мозга.

Известными альтернативными ультразвуку методами стимуляции головного мозга являются: магнитная и электрическая транскраниальная стимуляция. Эти методы на сегодняшний день не могут обеспечить точечной локализации воздействия. Так при электрической стимуляции в силу высокой проводимости скальпа и низкой проводимости черепа при близком расположении электродов (менее 5-10 сантиметров) электрический ток протекает в основном по скальпу, не стимулируя головной мозг. В слу-

чае большого расстояния между электродами нельзя обеспечить локальности воздействия [9]. Также не удается сконструировать индуктор магнитного поля, обеспечивающий точечную стимуляцию магнитным полем высокой интенсивности [9].

По-видимому, только фокусированный ультразвук может оказывать локализованное воздействие на подкорковые структуры. Для обоснования такого утверждения необходимо показать:

- 1) Возможность создания локализованного ультразвукового пятна в подкорковых структурах.
- 2) Возможные механизмы высокоэффективного психотропного действия ультразвука.
- 3) Безопасность (обратимость) ультразвукового воздействия.

Анализ возможности создания локализованного ультразвукового пятна в подкорковых структурах

Физическое воздействие ультразвука на мозг человека рассматривалось, прежде всего, для задачи лечения опухолей [15], направленной лекарственной терапии [20], уничтожения тромбов [10], ультразвукового сканирования мозга [11, 14, 17, 22, 29].

Фокусирование ультразвука может быть достигнуто несколькими способами. Самый простой из них — использование преобразователя, излучающая поверхность которого по форме представляет собой вогнутую сферическую оболочку, изготовленную из пьезоэлектрического материала. Фокус такого излучателя лежит на его оси и располагается вблизи центра кривизны оболочки. Фокальная область по форме представляет собой эллипсоид вращения, вытянутый

вдоль оси акустического пучка. Распределение давления вблизи фокуса имеет вид $2J_1(x)/x$, а ширина фокального пятна D равна:

$$D=1,22(\lambda A/a),$$

где:

A — фокусное расстояние,

a — радиус излучателя,

λ — длина волны в ткани.

Для среды без поглощения теория дифракции предсказывает, что только 84% энергии излучателя проходит через фокальную область. Однако в ткани всегда имеется поглощение, а значит эта доля становится еще меньше. Именно в силу сильного поглощения резко ограничивается использование ультразвука с частотой превышающей несколько мегагерц. Обычно удается получить фокальные области с размерами 2-4 мм в ширину и 5-6 мм в длину [1, 8].

Хотя таким способом удается воздействовать на области с четко очерченными границами, регулировать глубину зоны воздействия в этом случае оказывается непросто. Используя плоский излучатель совместно с различными акустическими линзами, можно добиться изменения глубины области воздействия. Так как акустические линзы обычно делаются из материала, имеющего скорость звука больше, чем в воде, то для создания сходящегося пучка линзы необходимо изготавливать вогнутыми. Главное ограничение при использовании набора из таких линз накладывает поглощение ультразвука в материале самих линз. Оптимальная передача энергии осуществляется в том случае, когда линза и излучатель разделены четвертьволновым согласующим слоем. Появление технологии фазированных решеток в различных

применениях мощного ультразвука привело к разработке преобразователей, которые позволяли электронным образом сканировать ультразвуковой пучок и таким образом воздействовать («закрашивать») на большие, в сравнении с локализованной фокальной областью, объемы ткани [8, 9].

Однако для успешной фокусировки ультразвука необходимо несколько источников. Причина в том, что при фокусировке с одного сферического излучателя произошло бы чрезмерное повышение температуры тканей мозга, прилегающих к черепу, вследствие большого поглощения на границах сред. Чтобы избежать «теплого ожога» необходимо использовать несколько излучателей меньшей мощности.

Череп человека является существенной преградой для ультразвука. Являясь сложной двухфазной структурой неправильной формы, кость черепа отражает, рассеивает и поглощает ультразвук. Первые попытки создания ультразвуковых разрушений в тканях мозга были неудачными, из-за того, что облучение проводилось непосредственно через кости черепа. Хотя в мозге и были замечены небольшие разрушения, значительно более сильные повреждения были обнаружены в коже головы. Преобразование мод колебаний и значительное поглощение ультразвука обуславливают весьма высокое затухание ультразвука в костях черепа.

Локальные очаги разрушения в глубоких тканях мозга удалось создать, лишь, когда в черепе было сделано трепанационное отверстие. Необходимость удалять часть черепа, а также сложность наведения фокуса на требуемый участок мозга ограничивали практическое использование этого подхода. Однако разработанные методы коррекции фаз на элементах

фазированной решетки могут позволить устранить фазовые аберрации после прохождения ультразвука через кости черепа и, тем самым, восстановить хорошее качество фокусировки. Такая возможность была продемонстрирована экспериментально с использованием больших по площади полусферических фазированных решеток. Уже к началу 80-х годов прошлого века советским ученым удалось создать экспериментальную аппаратуру, позволяющую фокусировать ультразвук за костью черепа (рис. 2) [3].

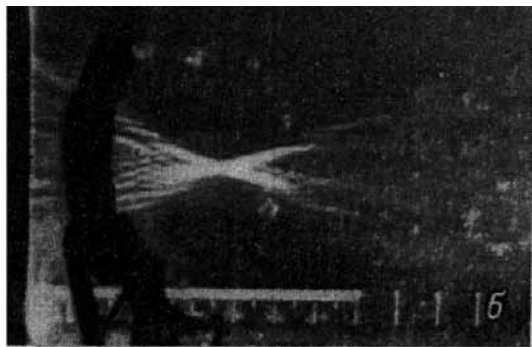
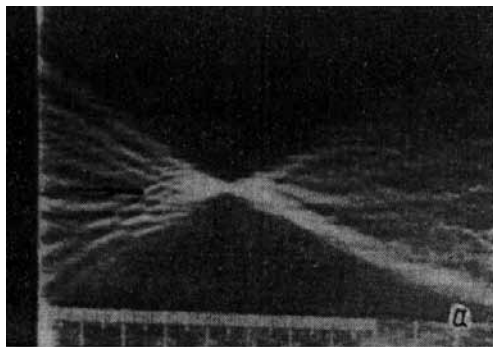


Рис. 2. Прохождение фокусированного ультразвука: в воде (а), через кость черепа человека (б).

В ряде статей сообщается о различных достижениях по локализации ультразвукового пятна [1, 3, 8]. По крайней мере большинство авторов сходится во мнении что диаметры звукового пятна в 5-10 мм (в зависимости от частоты ультразвука и места воздействия) вполне достижимы.

До недавнего времени не существовало математической модели описывающей прохождение ультразвука через череп. В существовавших моделях не учитывалась возможность трансформировать продольные волны, проходящие через скальп, в поперечные волны в черепе, и, затем обратно в продольные в тканях мозга. Это считалось невозможным [12, 19]. Однако в работе [13], как теоретически, так и экспериментально, была

показана существенность вклада поперечных волн в прохождение ультразвука. Был разработан метод проникновения ультразвука внутрь черепа без трепанации, при котором ультразвуковые волны из продольных, распространяющихся в скальпе, преобразовывались бы в поперечные в кости черепа, а затем обратно в продольные в тканях мозга. Затем, на основе этого метода был разработан прибор для ультразвукового сканирования мозга [23].

В работе [19] череп рассматривается

как трехслойная структура, состоящая из двух слоев кости и промежуточного слоя ячеистой кости, лежащего между ними. Акустические свойства черепа в такой модели изучались ранее в работе [16]. Границы слоев предполагаются параллельными плоскостями. Это допустимое приближение, так как рассматриваемая длина волны меньше радиуса кривизны черепа (изучаемая частота составляет от 0,5 МГц до 1 МГц). Далее производится прямой расчет с помощью 3-мерных уравнений упругости. В результате численных экспериментов авторы приходят к неутешительному выводу о том, что поперечные волны не могут проникнуть в ткани мозга, из-за отражений на границах тканей различного типа.

Однако в работе [13], а также в работе [24] была рассмотрена модель, в которой череп рассматривался как изотропное твердое тело. В данной модели было сделано предположение, что границы черепа — 2 плоскости (необязательно параллельные). Это допустимо опять-таки из-за того, что длина волны много меньше радиуса кривизны черепа. Был произведен численный расчет с использованием трехмерного закона упругости. Также были произведены эксперименты на мертвом мозге человека и на модели, выполненной из пластика. Рассматривался ультразвук с частотой 0,75-1,5 МГц.

В ходе экспериментов и численных расчетов было установлено, что при достаточно больших углах падения волны, весьма существенное значение имеет трансформация ультразвука из продольных волн в поперечные. А именно, при угле с нормалью поверхности меньшем 26 градусов в черепе преобладает продольная волна, в пределах от 26 до 32 градусов — имеются волны обоих типов, при угле, большем 32 градусов — преобладает поперечная волна. Также при 32 градусах достигается локальный максимум амплитуды. Полученные различия по фазе между измерениями для пластика и расчетной величиной не превосходят 30 градусов для всевозможных значений угла падения, исключая промежуток между 20 и 30 градусами. По амплитуде (для пластика) ошибка также невелика, это можно считать хорошим результатом эксперимента.

Как показано в работе [21] и обзоре [8], мозг и скальп человека по акустическим характеристикам можно считать однородными структурами. В работе [21] были рассмотрены акустические свойства различных структур мозга, в результате чего были выявлены незначительные разли-

чия между коэффициентами затухания и между скоростями звука. Таким образом, основная сложность заключается в разработке математической модели прохождения ультразвука через череп.

Рассмотрим теорию прохождения ультразвуковых волн сквозь череп, описанную в работах [13, 24]. Главная ее задача заключается в вычислении амплитуды и фазы сигнала в мозге человека, зная параметры волны на поверхности черепа. Это позволит сфокусировать ультразвук в данной зоне мозга, используя несколько источников на поверхности, т.е. так задать входные параметры ультразвука, чтобы в заданной зоне мозга волны находились в одной и той же фазе.

Теория вытекает из трехмерного закона упругости

$$\sigma_{ij} = c_{ijkl} \epsilon_{kl},$$

где σ_{ij} — тензор напряжений, c_{ijkl} — тензор упругости, ϵ_{kl} — тензор деформаций. В рассматриваемом частном случае изотропного твердого тела имеем для продольных волн

$$\sigma_{ij} = \lambda(\epsilon_{11} + \epsilon_{22} + \epsilon_{33}) + 2\mu\epsilon_{ij}, \quad (1)$$

где λ и μ — коэффициенты Ламе для черепа. А для поперечных волн —

$$\sigma_{ij} = 2\mu\epsilon_{ij}. \quad (2)$$

Скорость волн в жидкости имеет вид

$$\vec{v} = \vec{\nabla}\Phi,$$

где Φ — скалярный потенциал скорости. В твердом теле имеет место формула

$$\vec{v} = \vec{\nabla}\Theta + \vec{\nabla}\vec{\Psi},$$

здесь Θ и $\vec{\Psi}$ — соответственно скалярный и векторный потенциалы. Выберем

евклидову систему координат, так чтобы нормаль к поверхности черепа была направлена по оси Оу, а вектор Oz был сонаправлен векторному произведению вектора направления распространения волны и единичного вектора, направленного по нормали к поверхности черепа. Тогда решение волнового уравнения для падающей продольной волны, распространяющейся в скальпе, имеет вид

$$\Phi_1 = \exp(i(\omega t - k_1 \sin(\theta_1)x + k_1 \cos(\theta_1)z)),$$

где k_1 — волновое число падающей волны, θ_1 — угол падения волны (здесь и далее рассматриваются углы между нормалью к поверхности черепа и направлением распространения волны). Для отраженной волны в скальпе решение имеет вид

$$\Phi_2 = A \exp(i(\omega t - k_1 \sin(\theta_2)x - k_1 \cos(\theta_2)z)),$$

где θ_2 — угол распространения отраженной волны. Для продольной волны в черепе, имеем

$$\Theta = A_1 \exp(i(\omega t - k_2 \sin(\theta_3)x + k_2 \cos(\theta_3)z)),$$

где k_2 — волновое число продольной волны в черепе, θ_3 — угол распространения продольной волны. Также для поперечной волны в кости черепа имеем

$$\Psi = A_2 \exp(i(\omega t - k_3 \sin(\theta_4)x + k_3 \cos(\theta_4)z)),$$

где Ψ — у-компонента вектора, k_3 — волновое число поперечной волны, θ_4 — угол распространения поперечной волны. Далее, по определению тензора деформаций

$$\varepsilon = \vec{\nabla} \vec{u},$$

где $\vec{u}$ — вектор смещения. Производя подстановку в уравнениях (1) и (2), учитывая, что волны гармонические и производные смещения несложно выражаются через производные скоростей, получаем соотношения

$$i\omega\sigma_{zz} = \lambda \left(\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_z}{\partial z} \right) + 2\mu \left(\frac{\partial v_z}{\partial z} \right),$$

$$i\omega\sigma_{xz} = \mu \left(\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_z}{\partial z} \right).$$

Далее, по определению потенциалов, выражая производные скорости через Φ , Θ , Ψ , после подстановки получаем

$$i\omega\sigma_{zz} = \lambda \nabla^2 \Theta + 2\mu \left(\frac{\partial^2 \Theta}{\partial z^2} + \frac{\partial^2 \Theta}{\partial x \partial z} \right),$$

$$i\omega\sigma_{xz} = \mu \left(2 \frac{\partial^2 \Theta}{\partial x \partial z} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} - \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z^2} \right).$$

Теперь необходимо учесть граничные условия. Они включают в себя непрерывность нормальных составляющих скорости и давления на границе сред, а также условие, что тангенциальная составляющая давления равна нулю на границе сред. Эти условия описываются уравнениями

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial z} = \frac{\partial \Theta}{\partial z} + \frac{\partial \Psi}{\partial x},$$

$$\lambda_2 \nabla^2 \Phi = \lambda \nabla^2 \Theta + 2\mu \left(\frac{\partial^2 \Theta}{\partial z^2} + \frac{\partial^2 \Theta}{\partial x \partial z} \right),$$

$$2 \frac{\partial^2 \Theta}{\partial x \partial z} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} - \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z^2} = 0,$$

где λ_2 — коэффициент Ламе для жидкости. Из всех этих уравнений, подстановкой в формулы решений волновых уравнений, как следствие был получен закон Снеллиуса

$$\frac{\sin(\theta_1)}{c_1} = \frac{\sin(\theta_3)}{c_3} = \frac{\sin(\theta_4)}{c_4},$$

где c_1 — скорость звука в скальпе, c_3 — скорость распространения продольной волны в черепе, c_4 — скорость распространения поперечной волны. Здесь учитываются выражения для скоростей

$$c_3 = \sqrt{\frac{\lambda + 2\mu}{\rho}},$$

$$c_4 = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}}.$$

Также отсюда в работах [13, 24] были выражены амплитуды продольной и поперечной волн в черепе:

$$A_1 = \left(\frac{\rho_1}{\rho_2} \right) \times \frac{\left(2 \frac{\rho_1 c_3}{\cos(\theta_3)} \cos(2\theta_4) \right)}{\left(\frac{\rho_2 c_3}{\cos(\theta_3)} \cos^2(2\theta_4) + \frac{\rho_2 c_4}{\cos(\theta_4)} \sin^2(2\theta_4) + \frac{\rho_1 c_1}{\cos(\theta_1)} \right)},$$

$$A_2 = \left(\frac{\rho_1}{\rho_2} \right) \times \frac{\left(2 \frac{\rho_1 c_4}{\cos(\theta_4)} \cos(2\theta_4) \right)}{\left(\frac{\rho_2 c_3}{\cos(\theta_3)} \cos^2(2\theta_4) + \frac{\rho_2 c_4}{\cos(\theta_4)} \sin^2(2\theta_4) + \frac{\rho_1 c_1}{\cos(\theta_1)} \right)},$$

Аналогичным образом решается задача расчета амплитуды волн в мозге человека, в результате которой получается следующее выражение:

$$A_3 = \frac{-2A_2 c_4^2 k_3^2 \rho_1 \cos(\theta_3) (k_3 \cos(2\theta_3) + 2k_2 \sin(\theta_4)) \sin(2\theta_4)}{F + G},$$

где $F = k_4 k_2 k_3 \rho_2 \cos(\theta_5) c_4^2 \cos(2\theta_4) - 2c_4^2 \sin(\theta_3) \sin(\theta_3 - 2\theta_4)$,

$$G = c_5^2 k_5 \rho_3 (k_4 \cos(\theta_3) \cos(2\theta_4) + k_3 \sin(2\theta_4) \sin(\theta_4)),$$

где k_5 — волновое число продольной волны в мозге, c_5 — скорость продольной волны в мозге, а ρ_3 — плотность мозга.

В данных работах [13, 24] были произведены эксперименты на модели из пластика и на мертвом мозге человека. Для модели из пластика полученная ошибка по фазе и амплитуде составила не более 30%. Был выявлен наилучший угол прохождения волн — 32 градуса. В

работе [23] на основе этой модели был представлен прибор для ультразвукового сканирования мозга. Результаты сканирования были сопоставлены с результатами МРТ-обследования, была выявлена очень хорошая корреляция между этими данными ($n=38$; $R^2=0,9962$).

Клинический опыт использования ультразвука и механизм его воздействия

Терапевтический ультразвук может быть условно разделен на ультразвук низких и высоких интенсивностей. Основная задача применения ультразвука низких интенсивностей (0,125-3,0 Вт/см² на частотах порядка нескольких мегагерц) — не повреждающий нагрев или какие-либо нетепловые эффекты, а так-

же стимуляция и ускорение нормальных физиологических реакций при лечении травм [1]. При более высоких интенсивностях ($> 5 \text{ Вт/см}^2$) основная цель — вызвать управляемое избирательное разрушение в тканях [1]. Первое направление включает в себя большинство применений ультразвука в физиотерапии, а второе — ультразвуковую хирургию. Ультразвуковая хирургия, кроме того, предъявляет высокие требования к точности локализации воздействия.

По-видимому, главным нетепловым эффектом, приводящим к лечебному действию ультразвука, являются акустические течения [1, 3, 8]. Они могут быть вызваны долгоживущими осциллирующими пузырьками или радиационными силами как внутри, так и вне клеток [1]. Акустические течения могут влиять на среду около мембран, изменяя градиенты концентраций, воздействуя тем самым на диффузию ионов и молекул через мембраны. Кроме того, под действием ультразвука может изменяться как проницаемость самой мембраны, так и эффективность работы ионных насосов. Это может привести к изменению возбудимости нейронов [1]. Показано, что использование ультрафонофореза вместе с лекарственными препаратами позволяет, наряду с использованием других физических воздействий (лазерного обучения) существенно ускорить медицинскую реабилитацию больных, перенесших острые нарушения мозгового кровообращения, и снизить дозы и укоротить период лекарственной терапии [2].

Можно предположить, что использование низких интенсивностей ультразвука наряду с высокой точностью фокусировки позволит добиться локальной стимуляции головного мозга. Модуляция ультразвука низкочастотным сигналом, возмож-

но, позволит локально изменять функциональные состояния частей мозга. В частности известно, что стимуляция кожных рецепторов ультразвуком вызывает разнообразные кинетические ощущения [3]. Стимуляция улитки уха человека ультразвуком с частотой 0,3–2 МГц, модулированным звуковой частотой, приводит к ощущению звука. Локальная стимуляция мозга кошки может привести к временной (до 30 мин.) потере зрения [3].

Другим возможным механизмом отклика сенсорных систем организма на воздействие ультразвука могут являться данные, представленные в работах [27, 28, 29]. Авторами показано, что под влиянием ультразвука у различных млекопитающих изменяется синтез белка престина, а также генов, ответственных за этот процесс. Престин в этой ситуации удлиняет волоски клеток улитки внутреннего уха и усиливает звуковой сигнал определенной частоты.

Транскраниальный ультрафонофорез

При лечении ряда психических и неврологических заболеваний, а также в фундаментальных исследованиях высшей нервной деятельности используются психотропные, противосудорожные, противопаркинсонические, противосудорожные, противопаркинсонические, наркотические, снотворные средства. В ряде случаев, например, при лечении паркинсонизма прибегают к локальному введению допамина и других средств непосредственно в определенные отделы головного мозга. Для более гуманного решения этой задачи предлагается локальное открытие гематоэнцефалического барьера путем локального транскраниального ультрафонофореза с одновременным внутриартериальным введением психотропных препаратов, не-

способных проходить через гематоэнцефалический барьер в обычных условиях. Предполагается, что фокусированный ультразвук способен повысить проницаемость гематоэнцефалического барьера.

Известно, что крупные гидрофильные молекулы неспособны проходить через гематоэнцефалический барьер в обычных условиях [4]. Однако действие ультразвука существенно изменяет свойства тканей, увеличивая их диффузионную проницаемость. Данное явление известно как фонофорез или ультрафонофорез нашло широкое применение в медицине для введения в кожу и жировые ткани различных препаратов. Основанием для разработки и внедрения ультрафонофореза в практику послужили данные о том, что ультразвук разрыхляет соединительнотканые структуры, повышает проницаемость кожи, сосудистых и клеточных мембран, увеличивает эффузию лекарств, усиливает перемещение жидкостей [6]. Экспериментально доказана возможность введения с помощью ультрафонофореза некоторых фармакологических препаратов в ткани [6, 8]. При ультрафонофорезе небольшое количество лекарственных веществ (1-3 % наносимых на кожу) поступает в эпидермис, собственно кожу, частично в подкожно-жировой слой. Вскоре после процедуры лекарство обнаруживается на глубине 2-5 см.

Количество вводимого препарата и глубина его проникновения определяются интенсивностью, длительностью действия, режимом и частотой ультразвука, способом озвучивания, концентрацией лекарств, исходным функциональным состоянием ткани. Содержание вводимых лекарств относительно увеличивается при невысоких концентрациях раствора (до 5%), средней интенсивности ультра-

звука (0,4-0,6 Вт/см²), увеличении длительности процедуры (обычно до 5-15 мин.), частоте 880 кГц по сравнению с 2640 кГц, непрерывном режиме по сравнению с импульсным, лабильном воздействии по сравнению со стабильным [6].

Безопасность транскраниальной ультразвуковой стимуляции

Ультразвуковые исследования нашли широкое применение в акушерстве и гинекологии (сегодня рекомендуется проводить три ультразвуковых исследования при нормальном развитии плода). Именно поэтому безопасности таких исследований посвящено множество работ [8]. Принято считать, что ультразвук низкой интенсивности не оказывает необратимого воздействия на формирующийся головной мозг плода. Тем более, принято считать безопасным ультразвуковое исследование головного мозга взрослого человека.

В ряде работ, однако, показано, что в группе детей подвергшихся облучению ультразвуком несколько хуже развит хватательный рефлекс, чаще обнаруживаются затруднение при чтении и произношении слов, среди мальчиков больший процент левшей. Также чаще встречается задержка развития речи. В целом можно сказать, что вопрос о безопасности применения ультразвука в психологическом эксперименте и психотерапии остается открытым.

Безопасность транскраниального ультрафонофореза

Хорошо известно, что низкочастотные ультразвуковые колебания ($1,2 \times 10^4$ - $1,0 \times 10^5$ Гц) распространяются в воздушной среде. Интенсивность, длительность

воздействия, размеры тех или иных участков организма определяют характер биологического эффекта ультразвука. Многократное или систематическое воздействие ультразвука нарушает деятельность нервной, вестибуло-кохлеарной, эндокринной, сердечно-сосудистой систем. В последние годы развиваются методы разрушения опухолей головного мозга, не поддающиеся обычному лечению.

Вместе с тем появляются многочисленные сообщения о явлениях астении, сосудистой гипотонии, снижении электрической активности мозга и сердца у лиц, работающих с ультразвуковыми излучателями. Локальное действие ультразвука вызывает нарушения капиллярного кровообращения, снижение болевой чувствительности и другие неврологические нарушения. Также известно, что интенсивное или длительное воздействие ультразвука способно вызывать нарушение плотности костной ткани и другие изменения ее структуры. Широко дискутируется вопрос о безопасности ультразвука при обследованиях беременных женщин на ранних стадиях развития плода.

Однозначного мнения об опасности или безопасности ультразвукового обследования плода нет ни в нормативных документах Минздравсоцразвития РФ, ни в Американском Агентстве по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами (FDA). Тем не менее, накапливающиеся экспериментальные данные (мыши, крысы, обезьяны) позволяют задуматься над феноменами рассеивания нейронов в коре головного мозга у зародышей животных, возможно связанных с вибрационными воздействиями и нарушениями термодинамических процессов под влиянием ультразвука.

Хотя вопрос синергетического действия ультразвука и психотропных пре-

паратов на сегодняшний день изучен недостаточно, современная медицина не предусматривает никаких ограничений по приему психотропных препаратов перед ультразвуковым исследованием. Нам также неизвестны случаи развития патологий обусловленных приемом психотропных препаратов перед ультразвуковым исследованием. В случае применения технологии транскраниального ультрафонофореза безопасность воздействия психотропных препаратов дополнительно увеличивается вследствие меньших доз и меньших времен действия.

Меньшие дозы, как и меньшие времена действия, вызваны тем, что необходимые концентрация препарата в крови, поступающей в головной мозг, при внутриартериальном введении достигаются много меньшим количеством препарата, чем при введении через энтеральные пути. Более того, гидрофильные препараты быстро выводятся из организма через почки, не требуя предварительного метаболизма в печени.

Заключение

Транскраниальная стимуляция головного мозга человека может иметь несомненные преимущества перед иными способами воздействия на мозг, включая физические, химические факторы и фармакологические агенты. Представленные выше сложности в получении фокусированных пучков ультразвука могут быть преодолены при использовании фазированных решеток.

Перспективными направлениями ультразвуковой транскраниальной стимуляции мозга могут оказаться возможно-сти локального разрушения небольших участков ткани в глубинных структурах

мозга (опухоли, участки посттравматической гиперактивности нейрональных пулов, болезнь Паркинсона и др.), так и стимуляции отдельных ядер или участков головного мозга с целью коррекции неврологических нарушений органической или функциональной природы.

Несомненно перспективным является использование транскраниальной ультразвуковой стимуляции для коррекции нарушенных психических функций. Это возможно осуществлять как вместе с психотропными препаратами, так и без них. Механизмы ультразвукового изменения психических функций до конца не выяснены, однако, стремительное развитие геномики и протеомики позволяет надеяться на расшифровку интимных процессов формирования интрацентральных взаимоотношений в головном мозге. Одним из таких механизмов можно считать генную регуляцию синтеза белка престина у большого отряда млекопитающих. Схожесть генов престина у таких различных животных, как у дельфина, летучей мыши и других млекопитающих позволяет использовать концепцию конвергентной молекулярной эволюции для расшифровки психотропного действия ультразвука на мозг.

Обнаруженная в самое последнее время [5] способность животных и человека осуществлять и воспринимать ультразвуковые сигналы, имеющие определенные информативные параметры и несущие соответствующую информацию о состоянии организма и его взаимодействии с окружающей средой, подкрепляют убежденность в оправданности и целесообразности ультразвуковой транскраниальной стимуляции, а также открывает пути установления безопасных диапазонов и параметров в отношении головного мозга человека.

Список литературы

1. **Акопян Б.В., Ершов Ю.А.** Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. — М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э.Баумана. — 2005.
2. **Волошина Е.Б., Шмакова И.П., Дукова О.Р., Колотвина Л.И., Шонина Н.Б.** Эффективность комплексного применения ультрафонофореза троксевазина и инфракрасного лазерного излучения на этапе ранней реабилитации больных южного региона, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения в вертебробазилярном бассейне // <http://genepra.odmu.edu.ua/art/02.php>.
3. **Гаврилов Л.Р., Цирюльников Е.М.** Фокусированный ультразвук в физиологии и медицине.// Л.: Наука. — 1980.
4. **Гурленя А.М., Багель Г.Е., Смычек В.Б.** Физиотерапия в неврологии. — Минск: Медицинская литература. — 2008.
5. **Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Канинадзе Г.Д., Чайванов Д.Б.** Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека. Биомедицина. — 2011. — № 1. — с.4-23.
6. **Улащик В.С., Данусевич И.К.** Фармакодинамические основы электрофонофореза. — Минск. — 1976.
7. **Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н.** Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. — 2010. — № 5. — с.17-21.
8. **Хилл К., Бэмбер Дж., Г. тер Хаар.** Ультразвук в медицине. Физические основы применения. — М.: Физматлит. — 2008.

9. **Шелякин А.М., Пономаренко Г.Н.** Микрополяризация мозга. — СПб.: Типография ВМедА им.С.М.Кирова. — 2006. — с. 224.

10. **Behrens S., Spengos K., Daffertshofer M., Schroeck H., Dempfle C.E., Hennerici M.** Transcranialultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound // *Ultrasound Med. Biol.* — 2001. — 27:1683–1689. [PubMed: 11839413].

11. **Carson P.L., Oughton T.V., Hendee W.R., Ahuja A.S.** Imaging soft tissue through bone with ultrasound transmission tomography by reconstruction // *Med. Phys.* — 1977. — 4:302–309. [PubMed: 882064].

12. **Clement G.T., Sun J., Hynynen K.** The role of internal reflection in transskull phase distortion // *Ultrasonics.* — 2001. — 39:109–113. [PubMed: 11270628].

13. **Clement G.T., White P.J., Hynynen K.** Enhanced ultrasound transmission through the human skull using shear mode conversion // *J. Acoust. Soc. Am.* — 2004. — 115:1356–1364. [PubMed: 15058357].

14. **Dines K.A., Fry F.J., Patrick J.T., Gilmor R.L.** Computerized ultrasound tomography of the human head: experimental results // *Ultrason. Imaging.* — 1981. — 3:342–351. [PubMed: 7197827].

15. **Fry F.J.** Transkull transmission of an intense focused ultrasonic beam // *Ultrasound. Med. Biol.* — 1977. — 3:179–184.

16. **Fry F.J., Barger J.E.** Acoustical properties of the human skull // *J. Acoust. Soc. Am.* — 1978. — 63:1576–1590. [PubMed: 690336].

17. **Fry F.J., Eggleton R.C., and Heimbürger R.F.** Transkull visualization of brain using ultrasound; an experimental model study // *Experta Medica.* — 1974. — p. 97–103.

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

19. **Hayner M., Hynynen K.** Numerical analysis of ultrasonic transmission and absorption of oblique plane waves through the human skull // *J. Acoust. Soc. Am.* — 2001. — 110: 3319–3330.

20. **Hynynen K., McDannold N., Vykhodtseva N., Jolesz F.A.** Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits // *Radiology.* — 2001. — 220:640–646. [PubMed: 11526261].

21. **Kremkau F.W., Barnes R.W., McGraw C.P.** Ultrasonic attenuation and propagation speed in normal human brain // *J. Acoust. Soc. Am.* — 1981. — 70:29–38.

22. **Smith S.W., Phillips D.J., von Ramm O.T., Thurstone F.L.** Some advances in acoustic imaging through the skull // *Nat Bur Standards Pub.* — 1979. — № 525. — p. 209–218.

23. **White J.P., Clement G.T., Whalen S., Tang S.C., Golby A.J.** An intraoperative brain-shift monitor using shear-mode transcranial ultrasound: preliminary results // *J. Ultrasound. Med.* — 2009. — February. — 28(2). — p. 191–203.

24. **White P.J., Clement G.T., Hynynen K.** Longitudinal and shear mode ultrasound propagation in human skull bone // *Ultrasound in Med. Biol.* — 2006. — 32:1085–1096. [PubMed: 16829322].

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

26. *Yang Liu, James A. Cotton, Bin Shen, Xiuqun Han, Stephen J. Rossiter, Shuyi Zhang.* Convergent sequence evolution between echolocating bats and dolphins // *Current Biology* 20(2) pp. R53-R54. — 2010.
27. *Yang Liu, Stephen J. Rossiter, Xiuqun Han, James A. Cotton, Shuyi Zhang.* Cetaceans on a Molecular Fast Track to Ultrasonic Hearing // *Current Biology* 20(20) pp. 1834-1839. — 2010.
28. *Yang Liu, Zhen Liu, Peng Shi, Jianzhi Zhang.* The hearing gene Prestin unites echolocating bats and whales // *Current Biology* 20(2) pp. R55-R56. — 2010.
29. *Ylitalo J., Koivukangas J., Oksman J.* Ultrasonic reflection mode computed tomography through a skull bone // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* — 1990. — 37:1059-1066. [PubMed: 2276753].

About effectiveness and safety of transcranial ultrasound stimulation of the brain

N.N. Karkischenko, D.B. Chaivanov, A.A. Vartanov

Applications of a focused transcranial ultrasound has been discussed in the context of psychotherapy and experimental physiology. Ultrasound can be used to the stimulation of the current part of the brain. Possibility of focusing ultrasound using of phased grids has been analyzed.

Key words: ultrasound transcranial neurostimulation, ultrasound transcranial neuronmodulation, transcranial ultraphonophoresis, ultrasound phased grid.



Активация рецепторов прорастания спор *B. anthracis*

М.Ю. Озеров¹, В.Г. Попов¹, Н.Н. Каркищенко², Д.В. Попов¹,
С.Ю. Пчелинцев¹, В.Н. Каркищенко²

¹ — Институт инженерной иммунологии, Московская область

² — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: М.Ю. Озеров «Институт инженерной иммунологии»,
142380, Московская обл., Чеховский р-н, Любучаны, Науки 1

Общеизвестно, что бактериофаги не действуют на споры *B. anthracis*, но способны лизировать прорастающие споры и вегетативные клетки. Поэтому одной из задач при разработке биологического дезинфицирующего препарата против сибирской язвы является подбор эффективного активатора прорастания спор. Нами было выявлено, что наилучшим активатором прорастания спор *B. anthracis* является L-аланин, который способствует прорастанию более 90% спор за короткое время. Оптимальная концентрация L-аланина для запуска триггерных механизмов прорастания составляет 50-100 мМ.

Ключевые слова: *B. anthracis*, активаторы прорастания спор, L-аланин

Покоящиеся споры *B. anthracis*, образующиеся внутри цитоплазмы вегетативных клеток в неблагоприятных условиях, отличаются репрессией генома, почти полным отсутствием обмена веществ, малым количеством свободной воды, повышенной концентрацией ионов кальция, дипиколиновой кислоты, с которыми связывают термоустойчивость спор, образованием дополнительных оболочек, препятствующих осуществлению диффузии и проникновению веществ из внешней среды, большой устойчивостью к повреждающим факторам и способностью очень долго сохранять жизнеспособность. При попадании в благоприятные условия, а также под влиянием физико-химических факторов происходит активация спор (1-2 минуты) с последующей инициацией и прорастанием (20-30 минут), и вы-

растанием в вегетативные клетки (60-90 минут). Активация заключается в мобилизации метаболических процессов. Прорастание характеризуется удалением дипиколиновой кислоты, ионов кальция, разрушением пептидогликана кортекса. Прорастание регулируется специальными веществами — аминокислотами-активаторами прорастания, ионами магния, п-додециамином, глюкозой, нуклеозидами, ПАВ и др. Также прорастанию способствует механическое воздействие на споры. Давление 100 МПа инициирует прорастание спор посредством активации рецепторов прорастания, а давление 550 МПа открывает каналы для выхода дипиколиновой кислоты из спорового кортекса. Обработка давлением от 60 до 500 МПа и температурой 60°C благоприятна для прорастания покоящихся спор и,

таким образом для их инактивации [1-6]. В целом прорастание — это процесс, сопровождающийся сложными физиологическими и биохимическими изменениями, который приводит к потере спороспецифических свойств. Начинается он с интенсивного поглощения спорой воды и набухания. Специфические химические вещества взаимодействуют с соответствующими рецепторами [7]. Идентификация молекул для запуска процессов прорастания эндоспор *B. anthracis* и чувствительных к ним рецепторов прорастания является важным в процессе прорастания спор. Для каждого из известных путей прорастания спор *B. anthracis* необходимы, по крайней мере, два отдельных рецептора, взаимодействие между которыми обеспечивает покоящееся состояние эндоспор. Однако, еще не полностью детализирована функция некоторых рецепторных белков прорастания, которые являются мембранными белками [7].

Активация рецепторов прорастания инициирует серию комплексных биохимических процессов, которые последовательно активируют внутриклеточные протеазы и внеклеточные гидролазы, способствующие клеточной дифференциации в вегетативную форму. Механизмы сигнальной трансдукции от рецепторов прорастания к ферментам остаются до сих пор непонятыми [8].

На первом этапе прорастания происходит активация ферментов, которые находятся в поверхностных структурах (и в первую очередь, литических), необходимых для разрушения кортекса [8]. Происходят изменения в химическом составе, идет активный синтез белка и РНК.

Генетические локусы, кодирующие рецепторы прорастания были найдены и типизированы в локусе *gerA* у *B. subtilis* [8, 9]. Эти локусы функциони-

руют при запуске простого ответа на активацию прорастания. Локусы являются трицистроновыми оперонами, которые проявляют активность в развитии предспоры при спорообразовании сигма-G-зависимым способом [10,11]. Было показано, что мутации в семействе оперонов *gerA* вызывают инактивацию прорастания в ответ на воздействие специфическими молекулами активаторов прорастания спор [12-17].

На настоящий момент, в геноме *B. anthracis* идентифицировано семь *gerA*-подобных локусов [18]. Шесть из них (*gerA*, *gerH*, *gerK*, *gerL*, *gerS* и *gerY*) локализованы на хромосоме, тогда как седьмой локус, *gerX*, расположен внутри островка патогенности на вирулентной плазмиде *pXO1* [19]. Два хромосомных оперона *gerS* и *gerH* совместно обуславливают прорастание споры в ответ на воздействие инозином, или аланином в комбинации с ароматическими компонентами [12, 20]. При моделировании инфекции на животных было показано, что локус *gerX* участвует в прорастании спор *in vivo*, а также кодирует вирулентность [19]. Совместно локусы *gerK* и *gerL* требуются для активации аланин-зависимого пути прорастания споры, а также по отдельности для распознавания пролина и метионина (*gerK*) или серина и валина (*gerL*), как коактиваторов прорастания в комбинации с инозином [7]. Локус *gerS* требуется для активации прорастания в ответ на воздействие ароматическими аминокислотами — коактиваторами прорастания спор. Функция рецепторов, кодируемых локусами *gerA* и *gerY*, была незначительной при распознавании всех известных молекул активаторов прорастания спор [7]. Также выяснено, что промотер каждого предполагаемого оперона рецептора прорастания,

за исключением локуса *gerA*, активен во время спорообразования [7].

Общеизвестно, что бактериофаги не действуют на споры *B. anthracis*, но способны лизировать прорастающие споры и вегетативные клетки. Поэтому одной из задач при разработке биологического дезинфицирующего препарата является подбор эффективного активатора прорастания спор. Проводилась оценка воздействия активаторов прорастания на разных этапах развития спор в вегетативные клетки. Основное внимание уделялось веществам, которые не только способствуют прорастанию, но и делают этот процесс необратимым, запуская триггерные механизмы. Кроме того, выбирались активаторы прорастания, способствующие прорастанию наибольшего количества спор за короткое время.

Материал и методы

Суспензия спор *B. anthracis* (вакцинный штамм СТИ-1) готовилась в физиологическом растворе (рН 7,0). Концентрация спор в суспензии составляла 10^6 спор/см³, что корректировалось по стандарту мутности и биологической концентрации.

В кюветы с суспензией спор добавляли L-аланин в концентрациях 50 мМ или 100 мМ.

С целью снижения расхода L-аланина и выявления влияния на скорость прорастания спор *B. anthracis* комбинации L-аланина с другими аминокислотами была проведена серия опытов в комбинации с L-валином,

L-аспарагином и L-изолейцином в концентрациях 50 мМ или 100 мМ. Концентрация L-аланина, при этом была снижена до 10 мМ. Скорость прорастания определяли путем измерения снижения оптической плотности системы в течение 20 минут (длина волны 600 нм) на биофотометре Eppendorf, с интервалом 2 минуты, при комнатной температуре ($+22 \pm 2^\circ\text{C}$).

Для определения эффективности действия активаторов прорастания спор, определяли количество непроросших спор в тестируемых системах по биологической концентрации после их прогревания при 70°C в течение 30 минут.

Результаты и их обсуждение

На рисунках 1 и 2 приведены средние результаты двух независимых опытов взаимодействия спор *B. anthracis* и активаторов прорастания. При использовании L-аланина в качестве активатора прорастания (концентрация 50 мМ), оптическая концентрация суспензии спор снизилась в более чем в два раза в течение 10 минут (рис. 1).

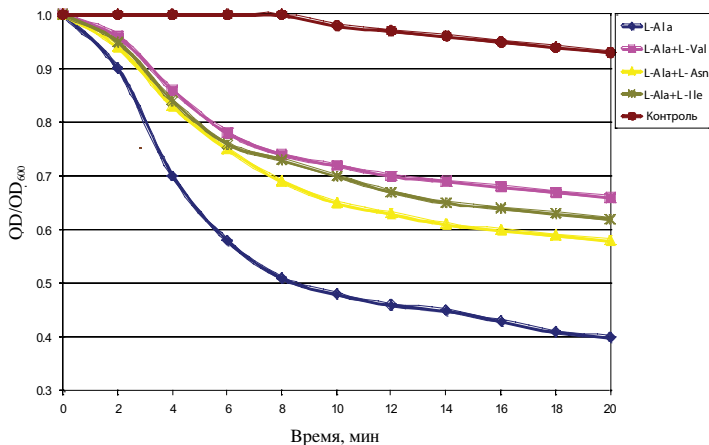


Рис. 1. Прорастание спор *B. anthracis* *in vitro*. L-аланин (L-Ala) применялся в концентрации 50 мМ. При применении комбинации L-аланина с другими аминокислотами, использовались концентрации 10 мМ для L-аланина и по 50 мМ каждой из аминокислот: L-валин (L-Val), L-аспарагин (L-Asn), L-изолейцин (L-Ile).

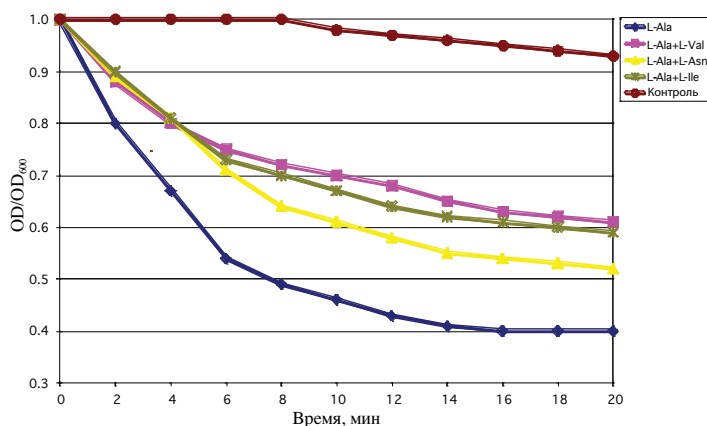


Рис. 2. Прорастание спор *B. anthracis* in vitro. L-аланин (L-Ala) применялся в концентрации 100 мМ. При применении комбинации L-аланина с другими аминокислотами, использовались концентрации 10 мМ для L-аланина и по 100 мМ каждой из аминокислот: L-валин (L-Val), L-аспарагин (L-Asn), L-изолейцин (L-Ile).

При использовании L-аланина в концентрациях 100 мМ начальная скорость прорастания покоящихся спор *B. anthracis* была немного выше, чем при концентрации 50 мМ (рис. 2). Несмотря на то, что при применении L-аланина (L-Ala) в концентрации 50 мМ начальный этап прорастания происходит медленнее, процент проросших спор через 20 минут инкубации системы практически равен показателям, полученным при использовании L-аланина в концентрации 100 мМ (рис. 3).

При добавлении к 10 мМ L-аланина других аминокислот (L-валина (L-Val), L-аспарагина (L-Asn) и L-изолейцина (L-Ile)), в качестве ко-активаторов прорастания, в концентрациях 50 мМ или 100 мМ, не ускорило процесс прорастания. Оптиче-

ская плотность суспензии спор при добавлении ко-активаторов прорастания снижалась на 30-40% от исходной в течение 10 минут, при этом использование ко-активаторов в концентрации 100 мМ незначительно ускоряло процесс прорастания (рис. 2). Процент проросших спор при добавлении ко-активаторов составил только 46,7-53,8%, что в почти в 2 раза ниже, чем при использовании L-аланина без ко-

активаторов (рис 3). Следовательно, использование L-валина, L-аспарагина и L-изолейцина, как ко-активаторов прорастания спор *B. anthracis* с целью снижения расхода L-аланина оказалось не эффективным.

Таким образом, исходя из полученных результатов, наилучшим активатором прорастания спор *B. anthracis* является

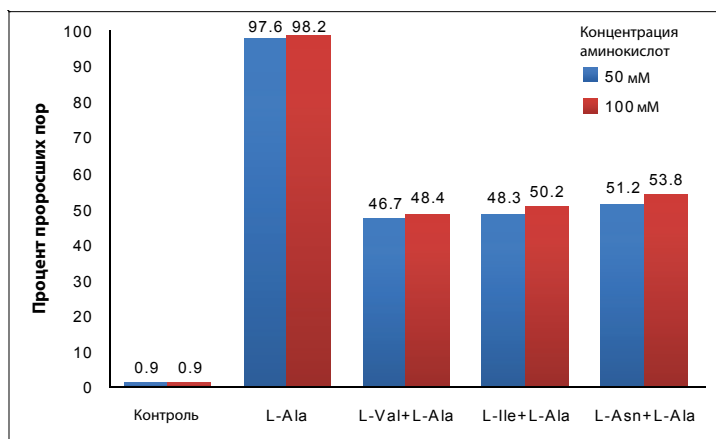


Рис 3. Процент проросших спор *B. anthracis* через 20 минут воздействия активаторов, в зависимости от их концентрации активаторов прорастания. Концентрация L-аланина в сочетании с другими аминокислотами составляла 10 мМ.

ся L-аланин, который способствует прорастанию более 90% спор за 20 минут. Оптимальная концентрация L-аланина для запуска триггерных механизмов прорастания составляет 50-100 мМ.

Список литературы

1. *Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P.* Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2000. — V. 64. — № 3. — p. 548-572.
2. *Paidhungat M., Setlow P.* Isolation and characterization of mutations in *Bacillus subtilis* that allow spore germination in the novel germinant D-alanine. *Journal of Bacteriology*. — 1999. — V. 181. — № 11. — p. 3341-3350.
3. *Paidhungat M., Setlow P.* Spore germination and outgrowth. *Bacillus Subtilis and its Relatives: From Genes to Cells*. — 2002. — p. 537-548.
4. *Paidhungat M., Setlow B., Driks A., Setlow P.* Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*. — 2000. — V. 182. — № 19. — p. 5505-5512.
5. *Paidhungat M., Setlow B., Daniels W.B., Hoover D., Papafragkou E., Setlow P.* Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. — 2002. — V. 68. — № 6. — p. — 3172-3175.
6. *Setlow P.* Resistance of bacterial spores *Bacterial Stress Responses*. — 2000. — p. 217-230.
7. *Fisher N., Hanna P.* Characterization of *Bacillus anthracis* Germinant Receptors In Vitro. *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187. — p. 8055-8062.
8. *Setlow P.* Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. — 2003. — V.6. — № 6. — p. 550-556.
9. *Moir A., Kemp E. H., Robinson C., and Corfe B. M.* The genetic analysis of bacterial spore germination. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* — 1994. — V. 23. — p. 9-16.
10. *Feavers I. M., Foulkes J., Setlow B., Sun D., Nicholson W., Setlow P., and Moir A.* The regulation of transcription of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* — 1990. — V. 4. — p. 275-282.
11. *Corfe B. M., Moir A., Popham D., and Setlow P.* Analysis of the expression and regulation of the *gerB* spore germination operon of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*. — 1994. — V. 140. — p. 3079-3083.
12. *Clements M. O., and Moir A.* Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *J. Bacteriol.* — 1998. — V. 180. — p. 6729-6735.
13. *Paidhungat M., and Setlow P.* Role of *ger* proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* — 2000. — V. 182. — p. 2513-2519.
14. *Barlass P. J., Houston C. W., Clements M. O., and Moir A.* Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of *gerL* and *gerQ* operons. *Microbiology*. — 2002. — V. 148. — p. 2089-2095.
15. *Ireland J. A., and Hanna P. C.* Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* Sterne endospores: *gerS* mediates responses to aromatic ring structures. *J. Bacteriol.* — 2002. — V. 184. — p. 1296-1303.
16. *Weiner M.A., Read T.D., and Hanna P. C.* Identification and characterization

of the gerH operon of *Bacillus anthracis* endospores: a differential role for purine nucleosides in germination. *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185. — p. 1462-1464.

17. *Hornstra L. M., de Vries Y. P., de Vos W. M., Abee T., and Wells-Bennik M. H.* gerR, a novel ger operon involved in L-alanine- and inosineinitiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — V. 71. — p. 774-781.

18. *Read, T. D., S. N. Peterson, et al.* The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames

and comparison to closely related bacteria. *Nature.* — 2003. — V. 423. — p. 81-86.

19. *Guidi-Rontani C., Weber-Levy M., Labruyere E., and Mock M.* Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol. Microbiol.* — 1999. — V. 31. — p. 9-17.

20. *Ireland, J. A., and Hanna P. C.* Macrophage-enhanced germination of *Bacillus anthracis* endospores requires gerS. *Infect. Immun.* — 2002. — V. 70. — p. 5870-5872.

Activation of receptors for *B. anthracis* spore germination

M.U. Ozerov, V.G. Popov, N.N. Karkischenko, D.V. Popov, S.U. Pchelincev,
V.N. Karkischenko

It is generally known, that bacteriophages do not interact with *B. anthracis* spores but able to lyse germinating spores and vegetative cells. Therefore, one of the steps in developing of biological disinfectant against anthrax is selection of the effective spore germinant. We have revealed that L-alanine is the best germinant which assists the germination of more than 90% of spores during the short period. The optimal L-alanine concentration to run trigger mechanisms of germination is 50-100 mM.

Key words: *B. anthracis*, spore germinants, L-alanine

Влияние гидродинамических процессов и низкоинтенсивного излучения с длинами волн 0,63 мкм и 7,1 мм на пролиферативную активность стволовых клеток стромы костного мозга *in vitro*

Р.К. Чайлахян¹, В.И. Юсупов², Ю.В. Герасимов¹, П.А. Соболев¹,
А.Х. Тамбиев³, Н.Н. Воробьёва², А.П. Свиридов², В.Н. Баграташвили²

¹ — Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Ф. Гамалеи, Москва

² — Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН,
Московская область

³ — Московский государственный университет им. М.И. Ломоносова, Москва

Контактная информация: Юсупов Владимир Исаакович iouss@yandex.ru

Изучался эффект воздействия излучения гелий-неонового лазера, излучения крайне высоких частот (КВЧ) с длиной волны 7,1 мм, а также лазеро-индуцированных гидродинамических процессов на пролиферацию стволовых клеток стромы костного мозга *in vitro* в состояниях «норма» и «ослабленное». Ослабление клеток достигалось их культивированием на питательных средах с пониженным содержанием сыворотки эмбрионов коров. Показано, что использованные физические воздействия могут усиливать пролиферативную активность стволовых клеток, причем эффект усиления наиболее выражен при воздействии на «ослабленные» стволовые клетки.

Ключевые слова: стволовые клетки стромы костного мозга, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, лазерное излучение, КВЧ излучение, лазеро-индуцированная гидродинамика

Все возрастающий интерес к изучению биологии и свойств стволовых клеток, в частности, стволовых стромальных клеток костного мозга или мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) вызван их широким терапевтическим потенциалом, открывающим серьезные перспективы их использования в различных областях регенеративной медицины [1]. При трансплантации в организм выращенные *in vitro* ММСК способны образовывать различные ткани мезенхимального происхождения [14]. С развитием клеточных технологий эти клетки все более успешно используются в медицинской практике (травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии и др.)

для восстановления целостности костной ткани, гиалинового хряща суставов, сухожильно-связочного аппарата и других тканей [7, 10].

Очевидно, что эксплантация костного мозга в культуру ткани нарушает микроокружение ММСК. Перенос этих клеток из своей естественной ниши, поддерживающей их стволовой статус, в новую нишу, например, в тканеинженерную конструкцию [2] может привести к изменению их статуса. Как следствие, может иметь место «ослабление» ММСК, нежелательное изменение их регенераторного и дифференцировочного потенциала. Для восстановления возможных изменений свойств ММСК, наступивших при их извлечении из естественной ниши, в этой

работе используются «физические» воздействия на клетки, включая воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением и лазероиндуцированными гидродинамическими процессами.

В настоящее время воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением широко используется в медицинской практике для лечения различных заболеваний. Наибольшее распространение получили лазерная терапия, основанная на применении низкоинтенсивного лазерного излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазонов [6], и КВЧ — терапия, использующая волны миллиметрового диапазона [9]. Стремительное распространение этих методов воздействия связано с их высокой терапевтической эффективностью. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на различные биологические объекты исследовалось на молекулярном, субклеточном, клеточном и организменном уровнях [3, 13, 15].

Лазероиндуцированные гидродинамические (ЛИГ) процессы при воздействии лазерного излучения умеренной мощности (1-5 Вт) на водонасыщенные биоткани в последнее время также стали эффективно использоваться в регенеративной медицине [4, 8]. Механизм терапевтического действия лазероиндуцированных гидродинамических процессов обусловлен образованием и схлопыванием парогазовых пузырьков в водонасыщенной ткани вблизи торца оптического транспортного волокна (через которое лазерное излучение вводится в биоткань), что приводит к возникновению в зоне лазерного воздействия кумулятивных микроструй и генерации мощных низкочастотных механических колебаний среды [12, 16]. Возникшие механические колебания среды вследствие

эффектов механобиологии и запускают процесс регенерации ткани [5].

Проведенные ранее исследования по воздействию на биологические объекты низкоинтенсивного лазерного излучения показали, что результат воздействия значительно зависит от состояния самих биологических объектов [13]. Так, при воздействии на биологические объекты, состояние которых характеризуется как «норма», различные контролируемые характеристики (такие как, например, индукция интерферона лейкоцитами) до и после воздействия достоверно не отличаются. Иная картина наблюдается при воздействии низкоинтенсивного излучения на биологические объекты, находящиеся в «ослабленном» состоянии. В этом случае после воздействия низкоинтенсивного излучения большинство контролируемых характеристик изменяются в сторону значений, характерных для биообъектов в состоянии «норма».

В этой работе, являющейся продолжением наших исследований физических воздействий на ММСК [11], изучается влияние ряда используемых в современной медицине физических полей на изменение пролиферативной активности ММСК *in vitro* в состояниях, условно характеризующихся как «норма» и «ослабленное».

Материалы и методы

Для сравнительного изучения пролиферативной активности ММСК костного мозга в состояниях «норма» и «ослабленное» под воздействием низкоинтенсивных полей нами была разработана методика получения штаммов ММСК в измененном («ослабленном») состоянии. Колонии фибробластов, сформированные к 12-14 дню после эксплантации костно-

го мозга человека, обрабатывали 0,25% раствором трипсина, снимали с пластика и подвергали пассированию в оптимальных условиях культивирования — в среде, состоящей из 80% среды α -МЕМ, 20% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) с добавлением антибиотиков. Спустя несколько дней в культуральных флаконах образовывался конфлюентный слой клеток, состоящий из фибробластов. При последующих пассажах культура клеток разделялась на две части и эксплантировалась в культуральные флаконы с питательной средой различного состава. В первом случае культуральная среда состояла из 80% среды α -МЕМ и 20% СЭК и обозначалась нами как «норма», в другом — из 97% среды α -МЕМ и 3% СЭК и была обозначена нами как «ослабленная». В дальнейшем, мы вели эти культуры параллельно до IV-VI пассажа. Такое значительное уменьшение СЭК приводило к стабильному снижению (примерно в 3 раза) пролиферации клеток. Перед облучением ММСК низкоинтенсивными полями клетки обрабатывались 0,25% трипсином и снимались с пластика. Суспензии ММСК объемом 3 мл разливались по пластиковым пробиркам с диаметром 15 мм. В каждой из пробирок содержалось около 3×10^5 клеток.

Облучение суспензии «нормальных» и «ослабленных» клеток проводили следующими полями:

— излучением He-Ne лазера (лазерный аппарат ЛГН-213-1, длина волны 0,63 мкм, мощность 0,8 мВт, интенсивность облучения 0,4 мВт/см², время воздействия 60 с);

— КВЧ — излучением (аппарат «Аквастин» фирмы ИРЭ-Полюс, длина волны 7,1 мм, интенсивность облучения 5 мВт/см², время воздействия 10 с, 30 с и 60 с);

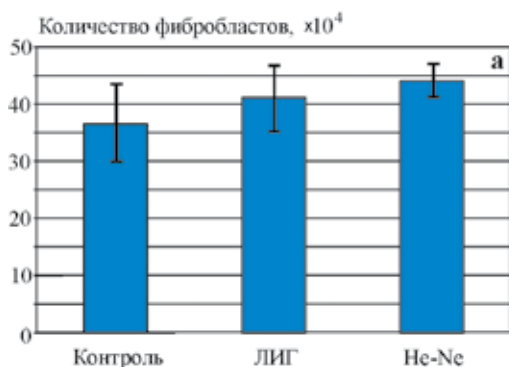
— полем ЛИГ (использовался волоконный лазерный аппарат ЛС-0,97 фирмы ИРЭ-Полюс, длина волны 0,97 мкм, мощность 3 Вт, время воздействия 60 с).

Использовались следующие методики облучений. Для воздействия излучением He-Ne лазера использовался расходящийся лазерный луч, образованный с помощью линзы с фокусным расстоянием 10 мм. Пробирка с культурой ММСК устанавливалась на расстоянии 40 см от линзы, где интенсивность облучения соответствовала выбранному значению 0,4 мВт/см². Для воздействия КВЧ — излучением предварительно отцентрифугированные пробирки с суспензией ММСК располагались внутри конусной антенны КВЧ аппарата таким образом, чтобы зауженное дно пробирки устанавливалось на излучающем торце головки аппарата. При воздействии полем ЛИГ пробирка с клеточной суспензией устанавливалась в кювету с водой. Там же в воде на расстоянии около 5 мм от пробирки закреплялся фрагмент куриной кости, в которой кварцевым волокном аппарата ЛС-0,97 прожигались (формировались) лазерные каналы. Формирование каналов проводилось контактно кварцевым волокном диаметром 400 мкм. При этом вблизи торца волокна развивались активные гидродинамические процессы, которые порождали широкополосные акустические сигналы [9, 12], воздействующие на ММСК в пробирке. Контроль параметров лазерного излучения проводился с помощью измерителя мощности FieldMaster (Coherent, США).

Фибробласты из каждой облученной пробирки и пробирок с контролем эксплантировали в три культуральных флакона площадью 25 см². Клетки выращивались в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 дней. Для

определения пролиферативной активности ММСК культуры обрабатывались раствором TrypLe, затем проводился подсчет выросших фибробластов с помощью счетчика клеток Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen). По результатам измерений вычислялись средние значения и стандартные отклонения. Существование различий между отдельными выборками проверяли с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение



всех экспериментов выше контрольных значений. Наибольшее отличие от контроля (уровень значимости $p \leq 0,01$) зарегистрировано при воздействии на «ослабленные» клетки с помощью ЛИГ и КВЧ (при времени воздействия 10 с и 30 с). При этом пролиферативная активность ММСК при воздействии на суспензию «ослабленных» клеток за счет процессов ЛИГ в течение 60 с (рис. 1б) и КВЧ излучением в течение 10 с (рис. 2б) возросла на 30%. Увеличение времени воздействия КВЧ излучением до 30 с (рис. 2б) привело

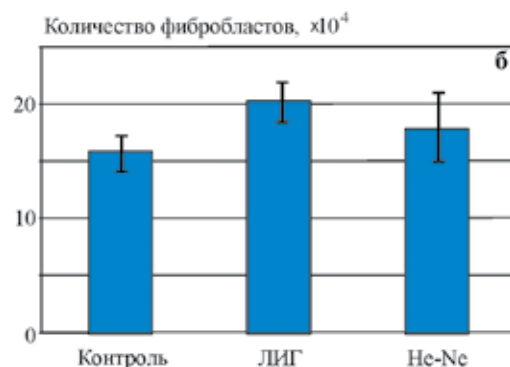


Рис. 1. Пролиферация «нормальных» (а) и «ослабленных» (б) ММСК после облучения полем ЛИГ и низкоинтенсивным излучением He-Ne лазера.

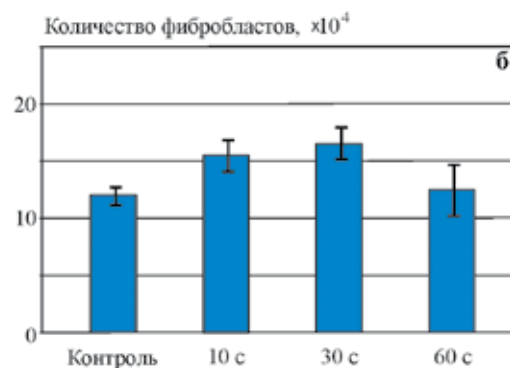
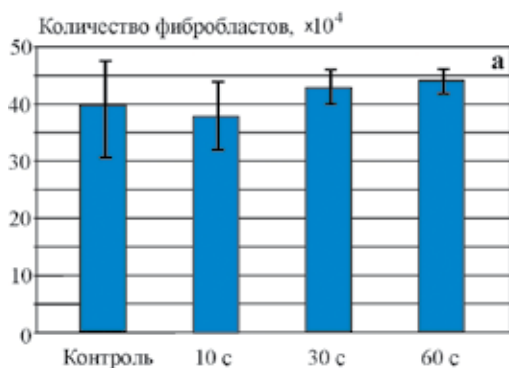


Рис. 2. Пролиферация «нормальных» (а) и «ослабленных» (б) ММСК после облучения КВЧ излучением при различных временах воздействия.

На рисунках 1 и 2 представлены полученные результаты. Как видно из рисунков, средние значения количества выросших фибробластов практически для

лю к усилению пролиферативной активности ММСК по сравнению с контролем до 40%. Однако дальнейшее увеличение времени воздействия КВЧ излучения до

60 с привело к нивелированию позитивного эффекта. Таким образом, результаты наших исследований, проведенных на ММСК, показывают, что эффект от воздействия на клетки различными физическими факторами существенно зависит от состояния самих клеток. Такие воздействия, практически не действуют на ММСК в состоянии «норма», но увеличивают пролиферативную активность клеток, находящихся в «ослабленном» состоянии.

Выводы

Используемые нами факторы физического воздействия на ММСК (электромагнитное излучение гелий-неонового лазера, КВЧ излучение крайне и интенсивные акустические волны, генерируемые в условиях лазеро-индуцированной гидродинамики) увеличивают их пролиферативную активность. Максимальный эффект усиления наблюдался при воздействии на «ослабленные» ММСК, культивирование которых проводилось на питательных средах с дефицитом СЭК. Полученные результаты открывают новые возможности терапевтического применения указанных физических воздействий, в частности, при использовании ММСК в клеточных технологиях и тканевой инженерии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 10-02-01472, 09-02-00714, 10-02-00672).

Список литературы

1. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под. ред. М.А. Пальцева. — М.— Медицина. — 2009. — с. 728.

2. Бухарова Т.Б., Антонов Е.Н., Попов В.К., Фатхудинов Т.Х., Попова А.В., Волков А.В., Бочкова С.А., Баграташвили В.Н., Гольдштейн Д.В. Биосовместимость тканеинженерных конструкций на основе пористых полилактидных носителей, полученных методом селективного лазерного спекания, и мультипотентных стромальных клеток костного мозга // Клеточные Технологии в Биологии и Медицине. — 2010. — № 1. — с. 40-46.

3. Кару Т.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Успехи современной биологии. — 2001. — Т.121. — № 1. — с.110-120.

4. Крочек И.В., Привалов В.А., Лапна А.В. и др. Лазерная остеоперфорация в лечении острого и хронического остеомиелита // Методические рекомендации.— Челябинск: ЧГМА, ЧГУ. — 2004. — с. 34.

5. Лазерная инженерия хрящей // под ред. Баграташвили В.Н., Соболев Э.Н., Шехтер А.Б. — М.: Физматлит. — 2006. — с. 488.

6. Низкоинтенсивная лазерная медицина // под ред. Москвин С.В., Буйлин В.А. — М.: ТОО “Техника”. — 2000. — с. 724.

7. Осепян И.А., Чайлахян Р.К., Гарибян Э.С., Айвазян В.П. Лечение несросшихся переломов, ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией аутологичных костномозговых фибробластов, выращенных in vitro и имплантированных в АГМ // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1987. — Т.9. — с.96-98.

8. Сандлер Б.И., Суляндзига Л.Н., Чудновский В.М. и др. Перспективы лечения дискогенных компрессионных форм пояснично-крестцовых радикулитов с помощью пункционных неэндоско-

пических лазерных операций, — Владивосток: Дальнаука. — 2004. — с.180.

9. **Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Бецкий О.В., Гуляев Ю.В.** Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы // под ред. Ю.В. Гуляева, А.Х. Тамбиева. — М.: «Радиотехника». — 2003. — с.175.

10. **Чайлахян Р.К.** Восстановление гиалинового хряща путем трансплантации стромальных клеток предшественников костного мозга, выращенных *in vitro*. // Сборник материалов Всероссийского симпозиума «Коленный сустав», — Москва. — 1999. — с. 75-77.

11. **Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В., Свиридов А.П., Кондюрин А.В., Тамбиев А.Х., Баграташвили В.Н.** Действие ИК лазерного излучения на стволовые стромальные клетки костного мозга крыс *in vivo* // Российский иммунологический журнал. — 2009. — Т. 3(12). — № 3-4. — с. 318-322.

12. **Чудновский В.М., Буланов В.А., Юсупов В.И., Корсков И.В., Косарева**

О.В., Тимошенко В.С. Экспериментальное обоснование лазерного пункционного лечения остеохондроза позвоночника // Лазерная медицина. — 2010. — Т.14. — вып.1. — с.30-34.

13. **Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А., Дроздов А.Л., Юсупов В.И.** Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии / Владивосток: Дальнаука. — 2002. — с.157.

14. **Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov J.V.** Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation chambers. // Cell Tissue Kinet. — 1987. — №20. — p.263-272.

15. **Lin F., Josephs S.F., Alexandrescu D.T. et al.** Laser, stem cell, and COPD // Journal of Translational Medicine. — 2010. — V. 8. — p. 16-26.

16. **Yusupov, V.I. Chudnovskii, and V.N. Bagratashvili.** Laser-Induced Hydrodynamics Water-Saturated Biotissues. 1. Generation of Bubbles in Liquid // Laser Physics. — 2010. — V. 20. — №7. —p.1641-1647.

Effect of hydrodynamic processes and low-intensity radiation with wavelengths 0,63 μm and 7,1 mm on the proliferative activity of bone marrow stromal stem cells *in vitro*

R.K Chailakhyan, V.I Yusupov, J.V. Gerasimov, P.A. Sobolev, A.H. Tambiev, N.N. Vorobieva, A.P. Sviridov, V.N.Bagratashvili

The effects of He-Ne laser and extremely high frequency (wavelength 7,1mm) radiations as well as of laser induced hydrodynamic processes on the proliferation of bone marrow stromal stem cells *in vitro* were studied. We have tested stem cells in states «normal» and «suppressed». Suppression of cells was realized by reduction of cow embryo serum concentration in a nutrient medium of cultivated cells. It is shown that applied physical impacts have minor effects on «normal» bone marrow stromal stem cells, but stimulate proliferation of «suppressed» cells.

Key words: stem cells, bone marrow stromal stem cells, laser radiation, extremely high frequency, laser induced hydrodynamical field

Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга

Н.В. Касинская, О.И. Степанова, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Х.Х.Семенов, Т.Б. Бескова, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, С.Е. Деньгина

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Контактная информация: Степанова Ольга Ивановна olsima50@mail.ru

Изучено морфологическими методами выявление донорского маркера гена зеленого белка у мышей-реципиентов больных сахарным диабетом 2 типа и подтверждено путем проведения полимеразной цепной реакции наличие гена зеленого белка на длительных сроках в организме животных.

Ключевые слова: мыши B.10GFP, идентификационная метка, клетки костного мозга.

Результаты современного состояния проблемы введения и выявления идентификационной метки показывают, что эти процессы достаточно трудоемки и дороги, однако при использовании донорских клеток костного мозга, содержащих ген зеленого белка от мышей линии B.10GFP и созданных нами праймеров для полимеразной цепной реакции от данных мышей, упростили и более точно решили эти проблемы.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности выявления донорских клеток костного мозга, содержащих метку гена зеленого белка, после их трансплантации мышам-реципиентам с генетической моделью СД 2 типа на длительных сроках.

Материалы и методы

Данное исследование проводилось на базе НЦБМТ РАМН. В эксперименте были задействованы здоровые трансгенные мыши линии B.10GFP, обоих полов, в возрасте 3 месяцев, использовавшиеся в качестве доноров клеток костного мозга (ККМ). Реципиентами ККМ являлись гомозиготные по гену диабе-

та мыши линии C57BL/KsJYLepr^{db/+} (db/db), обоих полов, аналогичного возраста. Для осуществления аллогенной трансплантации стволовых клеток использовали гемопоэтическую фракцию костного мозга. Способ введения ККМ — внутривенный.

Реципиентам — мышам db/db проводили двукратное введение аллогенных гемопоэтических клеток костного мозга (ГПККМ) по 8-9 млн. (всего 16-18 млн. клеток) с интервалом в 7 дней; клетки были предварительно культивированы 5-7 суток; общий срок наблюдения составил 60, 120 и 224 суток.

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах. Время гибели животных — 30-40 минут. Жизнеспособность клеток гемопоэтической фракции ККМ исследовалась с помощью их окрашивания трипановым синим.

Забор клеток костного мозга у мышей-доноров осуществлялся под наркозом, в качестве которого был использован диэтиловый эфир. Соблюдая стерильность, у доноров иссекали кости

предплечья, плеча, голени и бедра (вместе с суставами), отделяя их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы, и с помощью шприцев (объемами 1 и 2 мл) вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала. Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 минут при 1500 об./мин.; осадок клеток ресуспендировали в лизирующем растворе (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:1, при комнатной температуре (22°C), в течение 1 мин., а затем центрифугировали 5 мин. при 1500 об./мин., добиваясь полного лизиса эритроцитов. Гемолизированный супернатант полностью удаляли отсасыванием с помощью водоструйного насоса, а клеточный осадок, содержащий мононуклеарные клетки (МНК) и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ), ресуспендировали в ростовой среде DMEM (ПанЭко), с добавлением 25мМ HEPES , 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Через 5-7 суток отбирали не прикрепившиеся к пластику клетки, которые затем использовали в опытах на животных как очищенную от стромальных (пластикадгезивных) клеток мононуклеарную фракцию гемопоэтических клеток. Полученная культура МНК была готова для трансплантации.

Криосрезы внутренних органов делали на криостате (для быстрого замораживания образцов тканей) фирмы «LEICA» (Германия) при температуре -18-24°C, толщина срезов составляла 5-6 микрон. Фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию клеточного материала от доноров и криосрезы внутренних органов реципиентов проводили

на микроскопе фирмы «NIKON» (Япония). Флуоресцентную микроскопию проводили с использованием ультрафиолетового излучения с длиной волны 390 нм. Для фотографирования использовали цифровой фотоаппарат фирмы «OLYMPUS» (Япония).

Наличие гена, продуцирующего белок с зеленой флуоресценцией (GFP-green fluorescent protein) и содержащегося в ядрах клеток доноров, по присутствию которого можно идентифицировать клетки — как в культуре, так и после трансплантации во внутренних органах реципиентов (мышей db/db), выявляемые в криопрепаратах с помощью люминесцентной микроскопии — было подтверждено проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс выявления проводился в три этапа:

1. Выделение ДНК из пробы печени доноров и реципиентов (мышей db/db) при помощи набора Diatom DNA Prep 100 (ООО «Компания Биокон», Россия), по инструкции фирмы-производителя.

2. Амплификация геномной ДНК. Проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия).

3. Идентификация ПЦР-продуктов методом горизонтального электрофореза. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора GellChemi Doc («Bio-Rad» США).

Содержание реакционной смеси (объем — 25 мкл):

- 1,0 мкл геномной ДНК;
- 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы;
- 2,5 мкл 10x буфера;
- 2,5 мкл 25 mM хлорида магния;
- 0,5 мкл 10 mM dNTP;
- 0,5 мкл 10 M primers

(первая пара —

5'-CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC T-3'

5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGA T-3'

вторая пара —

5'-CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC T-3'

5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGAT-3');

- 17,8 мкл воды.

Протокол амплификации
включал:

1 цикл: 94°C — 3 минуты;

2 цикл : 94°C — 15 секунд

62°C — 30 секунд

72°C — 30 секунд. 38 циклов

3 хранение 4°C.

Результаты и их обсуждение

Для выявления связи клинических, биохимических и морфологических изменений наступающих в организме мышей db/db с СД 2 типа после проведения клеточной терапии с распределением ККМ в организме и их жизнеспособностью — нами были проведены исследования с аллогенными донорскими ККМ — мышей V.10GFP при внутрибрюшинном введении их мышам db/db. ККМ выявляли в криопрепаратах разных органов на 60 и 120 сутки после введения с помощью люминесцентной микроскопии, т.к. введенные клетки содержат флуоресцирующий ген зеленого белка (390 нм). Наше исследование показало, что на 60 и 120 сутки после внутрибрюшинного введения введенные клетки достигают разных органов и не погибают, а сохраняют свою жизнеспособность. Люминесцентная микроскопия по флуоресценции криосрезов разных органов позволила нам выявить донорские клетки в поджелудочной железе, селезенке, почках, печени (рис. 1, рис. 2) и связать возникающие в этих органах из-

менения (морфологические и функциональные) со стимуляцией в этих органах процессов адаптации и компенсации [2, 3, 6, 7, 8, 9, 10].

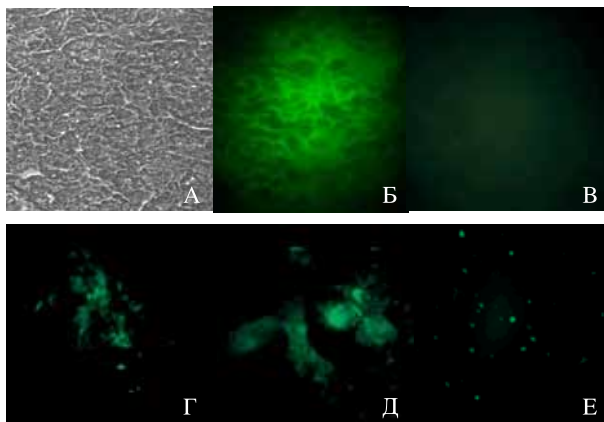


Рис. 1. Распределение донорских ККМ (мышей V.10GFP) в органах через 60 суток после внутрибрюшинного введения их реципиентам db/db. Увел. x 200

А — поджелудочная железа донора V.10GFP (с геном зеленого белка); фазово-контрастная микроскопия; Б — поджелудочная железа донора V.10GFP; люминесцентная микроскопия; В — поджелудочная железа реципиента db/db с СД 2 типа без введения ККМ, люминесцентная микроскопия; Г — поджелудочная железа реципиента после введения ККМ; Д — селезенка после введения ККМ; Е — почка после введения ККМ; люминесцентная микроскопия.

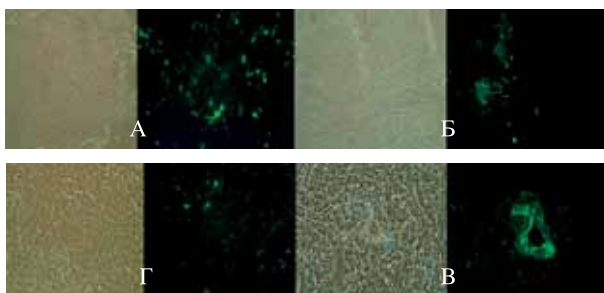


Рис. 2. Распределение донорских ККМ (мышей V.10GFP) в органах через 120 суток после внутрибрюшинного введения реципиентам db/db; Увел. x 200

А — поджелудочная железа; Б — печень; В — селезенка; Г — почка (флуоресцентное свечение в периваскулярных участках почечной артерии); слева — фазово-контрастная микроскопия; справа — люминесцентная микроскопия; Увел. x 400.

Сопоставление результатов морфологического исследования органов при про-

ведении клеточной терапии аллогенными ККМ на фоне развернутой клинической картины СД (через 3 мес. после рождения) показывает, что клеточная терапия оказывала положительный эффект, а также использование донорского материала ККМ содержащих ген-зеленого белка позволила нам использовать их как идентификационную метку на длительных сроках после введения.

Гистологическим методом мы выявили у реципиентов во внутренних органах присутствие донорского гена-зеленого белка на 60 и 120 сутки после введения, что также нами было подтверждено с помощью более точного ПЦР метода их присутствие у реципиентов не только в те же сроки (рис.3 А.,Б), но и выделить их на более отдаленном сроке, т.е. через 224 сутки после введения ККМ (рис.3 В.) когда животные пали естественной смертью и где длительность жизни реципиентов составила 314 дней (в группе контроля без лечения ККМ длительность жизни животных db/db составила 199 дней [1, 4, 5]).

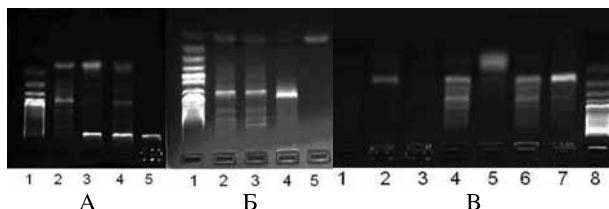


Рис. 3. Электрофоретический спектр продуктов амплификации от реципиента db/db на 60-120-224 сутки после введения аллогенных донорских клеток костного мозга

А — на 60 сутки после введения ККМ; 1- маркер молекулярной массы; 2- без гена зелёного белка; 3- наличие гена зелёного белка; 4- наличие гена зелёного белка; 5- наличие гена зелёного белка; Б — на 120 сутки после введения ККМ; 1 — маркер молекулярной массы; 2 — наличие гена зелёного белка; 3 — наличие гена зелёного белка; 4 — наличие гена зелёного белка; 5 — без гена зелёного белка; В — на 224 сутки после введения ККМ; 1, 3, 5 — без гена зелёного белка; 2, 4, 6, 7 — с геном зелёного белка; 8 — маркер молекулярной массы.

Выводы

1. В качестве установления идентификационной метки донорского материала возможно использование клеток костного мозга мышей линии B.10GFP.
2. Аллогенные клетки костного мозга после трансплантации сохраняются в организме реципиента (мышь линии C57BL/KsJYLepr^{db/+}) в течение длительного времени, участвуя в процессах морфогенеза внутренних органов.
3. Введение клеток костного мозга позволяет в 1,6 раза увеличить сроки жизни животных по сравнению с контролем (СД 2 типа без клеток костного мозга).
4. Пролонгированное поддержание восстановительного морфогенеза поврежденных органов при моделировании СД 2 типа обусловлено длительным (120 дней) сохранением жизнеспособности введенных клеток костного мозга, что подтверждается люминесценцией клеток костного мозга мышей B10.GFP содержащих ген зеленого белка.
5. Создание новых праймеров от мышей линии B.10GFP позволило более

точно подтвердить наличие донорских клеток в организме реципиентов (через 60 и 120 дней) и выявить в более отдаленные сроки (224 дней).

Список литературы

1. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М: ВПК. — 2004. — с. 217с.
2. **Онищенко Н.А.** Инфузия регуляторных пептидов селезенки, трансплантация стволовых клеток костного мозга как два подхода к восстановительному лечению поврежденных органов. // Вестн.

трансплантолог и искусств. органов. — 2002. — № 3. — с. 91-92.

3. **Румянцев А.Г., Масчан А.А.** Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. // Изд. Медицинское информ. Агентство, Москва. — 2003. — с. 910.

4. **Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Галахова Т.В., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.** Мыши линии C57BL/KsLepr^{db}/+ как генетическая модель сахарного диабета 2 типа. // М. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2007. — № 12. — с. 664-667.

5. **Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Галахова Т.В., Онищенко Н.А., Касинская Н.В.** Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышях линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ // М. Биомедицина. — 2009. — № 2. — с. 28-40.

6. **Степанова О.И., Онищенко Н.А., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В., Га-**

лахова Т.В. Использование клеток разных фракций аллогенного костного мозга для терапии сахарного диабета типа 2 на генетической модели. // М. Биомедицина. — 2008. — № 2. — с.78-81.

7. **Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., и др.** Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановления терапии поврежденных органов. // Вестник трансплантации и иск. органов. — 2002. — № 4. — с. 3-6.

8. **Chen L.B., Jiang X.B., Yang L.** Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. // World J. Gastroenterol. — 2004. — 10(20). — p. 3016-3020.

9. **Hess D., Li L., Martin M. et al.** Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. // Nat. Biotechnol. — 2003. — 21(7). — p. 763-70.

10. **Raffii S., Lyden O.** Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. // J. Nat. Med. — 2003. — № 9. — p. 702-712.

Green protein gene as a marker of the stem and progenitor bone marrow cell transplantation

N.V. Kasinskaya, O.I. Stepanova, N.N. Karkishchenko, V.N. Karkishchenko,
H.H. Semenov, T.B. Beskova, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, S.E. Dengina

Morphological methods of identification of the donor marker green protein gene in mice-recipients patients with type 2 diabetes and is confirmed by the polymerase chain reaction in the presence of the gene of green protein for a long time in the body of animals were studied

Key words: mouse B.10GFP, an identification mark, the cells of the bone marrow.

Методы прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ с применением компьютерного моделирования

И.Е. Шохин, Г.В. Раменская

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

Контактная информация: ramenskaia@mail.ru Галина Владиславовна Раменская

Статья посвящена основным подходам, применяемым для оценки кишечной проницаемости лекарственных веществ с использованием компьютерного моделирования (методов *in silico*). Приведена взаимосвязь некоторых физико-химических параметров субстанций ($\log P$, $C \log P$, $\log D$) и коэффициента кишечной проницаемости, а также достоверность данной корреляции. Описаны основные компьютерные программы, применяемые для прогнозирования проницаемости, и модели, лежащие в основе их функционирования.

Ключевые слова: абсорбция, проницаемость, коэффициент распределения, методы *in silico*.

Важной задачей современной биомедицины и биофармации является понимание процесса доставки лекарственного вещества (ЛВ) до органов и клеток-мишеней при внутреннем применении.

Проницаемость ЛВ можно достоверно определить в исследованиях *in vivo* на здоровых добровольцах: например, определением абсолютной биодоступности (относительно внутривенного введения), анализом массового баланса, исследованиями методом кишечной перфузии [2-4]. Подобные данные являются наиболее точными, однако также трудоемкими и дорогостоящими, а также вовлекают в испытание здоровых добровольцев, что вызывает дополнительные этические сложности. Например, значение коэффициента кишечной проницаемости на здоровых добровольцах к настоящему моменту было определено лишь для 29 субстанций [5]. В связи с этим получение данных *in vivo* не может быть приемлемо для рутинного анализа или для скри-

ниговых целей при поиске новых лекарственных средств.

Поэтому перед исследователями в последние 15 лет стояла задача разработать косвенный метод оценки кишечной проницаемости. Среди моделей, позволяющих оценить проницаемость ЛВ без вовлечения здоровых добровольцев, можно выделить 3 основные группы: исследования *in situ* (например, на тонком кишечнике крыс) [6], исследования *in vitro* (например, на монослое клеток Caco-2) [7], а также исследования *in silico*, то есть путем компьютерного моделирования [5, 8, 9].

Взаимосвязь структуры и физико-химических свойств молекулы с проницаемостью

Двумя основными свойствами ЛВ, влияющими на его кишечную проницаемость, являются его растворимость в водных средах и его липофильность. Для того чтобы субстанция абсорбировалась

через стенку кишечника, она, с одной стороны, должна быть достаточно растворимой в средах ЖКТ, чтобы достигнуть слизистой оболочки, с другой стороны — достаточно липофильной, чтобы проникнуть через липидный бислой мембран энтероцитов путем пассивной диффузии. На данные параметры влияют, в первую очередь, ионизация вещества, его кислотно-основные свойства, молекулярная масса, водородные связи, распределение заряда и т.д. [10]. Общепринятым термином, характеризующим связь между структурой вещества, и каким-либо его свойством (в том числе и биологическим), является *QSAR* — *quantitative structure-activity relationship* (синоним *QSPR* — *quantitative structure-property relationship*) [11]. Среди многочисленных подходов оценки такой взаимосвязи между структурой вещества с его биодоступностью наибольшее распространение нашло «правило пяти», разработанное Lipinski. Данное правило утверждает, что оптимальной биодоступностью обладают субстанции, которые:

1. имеют молекулярную массу менее 500;
2. имеют значение коэффициента распределения октанол-вода ($\log P$) менее или равное 5;
3. количество доноров протонов (групп -NH и -OH) менее 5;
4. количество акцепторов протонов (атомов N- и O-) менее 10.

Если два или более из этих требований не будут соблюдены, существует высокий риск низкой биодоступности соединения [12].

Взаимосвязь проницаемости и липофильности молекулы

Физико-химическим свойством моле-

кулы, вносящим наибольший вклад в ее проницаемость, является липофильность. Мерой липофильности является коэффициент распределения октанол-вода ($\log P$) — логарифм отношения концентраций неионизированной субстанции в системе двух несмешивающихся жидкостей — *n*-октанол и вода [11]. Для ионизируемых молекул липофильность более достоверно характеризуется коэффициентом $\log D$, который учитывает как неионизированную, так и ионизированную долю вещества в водной фазе. Коэффициент распределения, определенный экспериментально, имеет высокую степень корреляции, между таковым, определенным путем компьютерного моделирования с использованием методов QSAR. Коэффициент распределения, рассчитанный при помощи программы BioLoom (компания Biobyte, США), называется *C log PTM* (calculated $\log P$) и является «золотым стандартом» для прогнозирования липофильности *in silico* [13]. В настоящее время существует ряд программ, достоверно определяющих данный параметр на основании структуры молекулы [5].

Kasim с соавторами на основании предположения о ключевой роли липофильности в процессе всасывания ЛВ, оценили взаимосвязь между коэффициентами распределения $\log D$, $\log P$ (рассчитанные с помощью программы ChemDraw Ultra 6.0) и *C log P* (BioLoom 5.0) и коэффициентом проницаемости *Pe_{eff} in vivo*, полученным на здоровых добровольцах, для 29 ЛВ. В качестве стандартного вещества использовали метопролол — вещество с биодоступностью более 95 % ($\log P = 1,72$; *Pe_{eff} in vivo* = $1,34 \times 10^{-4}$ см/с) [5]. Среди исследуемых ЛВ было 14 субстанций, входящих в модельный перечень референтных веществ FDA [2] для оценки проницаемости косвенными методами.

По результатам проведенного исследования по показателю $\log P$ для 18 из 26 ЛВ была получена корректная классификация относительно метопролола (69 %); для референтных субстанций из модельного перечня FDA совпали данные 11 из 12 ЛВ (92 %). Для показателя $\log P$ данные *in vivo* и *in silico* качественно совпали для 18 из 28 субстанций (64 %), при этом для перечня FDA проницаемость была корректно классифи-

цирована для 11 из 13 ЛВ (85 %). Дополнительно, для коэффициента $\log D$ была получена правильная классификация для 13 из 15 исследуемых веществ (87 %) [5].

Для перечня FDA в целом правильная классификация проницаемости была получена для 14 из 20 субстанций (70 %) (табл. 1). Критерием «высокой» проницаемости было значение биодоступности 90 % и более.

Таблица 1

Корреляция между кишечной проницаемостью и коэффициентом распределения октанол-вода для модельного перечня референтных субстанций FDA

ЛВ	Проницаемость ¹	$\log P^2$
антипирин	высокая	низкий (л/о)
кофеин	высокая	низкий (л/о)
карбамазепин	высокая	высокий
флувастатин	высокая	высокий
кетопрофен	высокая	высокий
метопролол	высокая	высокий
напроксен	высокая	высокий
пропранолол	высокая	высокий
теофиллин	высокая	низкий (л/о)
верапамил	высокая	высокий
амоксциллин	низкая	низкий
атенолол	низкая	низкий
фуросемид	низкая	высокий (л/п)
гидрохлоротиазид	низкая	низкий
маннитол	низкая	низкий
α -метилдофа	низкая	низкий
ПЭГ-400	низкая	низкий
ПЭГ-1000	низкая	низкий
ПЭГ-4000	низкая	низкий
ранитидин	низкая	низкий

данные таблицы приведены по [14]

1 — согласно руководству FDA [2]

2 — относительно метопролола ($\log P = 1,72$)

л/о — ложноотрицательный результат

л/п — ложноположительный результат

Недостатком модели всасывания, основанной на липофильности, является то, что она не учитывает механизмы всасывания ЛВ, которые отличаются от простой диффузии (активный транспорт с участием переносчиков). Среди исследуемых субстанций, которые были некорректно классифицированы на основании коэффициента распределения, 7 абсорбировались путем активного транспорта (ложноотрицательные результаты) и 2 являлись субстратами эфлюкс-транспортеров (ложноположительные результаты). Таким образом, из всего перечня исследуемых ЛВ 20 из 29 абсорбировались путем простой диффузии, при этом для 19 из них проницаемость, определенная *in silico*, качественно совпала с таковой, определенной *in vivo*, то есть достоверность описанного метода для подобных ЛВ составила 95 % [14].

Принципы работы компьютерных программ компьютерного моделирования абсорбции

Наиболее известными коммерчески доступными компьютерными программами для прогнозирования абсорбции, распределения, метаболизма и выведения ЛС являются GastroPlus™ (компания SimulationsPlus, США) и iDEA™ (компания Lion Biosciences, Германия) [15].

Принцип работы программы GastroPlus™ основан на оценке биодоступности ЛВ в ЖКТ исходя из его растворимости и коэффициента кишечной проницаемости. Первичными входными данными для программы является структурная формула молекулы. На основании структуры первый модуль программы рассчитывает его растворимость, ко-

эффициент распределения октанол-вода и другие физико-химические свойства. На основании растворимости и $\log P$ рассчитывается коэффициент проницаемости, что возможно благодаря значительному количеству данных по корреляции проницаемости с липофильностью, имеющемуся в программе [15]. Далее GastroPlus™ определяет проницаемость ЛВ при помощи модели ACAT (Advanced Compartmental Absorption and Transit), согласно которой кишечник подразделяется на 7 частей, каждой из которых соответствует определенный pH, среднее время нахождения ЛВ в данной части и объем среды растворения [16]. Кроме того, данная программа позволяет описать всю фармакокинетику, метаболизм, прохождение через ГЭБ, токсичность, лекарственное взаимодействие и ряд других свойств [17].

Базовые принципы программы iDEA™ не отличаются существенно от таковых у программы GastroPlus™ — она моделирует поведение потока жидкости с ЛВ в тонком кишечнике, который также подразделяется на несколько фрагментов. Для каждого из фрагментов рассчитывается доля всосавшегося ЛВ на основании его растворимости, проницаемости и площади поверхности кишечника. Для достоверной оценки биодоступности iDEA™ учитывает возможный эффект первичного прохождения через печень [15].

В целом, обе программы обеспечивают достоверность данных порядка 68%-79% (при качественной оценке биодоступности). GastroPlus™ является более многофункциональной программой, что требует высокого уровня квалификации персонала при работе с ней, в то время как iDEA™ является более простой и

удобной в обращении, однако не позволяет реализовать многие возможности, доступные в GastroPlus™ [15].

Очевидно, что методы компьютерного моделирования являются наиболее простыми при оценке кишечной проницаемости, однако поскольку они не учитывают ряда реальных физиологических факторов (например, роль белков-переносчиков, наличие слизи в ЖКТ, моторики и др.), методы *in silico* рекомендуется использовать для первичного прогнозирования и скрининговых целей при изучении абсорбции ЛВ.

Список литературы

1. **Amidon G.L., Lennerlas H., Shah V.P., Crison J.R.** A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability // *Pharmaceutical Research*. — 1995. — № 12. — p. 413–420.
2. Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S., Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (HHS-FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). — 2000.
3. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. World Health Organization (WHO). — 2006.
4. Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). — 2010.
5. **Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L.** Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification // *Molecular Pharmaceutics*. — 2004. — Vol. 1. — № 1. — p. 85–96.
6. **Kim J.-S., Mitchell S., Kijek P., Tsume Y., Hilfinger J., Amidon G.L.** The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS Class I biowaiver requests // *Molecular Pharmaceutics*. — 2006. — Vol. 3. — № 6. — p. 686–694.
7. **Yee S.** In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man — Fact or myth // *Pharmaceutical Research*. — 1997. — Vol. 14. — № 6. — p. 763–766.
8. **Dahan A., Miller J.M., Amidon G.L.** Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs // *AAPS J.* — 2009. — Vol. 11. — № 6. — p. 740–746.
9. **Takagi T., Ramachandran C., Bermejo M., Yamashita S., Yu L.X., Amidon G.L.** Provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan // *Molecular Pharmaceutics*. — 2006. — Vol. 3. — № 6. — p. 631–643.
10. **Головенко Н.Я., Борисюк Ю.И.** Биофармацевтическая классификационная система — экспериментальная модель прогнозирования биодоступности лекарственных средств // *Биомедицинская химия*. — 2008. — Т. 54. — №. 4. — с. 392–407.

11. *Hansch C., Leo A., Mekapatia S.B., Kurup A.* QSAR and ADME // Bioorganic & Medicinal Chemistry. –2004. — № 12. — p. 3391–3400.
12. *Кубиньш Г.* В поисках новых соединений-лидеров для создания лекарств // Российский Химический Журнал. — 2006. — Т. 50. — № 2. — с. 5-17.
13. <http://www.biobyte.com/index.html>. Проверено 22.03.2011.
14. *Benet L., Amidon G.L., Barends D., Lennernäs H., Polli J.E., Shah V.P., Stavchansky S., Yu L. X.* Application of BDDCS to Predict Drug Disposition // Pharmaceutical Research. — 2008. — Vol. 52. — № 3. — p. 483–488.
15. *Boobisa A., Gundert-Remyb U., Kremersc P., Macherasd P., Pelkonen O.* In silico prediction of ADME and pharmacokinetics. Report of an expert meeting organised by COSTB15 // European Journal of Pharmaceutical Sciences. — 2002. — Vol. 17. — p. 183–193.
16. *Johansson R., Paterson R.* Physiologically based in silico models for the prediction of oral drug absorption. In: Drug absorption studies. In situ, in vitro and in silico models. AAPS Press, NY, USA. — 2008. — P. 486-510.
17. <http://www.simulations-plus.com/Products.aspx?grpID=3&cID=16&pID=11>. Проверено 22.03.2011.

Methods of forecasting of the intestinal permeability of medicinal substances with the use of computer simulation

I.E. Shohin, G.V. Ramenskaya

Paper of Shohin I.E. and Ramenskaya G.V. is devoted to general approaches for evaluation of intestinal permeability of drugs using computer modeling (in silico methods). Relationship of several physical-chemical properties of drug substances ($\log P$, $C \log P$, $\log D$) and permeability coefficient, and reliability of this correlation. Main software programs using for intestinal permeability modeling and principles of their action are described.

Key words: absorbtion, permeability, partition coefficient, in silico methods.



Динамические показатели коррекции клетками костного мозга состояния мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+

О.И. Степанова¹, Н.Н. Каркищенко¹, Н.А. Онищенко², О.В. Баранова¹

¹ — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

² — ФНЦ Трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Росздравоустройства, Москва

Контактная информация: Степанова Ольга Ивановна olsima50@mail.ru

Полученные результаты новы, т.к. впервые применен метод лечения СД 2 типа с помощью аллогенных и изогенных культивированных клеток костного мозга. Метод лечения СД 2 типа впервые выполнен на отечественной генетической модели СД 2 типа, воспроизводящей клинические проявления СД 2 типа у человека. В работе были установлены условия, при которых оптимизируются эффекты лечения с помощью стволовых и прогениторных клеток костного мозга. Показано, что пролонгированный клинический эффект регуляции углеводного обмена и предотвращение глубоких структурных патогенетических нарушений во внутренних органах наступают при использовании клеток костного мозга в раннюю стадию развития СД 2 типа в высоких дозах или многократном применении умеренных доз клеток, что позволяет длительно компенсировать углеводный обмен за счет сохранения адекватной функциональной активности островкового аппарата поджелудочной железы. Эту работу можно рассматривать, как предклинический этап изучения возможности и перспективности применения клеток костного мозга в комплексном лечении СД 2 типа.

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

Сахарный диабет (СД) 2 типа относится к числу наиболее распространенных хронических неинфекционных заболеваний в мире и число больных СД продолжает, неуклонно расти. Несмотря на определенные достижения последних лет, современная медикаментозная терапия сахарного диабета по-прежнему не способна надежно препятствовать прогрессированию клинических проявлений СД и его осложнений, поэтому поиск и разработка новых подходов к лечению СД остается актуальной проблемой.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности коррекции

углеводного обмена, а также метаболических и иммунологических нарушений с помощью алло- и изогенных гемопоэтической и стромальной фракции клеток костного мозга (ККМ) при использовании генетической модели СД 2 типа на разных стадиях этого заболевания.

Материалы и методы

Для коррекции клинических и морфологических признаков СД 2 типа использовали модель гомозиготных мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ (db/db), эта модель имеет

стадийность течения заболевания и соответствующие патогенетические изменения внутренних органов.

В опытных группах использовали мышей в возрасте 1 мес. (первая стадия заболевания) и в возрасте 3-4 мес. (вторая стадия заболевания), а контрольную группу составили мыши с СД без введения ККМ.

Для коррекции клинических и патогенетических нарушений заболевания использовали аллогенные клетки (гемопозитической и стромальной фракций) ККМ от здоровых доноров мышей линии B10.GFP и изогенные клетки (гемопозитической и стромальной фракций) ККМ от фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии C57BL/KsJYLeprdb/+ (db/+). Введение ККМ проводили внутрибрюшинно, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, сроки наблюдения составили 2 и 4 месяца.

I. В опытной группе на второй стадии заболевания, когда имели место выраженные клинические признаки, было выполнено 6 серий наблюдений:

серия 1. — однократно введено 4,5-5 млн. культивированных гемопозитических аллогенных ККМ (ГПККМ);

серия 2. — однократно введено 4,5-5 млн. некультивированных аллогенных ККМ;

серия 3. — производилось 7-ми кратное введение ККМ: сначала 4-хкратно с интервалом в 7 дней введение культивированных аллогенных ГПККМ (общее количество 18-20 млн. клеток), а затем 3-хкратное с интервалом в 14 дней (общее количество 6-7,5 млн. клеток) культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных аллогенных ККМ (ММСК КМ);

серия 4. — 3-хкратное введение культивированных изогенных ГПККМ с интервалом 3-4 дня (общее количество 24-39 млн. клеток);

серия 5. — 3-хкратное введение с интервалом 14 дней культивированных изогенных ММСК КМ (общее количество 24-30 млн. клеток);

серия 6. — однократное введение 100 млн. культивированных изогенных ГПККМ.

II В опытной группе на первой стадии заболевания, характеризующейся начальными признаками СД, было выполнено 2 серии наблюдений:

— 7-ми кратное введение ККМ: сначала 4-хкратное введение аллогенных ГПККМ (общее количество 18-20 млн. клеток), затем 3-хкратное с интервалами 14 дней введение культивированных аллогенных ММСК КМ (общее количество 6,5-7 млн. клеток) (7-я серия) и однократное введение 100 млн. культивированных изогенных ГПККМ (8-я серия).

У мышей — реципиентов в динамике определяли в крови содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c), измеряли массу тела и массу внутренних органов; определяли объем выпитой воды и съеденного корма. Проводили в динамике гистологические исследования поджелудочной железы, печени, почек и селезенки.

Результаты и их обсуждение

После введения аллогенных ККМ у животных на 2-ой стадии СД (через 3-4 мес. после рождения) в серии 1 и 2 (где были введены одинаковые дозы клеток) наблюдали снижение показателей уровня глюкозы и HbA1c, более достоверный выраженный эффект был в серии 1 с использованием культивированных

клеток, а менее выраженный в серии 2 с некультивированными ККМ. Однако в серии 3 при многократном последовательном (7-ми кратном) применении аллогенных культивированных клеток удается достигнуть более пролонгированного воздействия на показатели углеводного обмена.

В 4 и 5 сериях после применения культивированных изогенных ККМ достоверно и в равной степени снижались показатели углеводного обмена по сравнению с контролем, однако эти показатели оставались выше, чем в 6-ой серии (с однократным введением в дозе 100 млн.). При введении такой дозы клеток удалось достигнуть более пролонгированного эффекта снижения показателей углеводного обмена (до 120 дней).

Считаем важным подчеркнуть, что аллогенные и изогенные ККМ во всех сериях при введении на 2-ой стадии СД не способствовали устойчивому снижению показателей углеводного обмена, они лишь стабилизировали его на уровне более низком по сравнению с контролем.

При введении ККМ 1-стадии заболевания в сериях 7 и 8 удалось достигнуть выраженного пролонгированного снижения показателей углеводного обмена (120 дней) до субнормальных величин: $6,9 \pm 2,82$ ммоль/л; $6,7 \pm 2,18$ ммоль/л и $4,4 \pm 0,55\%$; $4,4 \pm 0,57\%$ HbA1c соответственно.

Во всех сериях опытов масса тела, количество выпитой воды и аппетит животных стабилизировались и удерживались на одном уровне, но их выраженность была различной, так в серии 7 и 8 динамика этих показателей была близка к норме, а в контрольных группах с СД 2 типа за аналогичный период масса тела или повышалась, или понижалась в зависимости от стадии течения болезни. На-

блюдали снижение полиурии до её полного исчезновения, особенно в сериях на ранней стадии развития болезни и в сериях (на выраженной стадии болезни) с использованием 7-ми кратного введения и при введении 100млн. ККМ; отмечено также устранение мацерации кожных покровов в опытных сериях после клеточной терапии, когда в контрольных группах мацерация становилась не заживающей раной, которая оставалась у животного вплоть до его гибели.

Полученные позитивные эффекты клеточной терапии в опытных сериях с СД привели к пролонгированному увеличению сроков жизни животных, так сроки жизни были в 1,7-2,3 раза (2-ой стадии заболевания) и 2,5-2,7 раза (на ранней стадии болезни) больше по сравнению с контролем.

В поджелудочной железе (ПЖ) при введении культивированной взвеси аллогенных и изогенных ККМ отмечается положительный эффект, выражающийся в увеличении количества и размеров островков Лангерганса (ОЛ), увеличении базофильных β -клеток островков, высоко достоверные результаты получены в сериях в 7, 8 и 3,6.

С целью подтверждения сохранения нейроэндокринных клеток в составе ОЛ в опытных сериях, использовался метод иммуногистохимического (ИГХ) анализа с хромогрином А. Полученные данные показали, что положительное цитоплазматическое окрашивание выявляется практически во всех клетках островков в сериях с использованием ККМ при разных дозах введений. С целью установления наличия и степени пролиферативной активности клеток островковой части ПЖ после введения ККМ, нами также было выполнено ИГХ исследование (иммуннопероксидазный метод с АТ) с

использованием маркеров репликации ДНК - антител к Ki-67. Использование данных ИГХ маркеров показало наличие высокой пролиферативной активности островковых клеток особенно в сериях 7, 8 и в сериях 3, 6, 1, 4, 5; несколько менее выраженную активность в серии 2. В контроле окраска островковых клеток на хромогранин А и антителами Ki-67 — отсутствовала.

В печени после клеточной терапии у реципиентов наблюдали накопление гликогена от умеренной степени до выраженной, за счет улучшения в печени белкового и углеводного обменов. В опытных сериях признаки жировой дистрофии гепатоцитов отсутствовали и отмечалось хорошее накопление гликогена гепатоцитами всех отделов долек, особенно в серии 7 и 8. В контроле — были выраженными признаки жировой дистрофии печени и сниженное содержание гликогена в гепатоцитах.

В ткани селезенки под действием алло- и изогенных ККМ формируются крупные лимфоидные фолликулы, наблюдается интенсивная бластотрансформация лимфоидных клеток в селезенке, что свидетельствует о восстановлении структуры селезенки как иммуно-компетентного органа и о восстановлении её иммунорегуляторной активности. Восстановление структуры селезенки подтверждают морфометрические исследования её белой пульпы, а также массы селезенок, которые были достоверно выше в сериях 7,8 и 3,6.

В почках во всех экспериментальных сериях после клеточной терапии наблюдали снижение степени выраженности дистрофических изменений эпителия дистальных и проксимальных канальцев; исчезновение эозинофильных и PAS-положительных масс в просвете канальцев,

что было связано с нормализацией углеводного и жирового обменов в организме животных и более выраженные результаты получены в сериях 7 и 8.

В ходе экспериментальной работы была проведена оценка введенных аллогенных ККМ с геном зеленого белка, которая показала, что на 66 и 120 сутки после их введения, они не погибают в организме, а сохраняют свою жизнедеятельность, мигрируя в разные органы, в том числе в ПЖ и селезенку, стимулируя участие этих органов в ауторегенерации.

Выводы

Стволовые и прогениторные ККМ выполняют не заместительную, а биорегуляторную функцию.

Установлено, что выраженность терапевтического эффекта ККМ у мышей с СД 2 типа повышается: при использовании культивированных клеток; при повышении дозы и кратности введения ККМ, а также зависит от степени сохранности адаптационных резервов организма (т.е. от стадии заболевания), но не зависит от фенотипа используемых клеток (ГПККМ или ММСК КМ) и их гистосовместимости (аллогенные или изогенные клетки).

Введение ККМ на ранней стадии развития СД 2 типа (1 мес. после рождения) позволяет пролонгировано сохранять нормальные уровни глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, сохранять значения массы тела в пределах нормальных величин, а так же предотвращать развитие патологических изменений во внутренних органах и поддерживать гипертрофию и гиперплазию ОЛ в ПЖ, что обеспечивает адекватную регуляцию углеводного обмена.

Введение ККМ на фоне выраженных проявлений СД 2 типа (3-4 мес. после рождения) не сопровождается значительным снижением гликемии и содержания гликозилированного гемоглобина, однако снижает выраженность развития патоморфологических изменений во внутренних органах, что способствует поддержанию их функции и пролонгирует сроки жизни животных.

Позитивные эффекты клеточной терапии у животных с СД 2 типа на клинические и морфологические проявления заболевания во внутренних органах, связаны с пролонгированными сроками сохранения жизнеспособности и функциональной активности ККМ в организме после трансплантации.

Dynamic indicators of correction by marrow cages a condition of C57BL/KsJYLepr^{db} / +

O.I.Stepanova, N.N.Karkishchenko, N.A.Onishchenko, O.V.Baranova

The received results are new, since the method of treatment CD 2 types with the help allogenic for the first time is applied and the isogene cultivated marrow cages the Method of treatment CD 2 types is executed for the first time on the domestic genetic model CD 2 types reproducing clinical displays CD of 2 types at the person. In work conditions at which effects of treatment by means of stem and progenitor marrow cages are optimized have been established. It is shown that the prolonged clinical effect of regulation of a carbohydrate exchange and prevention of deep structural pathogenetic infringements in an internal come at use of cages of a marrow in an early stage of development CD 2 types in high doses or repeated application of moderate doses of cages that allows is long to compensate a carbohydrate exchange at the expense of preservation of adequate functional activity islet the pancreas device. This work can be considered, how a preclinical stage of studying of possibility and perspectivity of application of cages of a marrow in complex treatment CD 2 types.

Key words: a diabetes 2 types, mice db/db, pancreas, carbohydrate exchange, marrow cages.



Новые оппозитные линии крыс как биомодель индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии

Х.Х. Семенов, В.Н. Каркищенко, Е.Л. Матвееenko

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Елена Леонидовна Матвееenko matveyenkoel@mail.ru

Работа посвящена контролю процесса формирования низко- и высокоустойчивых к гипобарической гипоксии линий крыс в НЦБМТ РАМН. Исходным материалом для создания линий служила аутбредная популяция крыс филиала «Андреевка». Предыдущий контроль был осуществлен на 5-м поколении инбридинга. Установлено, что за 10 последующих поколений (F5-F15) тесного инбридинга и селекции показатель времени жизни (ВЖ) «на высоте», который является мерой оценки чувствительности животных к острой гипобарической гипоксии, возрос у резистентных животных в 2,2 раза, у низкоустойчивых — снизился в 2,3 раза. Полученные данные являются свидетельством эффективности проводимой генетико-селекционной работы.

Ключевые слова: низко- и высокоустойчивые животные к гипобарической гипоксии, селекция, инбридинг, крысы.

Гипоксия — явление, которое согласно современным представлениям, включается в патогенез практически любого заболевания. Гипоксические состояния осложняют течение многих заболеваний различного генеза, являясь важнейшей составляющей самых разнообразных нозологических форм патологии, включающих такие типовые патологические процессы как воспаление, лихорадка, шок и другие [8]. Несмотря на очевидные различия в пусковых механизмах формирования гипоксии экзогенного или эндогенного происхождения метаболические сдвиги в условиях дефицита кислорода в биологических системах в значительной мере стереотипны [7, 9]. Последние, как известно, характеризуются активизацией процесса гликолиза, липо-

лиза, протеолиза, развитием метаболического или респираторного ацидоза, набуханием митохондрий и, соответственно, разобщением окислительного фосфорилирования и свободного дыхания, дефицитом АТФ, подавлением энергозависимых реакций в клетках различной структурной и функциональной организации [4, 10]. На основании изложенного актуален выбор адекватной биологической модели для исследования антигипоксантов, так как от чувствительности животного к гипоксии во многом зависит и точность оценки анитигипоксанта действия препаратов. В связи с этим **целью** настоящей работы является создание линий крыс, оппозитных по чувствительности к острой гипобарической гипоксии.

Материал и методы

Исходным материалом служила аутбредная популяция крыс филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. Для селекции были использованы животные обоего пола в возрасте 3-3,5 месяцев, содержащиеся в конвенциональных условиях. Кормили крыс гранулированным комбикормом ПК-120. Отбор животных и дальнейшая селекция осуществляется по индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии. Для этого каждая крыса в барокамере «поднималась на критическую высоту» (11,5 тыс. м) со скоростью 165 м/сек., где она находилась до агонального состояния. Исследуемые показатели: ВПП — время первого падения (переход в лежащее положение), характеризующее порог реакции организма на данное воздействие, сек.; ВЖ — время жизни «на высоте» (до появления агонального дыхания), сек.; ВВП — время восстановления позы после «спуска» животного с «высоты», сек. [3]. Мерой оценки чувствительности животных к острой гипобарической гипоксии служило время жизни «на высоте». К высокоустойчивым были отнесены те животные, которые выдерживали в барокамере острую гипобарическую гипоксию не менее 1200 сек. (ВЖ

> 1200 сек.). К низкоустойчивым — животные, выдерживающие острую гипобарическую гипоксию менее 150 сек. (ВЖ < 150 сек.). Разведение (по селективируемому признаку) животных осуществляется в строгом соответствии с «Правилами разведения инбредных животных» по системе близкородственного скрещивания родных братьев и сестер (в соотношении 1:1). При этом неизменными условиями являются следующие.

1. Потомство каждого поколения должно проходить тест на чувствительность к острой гипобарической гипоксии и соответствовать требованиям селекции.

2. Потомство каждого последующего поколения при отсадке от родителей должно рассаживаться отдельно по полу, что не предусмотрено при обычном инбредном разведении.

Эти требования обусловлены особенностями выведения данных конкретных линий лабораторных животных.

Результаты и их обсуждение

Данные проведенной сравнительной оценки эффективности селекции крыс оппозитных линий по чувствительности к гипобарической гипоксии представлены в таблице.

Таблица 1

Средние показатели времени жизни «на высоте» у оппозитных линий крыс на 5 и 15 поколениях инбридинга

Чувствительность к гипобарической гипоксии	Поколение	Количество животных	Время жизни на высоте, сек.
Высокоустойчивые	F5	31	1320±89,6
	F15	30	2931±107,4
Низкоустойчивые	F5	27	143±15,2
	F15	30	62,2±7,5

Результаты тестирования, спустя 10 поколений (F5-F15) [5] показали, что селекция по продолжительности жизни «на высоте» у высоко- и низкоустойчивых животных имела одинаковый эффект по величине, но противоположный по значимости. Так, время пребывания «на высоте» у высокоустойчивых крыс возросло за указанный период в 2,2 раза, в то же время у низкоустойчивых животных оно снизилось в 2,3 раза. Таким образом, проводимая селекционная работа убедительно показывает, что она — эффективна. При этом нельзя забывать о сложности механизмов нарушений метаболизма, а, соответственно, и структур и функций клеток в различных органах и тканях при гипоксических состояниях различного генеза, очевидны и чрезвычайные трудности медикаментозной коррекции сдвигов метаболического статуса в условиях гипоксии [6, 11]. В последние годы ведутся усиленные поиски антигипоксантов — веществ, облегчающих реакцию организма на гипоксию, либо предотвращающих ее развитие, ускоряющих нормализацию функций в постгипоксический период и увеличивающих резистентность организма или отдельных органов к ней [1-3]. В виду выше изложенного оппозитные линии крыс по индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии являются адекватной биомоделью для тестирования фармакологических препаратов и экстраполяции полученных результатов на человека.

Исследования были выполнены согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Федеральный за-

кон от 12.04.2010 № 61 ФЗ «Об обращении лекарственных средств») и рассмотрены и одобрены биоэтической комиссией НЦБМТ РАМН.

Список литературы

1. *Лукьянова Л.Д.* Новые подходы к созданию антигипоксантов метаболического действия // Вестник РАМН. — 1999. — № 3. — с.18-25.
2. *Лукьянова Л.Д.* Механизм действия антигипоксантов. Антигипоксанты — новый класс фармакологических веществ / В сб. Антигипоксанты. — М. — 1991. — с.5.
3. *Лукьянова Л.Д.* Фармакологическая коррекция митохондриальной дисфункции при гипоксии / В сб. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. — М. — 2004. — с.456.
4. *Миловский В.Г., Болдин И.Г.* Влияние антигипоксанта олифена на изменения в редокс-системах глутатиона / В сб. Антигипоксанты и актопротекторы: итоги и перспективы. — СПб. — 1994. — ч.1. — с.67.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. — М.: Профиль-2С. — 2010. — с.88-101.
6. *Семенов Х.Х.* Выведение оппозитных линий крыс по чувствительности к острой гипобарической гипоксии // Биомедицина. — 2006. — № 2. — с.129-132.
7. *Шумутко Б.И., Макаренко С.В.* Ишемическая болезнь сердца: пособие для врачей и студентов. 2-е изд. — СПб: ЭЛБИ-СПб. — 2005. — с.160.
8. *Янковская Л.В., Зинчук В.В., Лис М.А.* Кислородтранспортная функция крови и дисфункция эндотелия у

больных со стенокардией и артериальной гипертензией // Кардиология. — 2007. — № 4. — с.22-27.

9. **Balaban R.S.** Modeling mitochondrial function // Am.J.Physiol. Cell Physiol. — 2006. — vol. 126. — No. 12. — pp. 217-231.

10. **Deem S.** Red blood cells and hemoglobin in hypoxic pulmonary

vasoconstriction // Adv. Exp. Med. Biol. — 2006. — No. 588. — pp. 217-231.

11. **Ly J.V., Zavalova J.A., Donnan G.A.** Neuroprotection and thrombolysis: combination therapy in acute ischaemic stroke // Expert Opin. Pharmacother. — 2006. — vol. 7. — No. 12. — pp. 1571-81.

Monitoring of the forming opposite rat strains process on individual sensitivity to acute hypobaric hypoxia

H.H. Semenov, V.N. Karkischenko, E.L. Matveenko

Work is devoted to monitoring the process of formation of low-and highly resistant to hypobaric hypoxia in rat strains of Scientific Biomedical Center of RAMS. The original material for the creation of strains was outbreed population of rats from the branch «Andreevka». Previous monitoring has been carried out on 5-th generation of inbreeding. Established that for the next 10 generations (F5-F15) close inbreeding and the breeding rate of the lifetime (LT) «at height», which is a measure of the sensitivity of animals to acute hypobaric hypoxia, increased in resistant animals in 2,2 times; in low-resistant — decreased in 2,3 times. The data obtained are evidence of the efficacy of the genetic and breeding work.

Key words: low-and high-resistant animals to hypobaric hypoxia, selection, inbreeding, rats.



Биофармацевтическая модель оценки взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС по их растворимости, метаболизму и элиминации (BDDCS)

Г.В. Раменская^{1,3}, И.Е. Шохин^{1,2}, А.Ю. Савченко², Ю.И. Кулинич^{1,2},
К.С. Давыдова³

¹ — Первый московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова, Москва

² — Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

³ — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Галина Владиславовна Раменская ramenskaia@mail.ru

В статье описывается биофармацевтическая классификация лекарственных веществ по их растворимости и метаболизму (BDDCS), разработанная в 2005 г с целью расширения перечня ЛВ — потенциальных кандидатов на оценку взаимозаменяемости согласно процедуре «биовейвер». Рассмотрена взаимосвязь интенсивности метаболизма, кишечной проницаемости и других биофармацевтических свойств. Оценена приемлемость BDDCS для установления кишечной проницаемости ЛВ. Приведена классификация некоторых ЖНВЛС согласно данной системе. Определены основные перспективы применения BDDCS в регуляторной фармацевтической практике.

Ключевые слова: биофармацевтическая классификационная система (БКС), биофармацевтическая классификация лекарственных веществ по их растворимости и метаболизму (BDDCS), проницаемость, биовейвер.

В последнее десятилетие биофармацевтическая классификационная система (БКС) стала неотъемлемой частью мировой регуляторной фармацевтической науки и практики при оценке взаимозаменяемости воспроизведенных лекарственных средств (ЛС) по процедуре «биовейвер» [1-5]. Применение данной системы позволяет заменить фармакокинетические исследования биоэквивалентности *in vivo* на изучение кинетики растворения *in vitro* для ЛС, содержащих лекарственные вещества (ЛВ), относящиеся к 1, 2 и 3 классу БКС при выполнении некоторых дополнитель-

ных условий [2]. Согласно действующей БКС, критерием «высокой проницаемости» ЛВ через мембраны ЖКТ является высокая (ЕМА, ВОЗ, РФ — более 85 %, FDA — более 90 %) абсолютная биодоступность [2-5], либо высокий (относительно внутреннего стандарта — метопролола) коэффициент проницаемости $P_{eff}^{in vivo}$, определенный методом кишечной перфузии *in vivo* [6]. В то же время, такие исследования являются достаточно трудоемкими и дорогостоящими [7]. Прочие биофармацевтические критерии (кишечная проницаемость, определенная на крысах *in situ*, проницаемость, опреде-

ленная на монослое эпителиальных клеток Сасо-2, коэффициент распределения в системе октанол-вода Log P), рекомендованные разными авторами [7-9], как более простые и доступные методы косвенной оценки кишечной проницаемости по сравнению с исследованиями на людях *in vivo*, являются недостаточно надежными и достоверными. Таким образом, возникла необходимость в разработке нового объективного критерия, позволяющего оценить степень проникновения ЛВ в системный кровоток для дальнейшего его применения в области установления эквивалентности воспроизведенных ЛС.

Биофармацевтическая классификация лекарственных веществ по их растворимости и метаболизму (BDDCS)

Основа BDDCS

В 2005 г. С.-Y. Wu и L. Benet предложили новую биофармацевтическую классификационную систему — биофармацевтическую классификацию лекарственных веществ по их растворимости и метаболизму (biopharmaceutical drug disposition classification system —

BDDCS) [10]. Они ввели дополнительный критерий классификации проницаемости действующих веществ — степень интенсивности их метаболизма. Теоретическим базисом данной системы является положение о том, что основное предназначение метаболизма — это усиление элиминации ЛВ из организма [11]. Согласно данной системе, лекарственные вещества, подвергающиеся интенсивному метаболизму (более 70 %), относятся к веществам с «высокой» проницаемостью, а вещества, степень метаболизма которых менее 70 %, т.е. они элиминируются печенью и почками в частично неизменном состоянии, классифицируются как вещества с «низкой» проницаемостью [10, 12]. Таким образом, действующие вещества согласно BDDCS подразделяются на 4 класса: 1 класс («высокая» растворимость, «интенсивный» метаболизм), 2 класс («низкая» растворимость», «интенсивный» метаболизм), 3 класс («высокая» растворимость, «слабый» метаболизм), 4 класс («низкая» растворимость», «слабый» метаболизм). Сравнительная характеристика БКС и BDDCS, приведена в таблице 1.

Таблица 1
Сравнение критериев классификации ЛВ согласно БКС и BDDCS

I класс Высокая растворимость Высокая проницаемость (> 85 %) Интенсивный метаболизм (> 70 %) (Парацетамол)	III класс Высокая растворимость Низкая проницаемость Слабый метаболизм (Циметидин)
II класс Низкая растворимость Высокая проницаемость (> 85 %) Интенсивный метаболизм (> 70 %) (Ибупрофен)	IV класс Низкая растворимость Низкая проницаемость Слабый метаболизм (Фуросемид)

Типичным примером ЛВ, абсолютная биодоступность которого не характеризует его кишечную проницаемость, является амлодипин. Так, его значение F_a составляет 60 — 65 %, что должно определять его кишечную проницаемость как «низкую». Однако данное низкое значение абсолютной биодоступности связано с тем, что амлодипин подвергается пресистемному метаболизму (эффект первого прохождения через печень), при этом содержание его метаболитов в моче составляет 90 — 95 % [13], то есть его метаболизм согласно BDDCS можно охарактеризовать как «интенсивный». Таким образом, принимая во внимание «высокую» растворимость амлодипина, его можно достоверно классифицировать к 1 классу БКС и BDDCS и, соответственно, рекомендовать его воспроизведенные ЛС к процедуре «биовер» вместо исследований биоэквивалентности *in vivo*.

Пригодность BDDCS для оценки проницаемости ЛВ

После разработки данной системы важной задачей стало установление ее пригодности для оценки проницаемости ЛВ. В руководстве FDA, нормирующим порядок проведения процедуры «биовер» [3] в приложении А приведен перечень модельных веществ с известной кишечной проницаемостью, определенной методами *in vivo*: кишечной перфузии или на основании абсолютной биодоступности. Данный перечень предназначен для оценки пригодности различных методов определения проницаемости ЛВ. В таблице 2 приведены вещества из данного перечня, величина их проницаемости («высокая» или «низкая» согласно критерию FDA — 90 % и более), степень метаболизма («интенсивная» или «слабая» на основании критерия приемлемости BDDCS — 70 %), а также для сравнения другой косвенный показатель проницаемости — $\log P$ (в системе октанол-вода).

Таблица 2

Оценка приемлемости BDDCS для модельных веществ из руководства FDA по БКС

ЛВ	Проницаемость ¹	$\log P$ ²	Метаболизм ³
антипирин ⁴	высокая	низкий (л/о)	интенсивный
кофеин	высокая	низкий (л/о)	интенсивный
карбамазепин	высокая	высокий	интенсивный
флувастатин	высокая	высокий	интенсивный
кетопрофен	высокая	высокий	интенсивный
метопролол ⁴	высокая	высокий	интенсивный
напроксен	высокая	высокий	интенсивный
пропранолол	высокая	высокий	интенсивный
теофиллин	высокая	низкий (л/о)	интенсивный
верапамил ⁴	высокая	высокий	интенсивный
амоксциллин	низкая	низкий	слабый

атенолол	низкая	низкий	слабый
фуросемид	низкая	высокий (л/п)	слабый
гидрохлоротиазид	низкая	низкий	слабый
маннитол ⁴	низкая	низкий	слабый
α -метилдофа	низкая	низкий	слабый
ПЭГ-400	низкая	низкий	слабый
ПЭГ-1000	низкая	низкий	слабый
ПЭГ-4000 ⁵	низкая	низкий	слабый
Ранитидин	низкая	низкий	слабый

1 — согласно руководству FDA [3]

2 — относительно метопролола ($\log P = 1,72$) [9]

3 — критерий «интенсивного» метаболизма — более 70 %

4 — рекомендуемые внутренние стандарты определения проницаемости FDA [3]

5 — рекомендуемый маркер нулевой проницаемости FDA [3]

л/о — ложноотрицательный результат

л/п — ложноположительный результат

На основании вышеуказанных данных можно сделать вывод о высокой достоверности BDDCS — так, проницаемость всех модельных веществ FDA соответствует интенсивности метаболизму (согласно критерию 70 %). При этом другой способ косвенной оценки проницаемости (на основании коэффициента распределения) является значительно менее надежным — так, из 20 веществ 3 вещества (антипирин, кофеин и теofilлин) дали ложноотрицательные («низкий» $\log P$ при «высокой» проницаемости), и 1 вещество (фуросемид) — ложноположительный результат. Дополнительно, G. Amidon с соавт. провели аналогичную оценку для 29 ЛВ, для которых опубликованы достоверные данные по коэффициенту проницаемости $P_{eff\ in\ vivo}$. По результатам такой оценки только для 19 веществ из 29 совпали данные по проницаемости *in vivo*, определенной методом кишечной перфузии и косвенно на основании показателей $\log P$ и $C\ \log P$ (то есть достоверность составила около 70 %). В то же время, у 27 из 29 ЛВ «высокий» (относительно метопролола) показатель кишечной про-

ницаемости совпал с «интенсивным» метаболизмом, т.е. достоверность критерия BDDCS составила около 93 %. Степень метаболизма и проницаемость не совпала у 2 ЛВ — цефалексина и лозартана, что можно объяснить тем, что их значения $P_{eff\ in\ vivo}$ ($1,56 \times 10^{-4}$ и $1,15 \times 10^{-4}$ см/с, соответственно) близки к таковому у ЛВ, которое было принято за внутренний стандарт — метопролол ($1,34 \times 10^{-4}$ см/с). Таким образом, степень метаболизма ЛВ свыше 70 % с высокой степенью надежности свидетельствует о его «высокой» кишечной проницаемости [12].

BDDCS и биовейвер

Основной областью практического применения BDDCS разработчики представляли ее применение совместно с БКС при проведении процедуры «биовейвер». Ими было сделано предположение, что критерий FDA «высокой» проницаемости (F_a более 90 %) является достаточно консервативным, а поскольку данный нормативный документ позволяет применять биовейвер только для ЛС,

содержащие ЛВ из 1 класса БКС, введение параметра «интенсивного метаболизма» (который первоначально составлял 90 % и затем был снижен до 70 %) может позволить расширить 1 класс БКС и, таким образом, увеличить перечень ЛВ — кандидатов на упрощенную регистрацию без проведения исследований биоэквивалентности. Так предполагалось, что данная система может позволить провести

точную классификацию некоторых ЛВ, для которых класс БКС в настоящее время еще достоверно не определен.

В таблице 3 приведены некоторые ЛВ из Перечня ЖНВЛС (утвержден Распоряжением Правительства РФ от 2009 г.) [14], их биофармацевтические свойства, степень метаболизма, классификация согласно БКС [15-18] и BDDCS.

Таблица 3

Классификация некоторых ЛВ из Перечня ЖНВЛС согласно БКС и BDDCS

ЛВ	Растворимость ¹	Проницаемость ¹	Метаболизм ²	класс БКС	класс BDDCS
каптоприл	высокая	низкая	слабый	3	3
ацикловир	высокая	низкая	слабый	3	3
мебендазол	низкая	низкая/высокая	интенсивный	2 или 4	2
индинавир	низкая	низкая	интенсивный	4	2
доксациклин	высокая	высокая	слабый	1	3
мефлохин	низкая	низкая/высокая	интенсивный	2 или 4	2
леводопа	высокая	высокая	интенсивный	1	1

1 — критерии «высокой» растворимости и проницаемости согласно Методическим Рекомендациям по биоэкви- веру Росздравнадзора РФ [2]

2 — критерий «интенсивного» метаболизма — более 70 %

Использование BDDCS позволяет снять вопросы по биофармацевтической классификации таких ЛВ, например, как мефлохин и мебендазол, по которым в настоящее время отсутствуют достоверные данные по кишечной проницаемости. Индинавир (антиретровирусный препарат, применяемый для лечения ВИЧ) на основании «интенсивного» метаболизма переходит во 2 класс. Перевод данных ЛВ во 2 класс делает их потенциальными кандидатами на процедуру «биоэкви- вер». Доксациклин, напротив, выводится в 3 класс, что ужесточает критерии биоэкви- вера [2] для данного ЛВ. В то же время, в «монографии по биоэкви- веру»

на мефлохин [18], подготовленной Всемирной Фармацевтической Федерацией (FIP) [19] указано, что отнесение его ко 2 классу BDDCS не может быть в настоящее время принято во внимание регуляторными органами в связи с тем, что корреляция данных по интенсивности метаболизма и кишечной проницаемости требует дальнейшей проработки.

BDDCS в регуляторной фармацевтической практике

В настоящее время (2010 г.) BDDCS не упоминается ни в одном из действующих нормативных документах по БКС

и биовейверу [2-5]. Однако необходимо учитывать, что утверждение подобных регуляторных инструментов является весьма длительным процессом. Следует отметить, что с момента разработки биофармацевтической классификационной системы G. Amidon с соавт. [20] до внедрения ее в фармацевтическую практику на уровне национальных регуляторных органов (руководство FDA) прошло 6 лет [3]; в российской фармацевтической отрасли первые Методические Рекомендации по БКС и процедуре «биовейвер» были утверждены только в 2010 г [2].

Создатели БКС рекомендуют ввести BDDCS в нормативную документацию в виде следующего положения: «дополнительным достоверным критерием высокой проницаемости является степень метаболизма ЛВ, превышающая 90 %» [12]. Критерий приемлемости 90 % был установлен на основании показателя «высокой» проницаемости FDA (абсолютная биодоступность более 90 %), несмотря на предположении разработчиков BDDCS о том, что «высокую» проницаемость характеризует степень метаболизма более 70 % [10]. Изменение критерия позволило устранить несоответствие показателя проницаемости и метаболизма для упомянутого выше ЛВ — лозартана [12]. Проработка валидированного критерия приемлемости для оценки кишечной проницаемости на основании степени метаболизма ЛВ является важной задачей современной молекулярной фармации.

Выводы

Таким образом, биофармацевтическая классификация лекарственных веществ по их растворимости и метаболизму (BDDCS) может стать эффективным

инструментом для оценки кишечной проницаемости ЛВ и, соответственно, для дальнейшего регулирования проведения процедуры «биовейвер». В то же время, очевидно, что критерии классификации данной системы нуждаются в дальнейшей проработке и обосновании, что будет являться важной задачей современной биофармации. После дальнейших исследований в данной отрасли можно будет рекомендовать BDDCS к внедрению в практику регуляторных органов.

Список литературы

1. *Грacheв С.В., Кулес В.Г., Сычев Д.А., Раменская Г.В.* Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины. — М., ГЭОТАР-Медиа. — 2008. — с. 304.
2. *Раменская Г.В., Шохин И.Е.* Современные подходы к оценке генерических лекарственных средств при их регистрации (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. — 2009. — Т. 43. — № 6. — с. 30–34.
3. Методические рекомендации по оценке эквивалентности *in vitro* генерических лекарственных средств согласно процедуре «биовейвер». Утверждены Федеральным Агентством по Надзору в Сфере Здравоохранения и Социального Развития. М.: Ремедиум. — 2010.
4. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств (ЖНВЛС). Утвержден Распоряжением Правительства РФ № 2135-р от 30.12.2009 г.
5. *Шохин И.Е., Раменская Г.В., Василенко Г.Ф., Малащенко Е.А.* Сравнительная кинетика растворения и биофармацевтические свойства лекарственных средств амлодипина // Фармация. — 2010. — № 5. — с. 13–15.

6. Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S., Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (HHS-FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). — 2000.

7. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. World Health Organization (WHO). — 2006.

8. Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). — 2010.

9. **Hilfinger J.** Permeability Classification. In vitro and in situ methodology. URL: <http://www.aapspharmaceutica.com/meetings/files/90/13Hilfinger.pdf>. — 2010.

10. **Kim J.-S., Mitchell S., Kijek P., Tsume Y., Hilfinger J., Amidon G.L.** The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS Class I biowaiver requests // *Molecular Pharmaceutics*. — 2006. — Vol. 3. — № 6. — p. 686–694.

11. **Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L.** Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification // *Molecular Pharmaceutics*. — 2004. — Vol. 1. № 1. — p. 85–96.

12. **Yee S.** In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo

(small intestinal) absorption in man — Fact or myth // *Pharmaceutical Research*. — 1997. — Vol. 14. — № 6. — p. 763–766.

13. **Wu C.-Y., Benet L.** Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport / Absorption / Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System // *Pharmaceutical Research*. — 2005. — Vol. 22. — № 1. — p. 11–23.

14. **Benet L., Amidon G.L., Barends D., Lennernäs H., Polli J.E., Shah V.P., Stavchansky S., Yu L. X.** Application of BDDCS to Predict Drug Disposition // *Pharmaceutical Research*. — 2008. — Vol. 52. — № 3. — p. 483–488.

15. **Arnal J., Gonzalez-Alvarez I., Bermejo M., Amidon G.L., Junginger H.E., Kopp S., Midha K.K., Shah V.P., Stavchansky S., Dressman J.B., Barends D.M.** Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Aciclovir // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2008. — Vol. 97. — p. 5061–5073.

16. **Jantratid E., Strauch S., Becker C., Dressman J.B., Amidon G.L., Junginger H.E., Kopp S., Midha K.K., Shah V.P., Stavchansky S., Barends D.M.** Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Doxycycline hyclate // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2009. — Vol. 99. — p. 1639–1663.

17. **Strauch S., Jantratid E., Dressman J.B., Junginger H.E., Kopp S., Midha K.K., Shah V.P., Stavchansky S., Barends D.M.** Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Mefloquine. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). — 2010. — DOI 10.1002/jps.22249.

18. International Pharmaceutical Federation (FIP). 2009. Biopharmaceutics

Classification System (BCS). URL: <http://www.fip.org/bcs>. — 2010.

19. **Lindenberg M., Kopp S., Dressman J.** Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. — 2004. — № 58. — p. 265–278.

20. **Amidon G.L., Lennerlas H., Shah V.P., Crison J.R.** A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability // *Pharmaceutical Research*. — 1995. — № 12. — p. 413–420.

Biopharmaceutical model for the assessment of generic interchangeability (their solubility, metabolism and elimination) (BDDCS)

G.V. Ramenskaya, I.E. Shohin, A.U. Savchenko, U.I. Kulinich, K.C. Davidova

Paper of Ramenskaya G.V., Shohin I.E., Savchenko A.Y., Kulinich J.I., and Davydova K.S. describes biopharmaceutical drug disposition classification system (BDDCS), developed by C.-Y. Wu and L. Benet in 2005 in order to extend list of drugs - potential biowaiver candidates. Metabolic rate, intestinal permeability and other biopharmaceutical properties relationship is described. BDDCS suitability for permeability determination is evaluated. Some Essential Medicines are classified according BDDCS. General tendencies of BDDCS application in pharmaceutical regulatory science and practice are proposed.

Key words: biopharmaceutical classification system (BCS), biopharmaceutical drug disposition classification system (BDDCS), permeability, biowaiver.



Компенсаторные механизмы нервно-мышечного дисбаланса у спортсменов высокой квалификации

М.Н. Алфимов, Т.Ф. Абрамова, В.В. Арьков, Т.М. Никитина

*Всероссийский научно-исследовательский институт физической культуры и спорта,
Москва*

Контактная информация: Алфимов Михаил 8 (916) 654-87-35

Изучено влияние коррекции нервно-мышечного дисбаланса мышц ног с различной степенью функциональных нарушений нижних конечностей на динамику их силовых проявлений и мозаику тонической составляющей. Определено, что тонические реакции мышц нижней конечности определяются степенью функциональных нарушений, а также могут являться маркером в определении предтравматического состояния. Различные уровни компенсации опорно-двигательного аппарата имеют обратимый и рефлектормно — тонический характер формирования.

Ключевые слова: нервно-мышечный дисбаланс, гипотония, силовые проявления, динамометрия, спортсмены, болевой мышечный синдром, оперированный коленный сустав.

Оптимальная локомоция требует минимальных энергетических затрат, минимально необходимого произвольного контроля и других расходов со стороны организма, что особенно важно в условиях спорта высших достижений [2]. В тоже время в основе нарушения генетически обусловленной межмышечной координации лежит гиповозбудимость мышцы агониста, определяемая его функциональной слабостью, с последующим формированием гиперактивности других мышечных групп и укорочения компенсаторных мышц, что в совокупности и является факторами ограничения оптимальности динамической реализации [4]. Нервно-мышечный дисба-

ланс сопровождается перераспределением нагрузок в звеньях кинематической цепи с развитием биомеханической дезорганизации и возникновением компенсаторных процессов снижающих патологическую асимметрию не выгодную организму с точки зрения энергетики и биомеханики [9,12].

Статистические данные [3,11] показывают, что наиболее уязвимым элементом опорно-двигательного аппарата является коленный сустав, на долю которого в спорте приходится около 50% травм.

Защитное выключение нейрогенной стимуляции четырехглавой мышцы в результате вынужденного оперативно-го вмешательства приводит к наруше-

нию спектра афферентации от рецепторных структур и нервно-мышечному дисбалансу, что ограничивает функциональную реализацию коленного сустава [1, 6]. ЦНС, получая искажённый или недостаточный афферентный сигнал от выключенных мышц, заякорённых на травмированный сустав, вынуждена для поддержания определённого уровня динамической реализации увеличивать силу контралатеральной конечности за счёт повышения своей возбудимости [2, 5, 6].

Высокая напряженность тренировочного процесса и соревновательного календаря ставят перед опорно-двигательным аппаратом спортсмена задачи поддержания не просто высокого уровня функционального состояния, но и готовности к максимальной реализации. В связи с этим одной из важнейших задач профилактики и постоперационной реабилитации опорно-двигательного аппарата спортсменов является снижение вплоть до элиминации уровня компенсаций в системе нервно-мышечных взаимодействий.

Цель: исследовать формирование компенсаторных механизмов в формировании нервно-мышечного дисбаланса нижних конечностей у спортсменов с различной степенью нарушения функций нижней конечности.

Материалы и методы

В исследовании участвовало 38 спортсменов высокой квалификации (от кмс до мсмк), представители циклических (марафон, триатлон) и игровых (футбол, хоккей, теннис, волейбол) видов спорта, разделенных в соответствии со степенью функциональных нарушений нижних конечностей на 2 группы. Первую группу составили 17 спортсменов, пере-

несших артроскопическую операцию коленного сустава (ОКС) по удалению медиального мениска, находящихся на стадии физической реабилитации от 8 до 15 недель. Вторая группа представлена 21 спортсменом с рефлекторными болевыми тонусно-мышечными синдромами (БМС) в области нижних конечностей (голеностоп, колено, тазобедренный сустав) и поясничного отдела.

Программа исследования включала ряд мероприятий, как коррекционной, так и мониторинговой направленности. В качестве коррекционных мероприятий использовался метод миофасциальных цепей, применяемый в прикладной кинезиологии (техники: ишемическая компрессия триггерных пунктов, рольфинг, постизометрическая релаксация, реедукция двигательного паттерна), разработанный Л.Ф. Васильевой, О.В. Кузнецовым, А.Ю. Мочаловым (РУ № ФС 001/2005 от 24.02.2005 г.) и рекомендованных МЗ РФ к практическому использованию [7,10].

В качестве мониторинговых тестов функционального состояния мышц нижних конечностей использовались стабилографическое тестирование и электронная динамометрия, проводимые до и после нормализации тонической реакции мышц нижних конечностей.

Стабилометрия — метод исследования функций организма, связанных с поддержанием равновесия. Стабилометрическое тестирование проводилось на компьютерном стабиланализаторе с биологической обратной связью «СтабилАн-01». Исследование проводилось с открытыми глазами (тест «стойка на одной ноге»). Регистрировались показатели: скорость перемещения общего центра давления (ОЦД), площадь статости-

незиограммы, среднее квадратическое отклонение (разброс колебаний) во фронтальной и сагиттальной плоскостях.

Электронная динамометрия четырехглавой мышцы бедра проводилась на динамометре «Biodex multi-joint system 3». Рассматривались: индикатор мышечной силы — пиковый вращающий момент (ПВМ) и пиковый вращающий момент относительно веса тела (ПВМ/ВТ).

Результаты и их обсуждение

Мышечное тестирование в группе ОКС показало высокое преобладание нормотонии мышц здоровой нижней конечности (рис. 1) наряду с высоким преобладанием гипотонии в большей части мышц оперированной конечности (рис. 2). Частота проявлений нормотоничности здоровой конечности высока для всех тестируемых мышц, варьирует от 72 до 97%, тогда как на оперированной конечности нормотоничное состояние характерно только для двух мышц — большая ягодичная (38%) и задняя большеберцовая мышца (8% случаев). Проявление гипотоничности мышц в большей мере характерно для оперированной конечности (в среднем — 65%), существенно реже проявляясь на здоровой (17%). Сочетанность гипотонии и фасциальных укор-

очений, как проявление механизма компенсации при поддержании стабильности сустава, проявляется на оперированной конечности для 6-ти из 8-ми протестированных мышц, как возможное следствие тотальной гипотоничности мышц этой конечности.

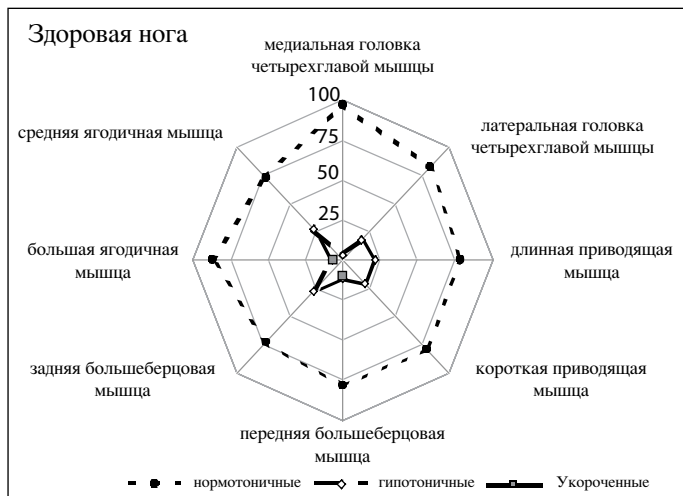


Рис. 1. Частота выявления нормотоничных, гипотоничных и укороченных мышц у спортсменов в группе ОКС для здоровой ноги (%).

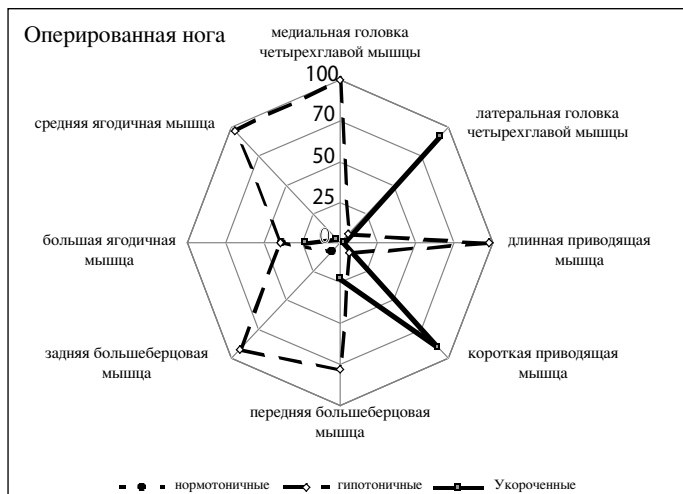


Рис. 2. Частота выявления нормотоничных, гипотоничных и укороченных мышц у спортсменов в группе ОКС для оперированной ноги (%).

У спортсменов группы БМС отмечается значительное преобладание мышц с наличием гипотонии (в среднем 56% на правой и 62% на левой конечности) (рис. 3, 4). Исключение из общего проявления гипотонии в этой группе на обеих конечностях составили лишь большая ягодичная (28 и 38%% случаев гипотонии — на правой и левой конечностях, соотв.) и средняя ягодичная (10 и 14%% случаев гипотонии — на правой и левой конечностях, соотв.). Фасциальные укорочения, в отличие от гипотонии, в группе с болевыми синдромами отмечаются для ограниченного количества мышц (4 из 8 мышц) и в малой частоте (2-19%).

Таким образом, нормотоничность убывает, а гипотоничность возрастает в последовательности — здоровая нога в группе оперированных спортсменов, обе ноги в группе спортсменов с болевым синдромом, оперированная конечность. Фасциальные укорочения, отражая нарушение, в группе ОКС максимально проявляются также на оперированной конечности при значительно более низкой частоте и более равном представительстве на здоровой ноге в группе ОКС и на обеих ногах в группе БМС.

Результаты проведения силового и стабилметрического тестирования показа-

ли, что различное состояние нижней конечности дифференцирует динамику силовых проявлений после нормализации тонической реакции мышц нижних конечностей в зависимости от выраженности нарушения.

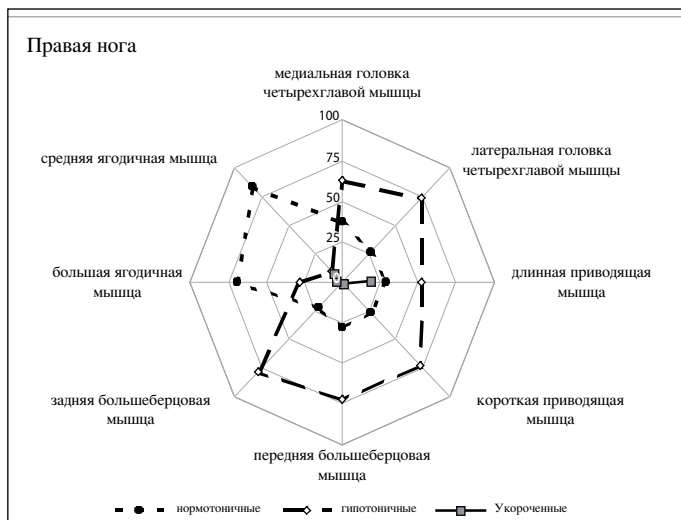


Рис. 3. Частота выявления нормотоничных, гипотоничных и укороченных мышц у спортсменов в группе БМС для правой ноги (%).

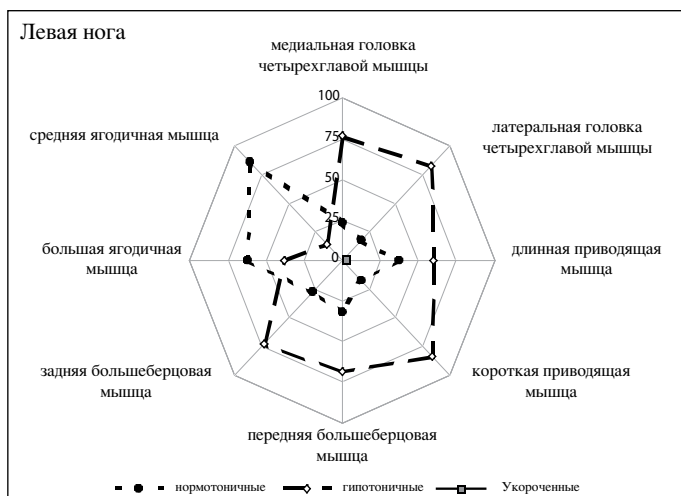


Рис. 4. Частота выявления нормотоничных, гипотоничных и укороченных мышц у спортсменов в группе БМС для левой ноги (%).

Так, в группе ОКС, сразу после нормализации тонических реакций, величина пикового вращающего момента мышц разгибателей голени оперированного сустава увеличилась по абсолютному показателю (ПВМ) на 11%, а по относительному (ПВМ/ВТ) на 18,8%, тогда как в случае контралатеральной конечности абсолютная и относительная величины пикового вращающего момента снижались порядка 9-ти % (рис. 5).

В группе БМС, ПВМ и ПВМ/ВТ увеличивались практически равным образом для обеих конечностей: на правой ноге абсолютные проявления силы разгибателей голени увеличивались на 5,6%, относительные — на 7,4%; на левой — на 6,1 и 9,3%, соотв..

В результатах стабилметрического тестирования в тесте «стойка на одной ноге» также была выявлена схожая с силовым тестированием дифференцированная динамика изменений основных показателей стабилметрии (рис. 5).

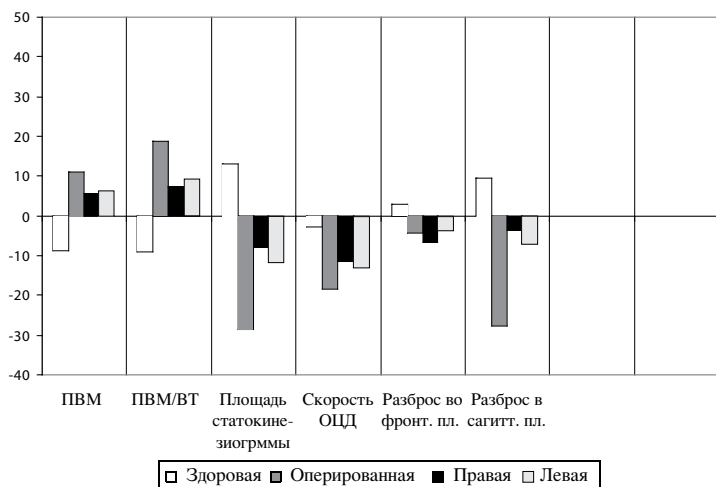


Рис. 5. Изменение показателей динамометрии и стабилметрии у спортсменов групп БМС (Л — левая и П — правая конечности) и ОКС (О — оперированная и З — здоровая конечности) после нормализации тонических реакций мышц нижних конечностей (%).

В частности, нормализация тонической реакции мышц нижней конечности привело в характеристиках механизмов поддержания ортоградного положения к однонаправленным изменениям в группе БМС и некоторым разнонаправленным — в группе ОКС. Характеристики площади статокинезиограммы в группе БМС снизились при стойке на обеих конечностях (11,6% — на левой, 7,8% — на правой). В группе ОКС эти же характеристики изменились разнонаправленно для разных конечностей: на оперированной конечности снизились на 28,6%, на здоровой конечности, напротив, выросли на 12,9%. Показатели скорости также снизились в обеих группах: в группе БМС на 12,9 и 11,5% при стойке на левой и правой конечности (соотв.); в группе ОКС наиболее значительное снижение скорости перемещения ОЦД произошло на оперированной конечности (18,5%) при значительно менее выраженном снижении на здоровой конеч-

ности (2,9%). Разброс колебаний ОЦД во фронтальной плоскости в группе БМС уменьшился на обеих конечностях на 3,8 и 6,8% (на левой и правой конечностях, соотв.), тогда как в группе ОКС произошли разнонаправленные изменения по конечностям: на оперированной конечности разброс во фронтальной плоскости снизился на 4,2%, а на здоровой вырос на 2,7%. В показателях разброса колебаний ОЦД в сагиттальной плоскости выявлена схо-

жая динамика изменений (снижение разброса в группе с болевыми синдромами на 6,9 и 3,7% на левой и правой соотв.), и разнонаправленная динамика в группе оперированных — снижение размаха колебаний на оперированной и увеличение на здоровой конечности (на 27,7 и на 9,4% соотв.).

Специфика изменений показателей позволяет предположить, что различия динамики силовых проявлений и стабилметрических показателей в группах после коррекции маркируют их уровень компенсации. В группе БМС, однонаправленное изменение силовых и стабилметрических показателей указывает на механизм компенсации уровня ипсилатеральной конечности, что характеризуется включением в механизм компенсации всех суставов и мышц конечности (изменением биомеханики самой конечности) [2].

Разнонаправленный рисунок силовых и стабилметрических показателей в группе ОКС определяет наличие уровня компенсации межконечностного взаимодействия, характеризующегося невозможностью компенсировать нарушения с использованием конечности стороны поражения и вовлечением здоровой контралатеральной конечности. Это нормальный механизм компенсации, позволяющий разгрузить поражённую конечность за счёт повышения нагрузки на контралатеральную конечность. В таких случаях контралатеральная конечность выполняет функцию опоры, а повреждённая — функцию переноса. В тяжёлых случаях патологическая асимметрия достигает порядка 20% и выше [2]. При коррекции восстанавливается нормотоничность мышц поражённой конечности и снижается вынужденно излишняя возбудимость здоровой конечности.

Результаты динамометрического и стабилметрического исследования сочетаются с результатами мышечного тестирования. Так в группе БМС правая и левая конечность, имеющие сходную встречаемость гипотоничных мышц, проявили так же однонаправленную динамику силовых показателей после коррекции. В группе ОКС оперированная конечность с преобладанием тотальной гипотоничности и большим количеством укороченных мышц проявляет значительно меньшие силовые показатели и сниженные показатели механизмов поддержания ортоградного положения тела относительно здоровой конечности до коррекции.

Выводы

1. Рисунок тонической функциональности мышц нижних конечностей определяется гипотонией мышц, дифференцированно формирующей различную степень компенсации. Здоровая конечность по состоянию тонической функциональности контрастирует с контралатеральной оперированной конечностью так, что оперированная отличается ансамблем мышц с предельной гипотонией и компенсаторным укорочением с уровнем компенсации межконечностного взаимодействия. В случае болевого мышечного синдрома тоническая функциональность на обеих конечностях проявляется умеренно-критическим количеством мышц с наличием функциональной слабости, уровень компенсации ипсилатеральный.

2. Восстановление нормотоничности мышц на оперированной конечности обеспечивает рефлекторное снижение излишней возбудимости и вовлечённости в движение противоположной — здоровой ко-

нечности, понижая уровень вынужденной компенсации межконечностного взаимодействия с результирующей оптимизацией силовых и ортоградных характеристик.

3. Рефлекторные болевые тонусно-мышечные синдромы в области суставов и мышц нижних конечностей также свидетельствуют о наличии нервно-мышечного дисбаланса и механизмов компенсации, устранение которых повышает способности максимальных силовых проявлений и улучшает позную устойчивость.

4. Различные уровни компенсации ОДА, определяемые степенью вовлечения звеньев биомеханической цепи, имеют обратимый (функциональный), рефлекторно-тонический характер формирования.

5. Тонические реакции мышц нижней конечности определяются степенью функциональных нарушений, а также могут являться маркером в определении предтравматического состояния.

Список литература

1. **Арьков В.В.** Стабило- и тензометрия при травме нижних конечностей спортсмена / В.В. Арьков, Л.А. Калинин, О.Н. Миленин, А.Г. Тоневицкий. — Вестник спортивной науки. — 2007. — № 1. — с. 30-34.

2. **Батышева Т.Т., Скворцов Д.В., Труханов А.И.** Современные технологии диагностики и реабилитации в неврологии и ортопедии. — М.: Медика. — 2005. — с. 256.

3. **Башкиров В.Ф.** Комплексная реабилитация спортсменов после травм опорно-двигательного аппарата / В.Ф. Башкиров. — М.: «Физкультура и спорт». — 1984. — с. 240.

4. **Васильева Л.Ф.** Нейрогенные механизмы и патогенетическая терапия атипичных моторных паттернов при болевых мышечных синдромах. Дисс. д-ра мед.наук, М. — 1998.

5. **Васильева Л.Ф.** Мануальная диагностика и терапия. Клиническая биомеханика и патофизиология. Руководство для врачей / Л.Ф. Васильева. — СПб.: «Фолиант». — 2000. — с. 400.

6. **Васильева Л. Ф.** Гипотония мышц, мышечный дисбаланс и боль / Л.Ф. Васильева. — Прикладная кинезиология. — 2004. — № 2. — с. 9-13.

7. **Васильева Л.Ф.** Мышечно — фасциальные цепи. Клиника. Диагностика. Лечение. / Л.Ф. Васильева, Кузнецов О.В., Мочалов А.Ю. — М.: Медика. — 2009. — с. 59.

8. **Ветрилэ В.С.** Стабилометрия как метод оценки проприоцепции при повреждениях капсульно-связочного аппарата коленного сустава / В.С. Ветрилэ, Косов И.С., Орлецкий А.К. // Вестн. Травм. Ортопед. — 2002. — № 2. — с. 38-41.

9. **Донской Д.Д.** Биомеханика физических упражнений. Д.Д. Донской. — М.: Физкультура и спорт. — 1958.

10. Методические рекомендации МЗ РФ «Мануальная терапия. Диагностика и коррекция патофизиологических изменений, возникающих при спондилогенных заболеваниях — Медицинская технология». — М. — 2005. РУ № ФС 001/2005/ от 24.02.2005 г.

11. **Черный В.** Спорт без травм / В. Черный. — М.: «Физкультура и спорт». — 1988. — с. 85.

12. **Baeyer H.** Die Wirkung der Muskeln auf die menschlichen Gliederketten in Theorie und Praxis. H. Baeyer Z. Orthor. Chir. — 1924.

Characteristics of compensatory mechanisms changes under the condition myoneural imbalance of the professional sportsmen's lower extremities muscles

M.N. Alfimov, T.F. Abramova, V.V. Arkov, T.M. Nikitina

This article focuses on the research of the influence on the dynamic of the power symptom and the picture of tone component by the method of myoneural imbalance of leg muscles with a different level of pathology lower extremities. Several things have been determined in the research: muscle tone function of lower extremities is determined by a pathology rate and also it might be a marker in the initial stage of .Recovery of normal tone rate with a high pathology level leaves to extremity hyper excitability reflex reduction of the extremity that hasn't been operated. The result of this process is the reduction of compensation rate. Slight pain muscular and joint syndrome of lower extremities indicates its tone-power misbalance. Also it shows availability of compensatory mechanism and a lack of developing maximal muscular power opportunity. The different support-motor apparatus compensation levels have reflex, reflex-tone formation character.

Key words: myoneural imbalance, hypotension, power symptom, dynamometry, sportsmen, pain muscular syndrome, operated knee joint.

Использование современных аппаратно-программных комплексов для изучения особенностей адаптации организма к физическим нагрузкам

С.Д. Руненко¹, Е.Е. Ачкасов^{1,2}, Н. Самамикоджеди¹, Н.Н. Каркищенко², Е.А.Таламбум¹, О.А. Султанова¹, Т.В. Красавина¹, Е.Н. Кекк¹

¹ — Первый московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова, Москва

² — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Светлана Давидовна Руненко svetfit@mail.ru

В статье представлены возможности современных аппаратно-программных комплексов для изучения особенностей адаптации к физическим нагрузкам. В 2007-2010 гг. обследованы 160 человек в возрасте от 17 до 25 лет, из них 115 студентов ММА им. И.М.Сеченова и 45 человек, занимающихся в московском фитнес клубе. В результате обследования с помощью АПК «Истоки здоровья» было выявлено снижение общих резервов здоровья студентов-медиков по сравнению со сверстниками, занимающимися в фитнес клубе. Помимо этого определены следующие особенности адаптации к физическим нагрузкам: у студентов 1-го курса снижение общих резервов здоровья определялось за счет низкого гомеостатического компонента, у студентов 6-го курса превалировало снижение соматической составляющей общих резервов здоровья.

Ключевые слова: физическая нагрузка, функциональное состояние, адаптационные резервы, физическая работоспособность, максимальное потребление кислорода, оздоровительно-тренировочная программа.

Традиционные диагностические технологии клинической медицины позволяют определить состояние здоровья с точки зрения наличия или отсутствия патологических изменений, а технологии спортивной и восстановительной меди-

цины — с точки зрения оценки резервов адаптации [4, 9].

В качестве наиболее оптимальной методологии охраны здоровья здоровых, в соответствии со стратегией ВОЗ, рассматриваются мониторинг функциональных резервов, донозологическая диагностика на ранних стадиях развития адаптационного синдрома и своевременная коррекция функционального состояния [4, 9].

В последние годы все большее внимание уделяется вопросам оценки функциональных резервов организма как показателя уровня здоровья, играющего центральную роль и в процессах приспособления к изменяющимся условиям окружающей среды, и при восстановлении после перенесенных заболеваний [4]. Очевидно, что проблема оценки функциональных резервов должна базироваться на фундаментальных положениях теории адаптации, поскольку речь идет о механизмах приспособительной деятельности организма, о перенастройке систем управления физиологическими функциями, о процессах активации и мобилизации различных звеньев регуляции.

Многие годы одним из направлений научно-исследовательской работы кафедры лечебной физкультуры (ЛФК) и спортивной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова является разработка методов управления адаптационным процессом с целью повышения резистентности организма, главным аспектом которого является использование оптимальных физических нагрузок [11]. Существующая до настоящего времени система физического воспитания в ВУЗах недостаточно эффективна из-за отсутствия дифференцированного подхода к выбору объема и интенсивности оздоровительно-тренировочных нагрузок. В таких условиях общей тенденцией при стандартном врачебном обследо-

вании с целью распределения студентов на медицинские группы (по форме 061-у) является снижение физической нагрузки у лиц с отклонениями в состоянии здоровья, что в свою очередь ведет к еще большему снижению их физической работоспособности [3, 6]. Широко применяющиеся в практике врачебного контроля за занимающимися оздоровительной физической культурой функциональные пробы (20 приседаний, PWC_{170} и др.) не дают достаточной информации об имеющихся адаптационных резервах организма [1, 5, 9].

Одним из наиболее важных направлений реализации национального проекта «Здоровье нации» и отраслевой программы «Охрана и укрепление здоровья здоровых на 2003-2010 гг.» (Приказ МЗ РФ №114 от 21.03.03) [7, 8, 10] является создание и совершенствование методик донозологической диагностики, неинвазивных, в том числе экспресс-методов исследования функционального состояния организма для практики массовых скрининг-обследований.

В настоящее время известен целый ряд компьютеризованных комплексов, позволяющих осуществлять экспресс-диагностику состояния систем адаптации организма человека с одновременной количественной оценкой интегрального показателя здоровья [2, 11, 12].

Цель. Исследование функционального состояния и особенностей адаптации к физическим нагрузкам с помощью современных методик экспресс-диагностики, разработанных для массовых скрининг-обследований.

Материалы и методы

Для решения поставленных в работе задач в 2007-2010 гг. были обследованы 160 человек в возрасте от 17 до 25 лет

(средний возраст — 20,8±0,4 лет). Было 87 девушек и 73 юноши. Все обследованные были разделены на 3 группы: I группа — 82 студента 1-го курса Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (ранее ММА им. И.М. Сеченова); II группа — 33 студента 6-го курса Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; III группа — 45 человек, занимающихся в одном из московских фитнес-клубов.

В работе использовался аппаратно-программный комплекс (АПК) «Истоки здоровья» (Св. РОСПАТЕНТ №2004610012 от 5 января 2004 г), который представляет собой комплексную программу тестирования функционального состояния и адаптационных резервов организма. Входящие в состав АПК «Истоки здоровья» диагностические тесты являются общепризнанными и хорошо зарекомендовавшими себя в функциональной диагностике: проба PWC₁₇₀ позволяет оценить физическую работоспособность, определить фактическое и должное максимальное потребление кислорода (МПК), характеризующее аэробную производительность и функциональные резервы кислородтранспортной системы организма; тест вариационной пульсометрии (по Р.М. Баевскому) [4] — высокоэффективный метод исследования системы нейрогуморальной регуляции и оценки на этой основе текущего функционального состояния и адаптационных резервов организма; тест зрительно-моторной реакции (по Т.Д. Лоскутовой) позволяет оценить функциональное состояние ЦНС по показателям возбудимости, реактивности и устойчивости реагирования; тест физических возможностей (по Г.Л. Апанасенко) [2] является известным экспресс-методом количественной оценки уровня физического здоровья; тест общей реактивности

(по Л.Х. Гаркави с соавт.), основанный на тесной связи психофизиологического состояния человека с общей неспецифической адаптационной реакцией, позволяет определить тип и уровень адаптивных реакций организма; блок тестов для оценки психоэмоционального состояния человека (тест Люшера, Спилбергера, САН), используемый для характеристики уровня тревожности, эмоциональной стабильности и стрессоустойчивости.

По результатам проведенного исследования определялся так называемый «интегральный показатель здоровья» [12], который вычислялся как производная величина от значений соматического, психологического и гомеостатического компонентов, исходя из принципа выявления и учета «слабых» звеньев в функциональном состоянии организма.

На заключительном этапе диспансеризации, проводимой в студенческой поликлинике при участии сотрудников кафедры ЛФК и спортивной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова после предварительно назначенной специальной или подготовительной группы всем студентам I группы обследованных было проведено углубленное медицинское обследование (УМО) с помощью АПК «Истоки здоровья». При этом у 18 (22,0%) студентов этой группы общие резервы здоровья оказались более 75%, что при тестировании с помощью АПК «Истоки здоровья» соответствует оценке «Выше среднего». В этом случае студенту назначали подготовительную или основную группу, врачебно-педагогическое наблюдение и дополнительное обследование у специалиста (в зависимости от имеющегося диагноза) для подтверждения фазы ремиссии основного заболевания и оценки функционального состояния вовлеченной в патологический процесс системы.

II группа обследованных — студенты 6 курса Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, обучающиеся на кафедре ЛФК и спортивной медицины. На занятиях по темам: «Исследование и оценка функционального состояния», «Медицинское заключение», «Врачебный контроль в оздоровительной физической культуре» студентов знакомили с современными аппаратно-программными комплексами, в том числе АПК «Истоки здоровья». На учебном занятии одному из студентов каждой группы проводили демонстрационное тестирование, результаты которого анализировали и включали в исходные данные по II группе обследованных.

III группа обследованных — это молодые люди, занимающиеся в одном из московских фитнес-клубов. Результаты первичных тестирований 45 человек в возрасте от 18 до 25 лет составили исходные данные по III группе обследованных.

С помощью АПК «Истоки здоровья» у всех 160 обследуемых определяли общие резервы здоровья по 3 составляющим: соматическому, психологическому и гомеостатическому компонентам.

Соматический компонент определяли на основании 3 тестов: уровня физического здоровья в баллах (по Г.Л. Апанасенко), оценки физической работоспособности по тесту PWC_{170} и тесту зрительно-моторной реакции (по Т.Д. Лоскутовой).

Психологический компонент определяли с помощью блока тестов для оценки психоэмоционального состояния человека (тест Люшера, Спилбергера, САН) и использовали для характеристики уровня тревожности, эмоциональной стабильности и стрессоустойчивости.

Гомеостатический компонент определяли по тесту общей реактивности (по Л.Х. Гаркави с соавт.) и тесту вариацион-

ной пульсометрии (по Р.М. Баевскому). Это метод объективно отражает состояние нейрогуморальной регуляции и позволяет на этой основе оценить общее функциональное состояние и общие адаптационные резервы организма. В АПК «Истоки здоровья» реализован исходный авторский алгоритм вычисления показателя активности регуляторных систем (ПАРС) Р.М. Баевского, который ориентирован на скрининговое выявление функциональных резервов сердечно-сосудистой системы по наблюдению 100 кардиоинтервалов. Класс состояния системы регуляции ритма сердца определяли по пяти характеристикам: суммарному эффекту всех регуляторных воздействий; функции автоматизма сердечной мышцы; вегетативному гомеостазу; устойчивости регуляции; состоянию подкорковых нервных центров. После этого вычисляли показатель активности регуляторных систем (ПАРС) и определяли пять основных групп состояний: норма (ПАРС = 0-1), умеренное функциональное напряжение (ПАРС = 2-4), выраженное функциональное напряжение (ПАРС = 5-6), резко выраженное функциональное напряжение (ПАРС = 7-8), астенизация (истощение) регуляторных систем (ПАРС > 9).

Результаты и их обсуждение

Общие резервы здоровья, которые вычислялись как производная величина от значений соматического, психологического и гомеостатического компонентов по результатам тестирования с помощью АПК «Истоки здоровья», у студентов Первого МГМУ им. И.М. Сеченова оказались сниженными и составили в среднем $46,5 \pm 2,1\%$ и $49 \pm 3,4$ в I и II группах соответственно, тогда как у их сверстников, занимающих-

ся в фитнес-клубе, этот показатель составлял $67 \pm 1,6\%$ (табл. 1). Заслуживает внимания тот факт, что при недостоверной разнице ($p > 0,05$) между конечными результатами обследования студентов 1 и 6 курса (I и II группа), когда общие резервы здоровья снижены в одном диапазоне значений интегрального показателя здоровья (ИПЗ), отмечена существенная разница между составляющими этот показатель компонентами. Так, в I группе (у студентов 1 курса) при общей оценке резервов здоровья ниже среднего отмечали более высокий соматический компонент и более низкий гомеостатический компонент по сравнению с аналогичными составляющими во II группе студентов (6 курса).

Резервы здоровья и составляющие их компоненты, выявленные у обследованных студентов, можно представить следующим образом: в I группе общие резервы — $46,5 \pm 2,1\%$ (ниже среднего); соматический компонент — $53,8 \pm 3,6\%$ (средний), гомеостатический компонент — $35,4 \pm 2,3\%$ (ниже среднего), при среднем психологическом компоненте — $57,8 \pm 1,8\%$. Во II группе при аналогичных общих резервах здоровья на уровне $49 \pm 3,4\%$ их составляющие существенно отличались: соматический компонент был ниже среднего — $34,7 \pm 1,6\%$, а гомеостатический выше среднего — $71,2 \pm 3,1\%$ при среднем психологическом компоненте ($56,2 \pm 2,5\%$), существенно не отличающимся от аналогичного показателя I группы.

Таблица 1

Исследуемые показатели: общие резервы здоровья и составляющие их компоненты

Показатель	I группа (n=82)	II группа (n=33)	III группа (n=45)	P ₁	P ₂	P ₃
Общие резервы здоровья	$46,5 \pm 2,1\%$	$49 \pm 3,4\%$	$67 \pm 1,6\%$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Соматический компонент	$53,8 \pm 3,6\%$	$34,7 \pm 1,6\%$	$59,2 \pm 3,8\%$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Психологический компонент	$57,8 \pm 1,8\%$	$56,2 \pm 2,5\%$	$61,5 \pm 4,7\%$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Гомеостатический компонент	$35,4 \pm 2,3\%$	$71,2 \pm 3,1\%$	$75,4 \pm 1,6\%$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

P₁ — достоверность различий показателей I и II группы

P₂ — достоверность различий показателей I и III группы

P₃ — достоверность различий показателей II и III группы

В табл. 2 представлены характеристики соматического здоровья: в I группе были выявлены удовлетворительные показатели физического здоровья в баллах по Г.Л. Апанасенко (от 8 до 12) и хорошие показатели физической работоспособности по тесту PWC₁₇₀ (от 16 до 20, в среднем — $18,4 \pm 2,4$ кгм/мин/кг). При этом основной

показатель функционального состояния кислородтранспортной системы — МПК также соответствовал хорошему уровню и составлял от 30 до 38 мл/мин/кг (в среднем $35,4 \pm 1,7$ мл/мин/кг) у девушек и от 40 до 48 мл/мин/кг (в среднем $43,2 \pm 2,5$ мл/мин/кг) у юношей. Однако, показатель адаптационных резервов организма по тесту ва-

риационной пульсометрии — ПАРС, входящий в состав гомеостатического компонента, явно указывал на «высокую цену адаптации» и у 90% (74 из 82) обследованных первокурсников составлял от 2 до 5 баллов. Это свидетельствовало о напряжении механизмов адаптации, поскольку, по Р.М. Баевскому, показатель ПАРС в диапазоне от 2 до 4 баллов свидетельствует об умеренном функциональном напряжении. Это донозологическое состояние, при котором функции организма реализуются более высоким, чем в норме, напряжением регуляторных систем. Такое состояние возникает как результат высокой активности человека или после работы, к концу рабочего дня. Постоянное пребывание в этом состоянии указывает на то, что регуляторные механизмы работают с более высокой

нагрузкой, чем это должно быть в норме. ПАРС на уровне 5-6 баллов соответствует выраженному функциональному напряжению. Это преморбидное состояние, которое характеризуется снижением функциональных резервов. Для здорового человека такое состояние возможно во время выполнения напряженной физической или умственной работы. Оно характерно для лиц со сниженными функциональными возможностями системы кровообращения, с неудовлетворительной адаптацией организма к условиям окружающей среды. Такое состояние в покое является признаком неадекватного ответа организма на воздействие факторов окружающей среды. Состояние постоянного стресса ведет к ускоренному расходованию жизненных ресурсов и к развитию заболеваний.

Таблица 2

Показатели физической работоспособности (PWC_{170} , МПК) и активности регуляторных систем (ПАРС)

Показатель	I группа (n=82)	II группа (n=33)	III группа (n=45)	P_1	P_2	P_3
PWC_{170} , кгм/мин/кг	18,4±2,4	14,3±1,7	20,4 ±3,4%	p<0,05	p>0,05	p<0,05
МПК, мл/мин/кг						
мужчины	43,2±2,5(м)	36,4±3,2(м)	45,2±2,5(м)	p<0,05	p>0,05	p<0,05
женщины	35,4±1,7(ж)	28,4±2,4(ж)	38,4±2,4(ж)	p<0,05	p>0,05	p<0,05
ПАРС баллы	2-5	0-1	0-1	p<0,05	p<0,05	p>0,05

P_1 — достоверность различий показателей I и II группы

P_2 — достоверность различий показателей I и III группы

P_3 — достоверность различий показателей II и III группы

Во II группе обследованных (студенты 6 курса) наблюдалась обратная картина: отмечены низкие показатели соматического здоровья — от 4 до 8 баллов по Г.Л. Апанасенко, низкие показатели PWC_{170} — от 14 до 16 кгм/мин/кг (в среднем — 14,3±1,7) и скромные значения МПК — от 25 до 32 мл/мин/кг (в среднем — 28,4±2,4 мл/мин/кг) у девушек и от 33 до 42 мл/мин/кг (в среднем 36,4±3,2 мл/

мин/кг) у юношей. Гомеостатический же компонент был достоверно выше среднего, и у 75% обследованных показатель ПАРС составил от 0 до 1 баллов, что соответствовало физиологической норме (по Р.М. Баевскому) — состоянию полной или достаточной уравновешенности организма с внешней средой. При этом отмечались достаточные функциональные (адаптационные) возможности (ре-

зервы) организма. Высокая (удовлетворительная) приспособляемость организма к текущим условиям достигается при минимальном напряжении регуляторных систем.

В III группе обследованных (молодые люди, занимающиеся в оздоровительных центрах) были отмечены более высокие общие резервы здоровья ($67 \pm 1,6\%$) по сравнению со студентами Первого МГМУ им. И.М. Сеченова ($46,5 \pm 2,1\%$ в I группе и $49 \pm 3,4\%$ во II группе). У них выше среднего были и гомеостатический ($75,4 \pm 1,6\%$), и психологический компоненты ($61,5 \pm 4,7\%$). Показатели физической работоспособности по тесту PWC_{170} были выше среднего (от 18 до 22 кгм/мин/кг, в среднем — $20,4 \pm 3,4\%$). При этом показатель МПК тоже соответствовал хорошему уровню и составлял от 35 до 44 мл/мин/кг (в среднем $38,4 \pm 1,9$ мл/мин/кг) у девушек и от 42 до 50 мл/мин/кг (в среднем $45,2 \pm 2,5$ мл/мин/кг) у юношей. Показатель активности регуляторных систем (ПАРС), отражающий уровень адаптационного потенциала, у большинства обследованных соответствовал норме (от 0 до 1 балла), не отличаясь от аналогичного показателя студентов-шестикурсников. Все полученные данные подтверждают известный факт, что регулярные физические нагрузки, выбранные в соответствии с функциональным состоянием организма, полезны для здоровья и повышают его резервы.

Заключение

Результаты обследования с помощью АПК «Истоки здоровья» позволили не только количественно определить общие резервы здоровья в выделенных группах, но и изучить особенности адаптации к физическим нагрузкам у разного контин-

гента лиц. Так, при одинаковых итоговых результатах (по показателю общих резервов здоровья) у первокурсников снижение общих резервов здоровья происходило за счет высокой цены адаптации (низкого гомеостатического компонента), а у шестикурсников такие же низкие показатели общих резервов здоровья определялись низкими показателями физического здоровья, физической работоспособности, которые имеют неуклонную тенденцию к снижению с 1 по 6 курс.

Выводы

1. Использование АПК «Истоки здоровья» позволяет дать количественную характеристику резервам здоровья, изучить особенности адаптации к физической нагрузке на основании анализа соматического, гомеостатического и психологического компонентов.

2. Общие резервы здоровья студентов 1 и 6 курсов Первого МГМУ им. И.М. Сеченова существенно снижены (~20%) по сравнению с молодыми людьми, занимающимися в оздоровительных центрах.

3. В снижении общих резервов здоровья у студентов-медиков выделены нарушения разных механизмов адаптации к физическим нагрузкам: у первокурсников — за счет низкого гомеостатического компонента (по показателю ПАРС в тесте вариационной пульсометрии), у студентов-шестикурсников — за счет соматической составляющей (низкого уровня физической работоспособности по тесту PWC_{170} и низкого значения МПК).

4. Результаты обследования с помощью АПК «Истоки здоровья» необходимо учитывать при разработке индивидуальных оздоровительно-тренировочных программ для коррекции выявленных нарушений адаптации.

Список литературы

1. **Анищенко В.С., Пермяков И.А. и др.** Взаимосвязь функционального состояния и общей физической работоспособности студентов-медиков. — М. — 2003. — с.13-14.
2. **Апанасенко Г.Л.** О возможности количественной оценки здоровья человека // Гигиена и санитария.—1985. — № 6. — с.55-57.
3. **Апарин В.Е., Короткова С.Б., Коротков Б.Н.** Оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы студентов специальной медицинской группы при планировании занятий по физическому воспитанию.— М. — 2005. — с.20-22.
4. **Баевский Р.М., Сыркин А.Л., Ибатов А.Д., Соболев А.В., Черникова А.Г.** Оценка адаптационных возможностей организма и проблемы восстановительной медицины.//Вестник восстановительной медицины. — 2004. — № 2. — с. 18-22.
5. **Васильев Д.А., Выходец И.Т.** Дифференциация медицинской группы на основе интегральной оценки морфофункциональных, вегетативных и психологических характеристик студентов начальных курсов вуза г. Москвы» //Журнал РАСМИРБИ. — 2004. — № 2. — с.30-38.
6. **Веневцева Ю.Л., Егоров В.Н., Мельников А.Х. и др.** Пути индивидуализации

загрузки в процессе по физическому воспитанию. — М. — 2005. — с.51-53.

7. Постановление Правительства Российской Федерации от 29.12.2004 № 872, «О Федеральных учреждениях здравоохранения и федеральных учреждениях оздоровительного профиля»

8. Приказ МЗ РФ № 114 от 21.03.2003г. «Об утверждении отраслевой программы «Охрана и укрепление здоровья здоровых на 2003-2010 годы»

9. **Прошляков В.Д., Комратова А.В., Лутонин А.Ю.** Поиск наиболее информативных методов оценки физического состояния учащейся молодежи. — М. — 2005. — с. 166-169.

10. **Перхуров А.М.** Очерки донозологической функциональной диагностики в спорте. — М. — 2006. — с.150.

11. **Руненко С.Д., Таламбум Е.А., Ачкасов Е.Е.** Исследование и оценка функционального состояния спортсменов. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. — М.: Профиль. — 2010. — с. 72.

12. **Соколов А.В.** Интегральная оценка резервов здоровья в восстановительной медицине. // Вестник восстановительной медицины — 2002. — № 1 — с.16-18.

The use of modern hardware-software complexes for the study of the features of adaptation of organism to physical exercises

S.D. Runenko, E.E. Achkasov, N. Samamikodgedi, N.N. Karkishchenko, E.A.Talambum, O.A. Sultanova, T.V. Krasavina, E.N. Kekk

The paper presents the capabilities of modern software and hardware complex for studying adaptation to physical stress. In 2007-2010 yy 160 people aged 17 to 25 years were surveyed, of which 115 students of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (MSMU), before I.M. Sechenov Moscow Medical Academy and 45 visitors of one Moscow fitness club. A survey by APC «Sources of Health» revealed decrease of students' general health reserves in comparison with young people training in a fitness club. In addition, the following features of adaptation to physical stress were identified: within freshman students reduction in overall health reserves was determined by low homeostatic component, senior students possessed reduction of somatic component of overall health reserves.

Key words: physical activity, functional state, adaptive reserves, physical working capacity, maximal oxygen consumption, individual fitness health-improving program.



Определение перхлозона в плазме крови с использованием ВЭЖХ масс-спектрометрическим детектированием

А.М. Власов^{1,2}, Ю.Н. Башкатова², А.Ю. Савченко³, М.Р. Хаитов²,
Г.В. Раменская¹

¹ — Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

² — Институт иммунологии ФМБА России, Москва

³ — Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

Контактная информация: Галина Владиславовна Раменская ramenskaia@mail.ru

Разработан новый противотуберкулезный препарат — перхлозон. Хроматографирование осуществляли с использованием предколонки ZORBAX SB C18, 5 мкм, 35 мм × 2,1 мм и аналитической колонки ZORBAX SB C18, 5 мкм, 150 мм × 2,1 мм. Степень извлечения перхлозона из плазмы крови 88%. Относительное стандартное отклонение при оценке внутри- и междневной воспроизводимости менее чем 9,5% и 14,2% соответственно. Диапазон аналитических концентраций составлял 10-10000 нг/мл для масс-спектрометрического детектирования и 250-10000 нг/мл для спектрофотометрического детектирования. Предел количественного определения — 10 нг/мл для масс-спектрометрического детектирования и 250 нг/мл для спектрофотометрического детектирования.

Ключевые слова: перхлозон, ВЭЖХ, масс-спектрометрия, фармакокинетика.

В настоящее время во всем мире и в России сохраняется напряженная эпидемическая обстановка по туберкулезу [1, 3].

Распространение в 1980 — 1990 гг. штаммов микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (которые теперь определяют как устойчивые - по крайней мере, к H и R) поставило под угрозу успех мероприятий по борьбе с туберкулезом [4], привело к снижению эффективности химиотерапии [5, 6]. По данным специальных контролируемых исследований в ряде областей РФ частота выделения лекарственно-устойчивых МБТ среди впервые заболевших достигает 19-26%, при обследовании клиниче-

ских контингентов — до 38%, среди контингентов хронических больных ситуация еще серьезней — частота выделения лекарственно-устойчивых штаммов достигает 80-90% и при остро прогрессирующих формах — до 100% [7]. На фоне вынужденной полихимиотерапии с привлечением противотуберкулезных препаратов резервного ряда снижается функциональная активность систем защиты макроорганизма, регистрируются побочные реакции со стороны различных органов и систем, что обуславливает затяжное течение и хронизацию воспалительных процессов [8]. Все это определяет необходимость создания новых противотуберкулезных средств.

Перхлозон (перхлорат-4-тиоуреидо-иминометилпиридиния) рис. 1, противотуберкулезное средство, обладающий выраженным, строго избирательным ингибирующим действием на жизнеспособность микобактерий туберкулеза, чувствительных и устойчивых к существующим противотуберкулезным препаратам. Механизм его действия в настоящее время не известен. Перхлозон находится на стадии клинических испытаний и поэтому еще не имеет широкого клинического применения, что объясняет отсутствие в литературе методов его определения в биожидкостях и данных по его фармакокинетике.



Рис. 1. Химическая структура перхлозона (перхлорат 4-тиоуреидо-иминометилпиридиния).

В представленном исследовании нами была разработана простая и быстрая методика определения перхлозона в плазме крови с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим и спектрофотометрическим детектированием.

Материалы и методы

1. Реактивы

Перхлозон (перхлора-4-тиоуреидо-иминометилпиридиния, чистота 99,7%) был предоставлен разработчиком ОАО «Фармасинтез» (Россия), трифторуксусная кислота и ацетонитрил (MERK KGaA Darmstadt, Германия), вода деионизированная и очищенная с использованием Milli-Q system MP-650, IWAKI Millipore, (Япония).

2. Приготовление стандартного и рабочих стандартных растворов перхлозона

Стандартный раствор 10 мг/мл готовили путем растворения точной навески перхлорат 4-тиоуреидоиминометилпиридиния в метаноле. Стандартный раствор хранили при температуре -40°C . Срок годности стандартного раствора — 3 месяца. Рабочие стандартные растворы перхлозона (500 мкг/мл, 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл) готовили из стандартного раствора разведением водой. Использовали свежеприготовленные рабочие стандартные растворы.

3. Приготовление образцов плазмы крови для калибровки

Для калибровки прибора и валидации методики использовали «чистую» плазму. Образцы для калибровки готовили добавлением к 1 мл плазмы 10-50 мкл рабо-

чих стандартных растворов до получения финальных концентраций 10, 50, 100, 1000, 10000 нг/мл плазмы. Калибровочные кривые получали ежедневно.

4. Пробоподготовка

К 0,5 мл плазмы крови в пробирке типа «эппендорф» добавляли 1,5 мл ацетонитрила, смешивали на шейкере в течение 5 минут со скоростью 2500 об./мин., и центрифугировали при 13200 об./мин 10 минут. Надосадочную жидкость перемещали в вials и упаривали в токе азота при нагревании до 40°C , к остатку после упаривания добавляли 200 мкл подвижной фазы и перешивали 15 сек. на вортке, затем центрифугировали при 13200 об./мин. 5 минут и переносили 100 мкл супернатанта в микровials.

5. Оборудование

Хроматографическая система Agilent 1200, состоящая из дегазатора, бинар-

ного насоса, автосамплера, колоночного термостата, мультиволнового спектрофотометрического детектора и масс-спектрометрического квадрупольного детектора Agilent 6120. В качестве неподвижной фазы использовалась хроматографическая колонка Agilent «ZORBAX SB C18 5мкм, 150*2,1мм» с предколонкой «ZORBAX SB C18 5мкм, 35*2,1мм».

6. Хроматографические условия

Разделение проводили на колонке Agilent «ZORBAX SB C18 5мкм, 150*2,1мм» при температуре колонки 400°C. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и 0,1% раствора трифторуксусной кислоты (pH=2,6) в соотношении 85:15. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Объем образца вводимый в систему составлял 20 мкл. Для детектирования использовали спектрофотометрический (длина волны — 317 нм) и масс-спектрометрический детекторы. Ионизацию проводили с помощью электроспрея при атмосферном давлении (API-ES), напряжение на капилляре 4000V, скорость азота 12 мл/мин, температура осушающего газа — 300°C. Детектирование проводили в режиме индивидуальных масс (SIM) по молекулярному иону 183,4 m/z. Время анализа составляло 5 минут. Время удерживания перхлозона в указанных условиях — 3,05 мин.

7. Дизайн фармакокинетического исследования

Фармакокинетическое изучение проводилось в рамках исследования переносимости, безопасности и фармакокинетики препарата на здоровых добровольцах, с целью выработки рекомендаций по режиму дозирования для последующих фаз клинических исследований. В исследование было включено 36 здоровых добровольцев (мужчин) от 19 до 38 лет, вес от — 58 до 92 кг, рост — от 170 до 190 см. Доброволь-

цы были сгруппированы на 4 группы по 9 человек. Каждая группа получала перхлозон однократно, в виде таблеток по 400 мг — так, чтобы разовая доза составляла 400 мг (1 группа), 800 мг (2 группа), 1200 мг (3 группа), 1600 мг (4 группа), то есть соответственно 1, 2, 3 и 4 таблетки. Прием следующей дозы осуществлялся после оценки переносимости и безопасности предыдущей дозы. Образцы крови отбирались по 5 мл из локтевой вены до получения препарата и через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 10; 12; 24 часа после его приема. Образцы центрифугировались, плазма отбиралась в отдельные пробирки и хранилась до проведения анализа при температуре 200°C не более одного месяца.

Результаты и их обсуждение

1. Оптимизация условий анализа

В данном исследовании нами разработан методика быстрого и простого определения перхлозона в плазме крови с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Кроме того, нами показана возможность применения спектрофотометрического детектирования, в виду высоких концентраций препарата в крови. Применение спектрофотометрических детекторов значительно упрощает анализ и позволяет определять содержание перхлозона до 250 нг/мл.

2. Линейность

Калибровочные кривые носили линейный характер во всем в диапазоне определяемых концентраций 10 нг/мл — 10000 нг/мл (для масс-спектрометрического детектирования) ($r = 0,9986$) и 500 нг/мл — 10000 нг/мл (для спектрофотометрического детектирования) ($r = 0,9992$).

3. Специфичность и чувствительность

Хроматограмма образца плазмы крови обладает хорошей селективностью,

что подтверждается отсутствием пиков интерферирующих эндогенных соединений в месте элюирования перхлозона.

Предел количественного определения рассчитывался как наименьшая концентрация анализируемого вещества, при которой отношение «сигнал:шум» составляло 10:1. Чувствительность методики для масс-спектрометрического детектирования составила 10 нг/мл, для спектрофотометрического 250 нг/мл, что являлось достаточным для определения содержания перхлозона в плазме крови добровольцев в течение 24 часов после однократного применения.

4. Степень извлечения из плазмы крови

Степень извлечения перхлозона из плазмы крови определяли сравнением площадей пиков чистого стандарта, приготовленного из рабочего раствора и введенного в хроматографическую колонку, и площади пика экстракта, полученного из плазмы крови с добавлением аналогичного количества перхлозона ($n=5$ для каждой концентрации). Степень извлечения составила 88,4%, 88,6%, 87% для концентраций перхлозона 100 нг/мл, 500 нг/мл и 1 мкг/мл соответственно.

5. Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости проводили количественное определение с применением масс-спектрометрического детектора модельных смесей перхлозона и плазмы крови при различных концентрациях перхлозона. Для образцов, измеренных в течение дня, относительное стандартное отклонение составило 10,4%, 9,2%,

9,5% для модельных смесей, содержащих 100 нг/мл, 500 нг/мл и 1000 нг/мл перхлозона соответственно. Для измерений в течение недели относительное стандартное отклонение составило 13,5%, 11,4% и 14,2% для модельных смесей, содержащих 100 нг/мл, 500 нг/мл и 1000 нг/мл перхлозона соответственно.

6. Изучение фармакокинетики

Фармакокинетические параметры перхлозона рассчитывали модельно-независимым методом. Максимальная концентрация в плазме крови ($C_{\max}$) и время её достижения ($T_{\max}$) были получены непосредственно из результатов измерений. Значение площади под фармакокинетической кривой рассчитывали методом трапеций (AUC₀₋₂₄). На рис. 2 представлены усредненные фармакокинетические кривые перхлозона в плазме крови после однократного перорального приема в дозе 400 мг, 800 мг, 1200 мг и 1600 мг. Рассчитанные фармакокинетические параметры представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных перхлозон быстро всасывается в системный кровоток ($T_{\max}$ — в среднем — до 3 часов) и постепенно выводится из организма ($T_{1/2}$ — в среднем — до 20 часов).

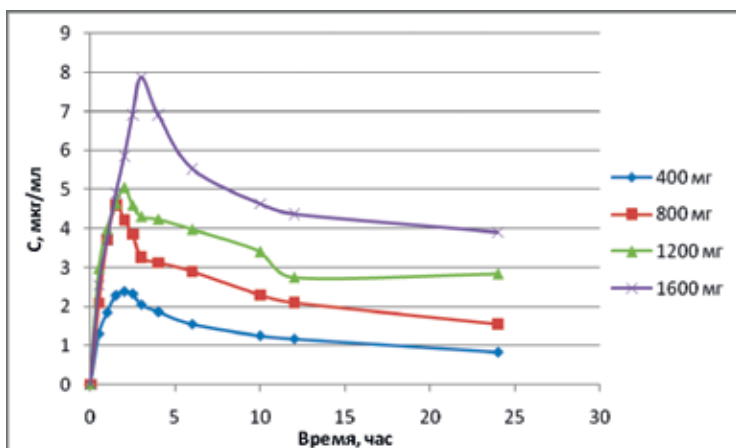


Рис. 2. Усредненные фармакокинетические профили перхлозона после однократного перорального приема в различных дозах, мкг/мл

**Средние значения фармакокинетических параметров перхлозона
у здоровых добровольцев после однократного перорального
приема в различных дозах**

Параметр	Однократная доза, мг			
	400	800	1200	1600
C _{max} , мкг/мл	2,61±0,34	5,07±0,69	5,42±0,65	8,17±1,91
T _{max} , час	2,2±0,8	1,6±0,4	1,8±0,4	3,1±0,7
AUC 0-24, мкг·час/мл	31,01±5,27	55,96±7,81	78,70±14,53	112,67±24,26
T _{1/2} , час	17,3±3,9	19,7±4,6	*	*

* Период полувыведения рассчитан для доз 400 и 800 мг, так как при введении в дозах 1200 и 1600 мг концентрации в конечной точке достаточно велики, а $AUC_{0-t} < 80\% AUC_{0-\infty}$.

Максимальная концентрация перхлозона составляет 2,61±0,34 мкг/мл, 5,07±0,69 мкг/мл, 5,42±0,65 мкг/мл и 8,17±1,91 мкг/мл для доз 400, 800, 1200 и 1600 мг соответственно. Кинетика перхлозона в диапазоне изучаемых доз является линейной.

Выводы

Описана ВЭЖХ методика для определения нового противотуберкулезного препарата перхлозон в плазме крови. Методика пригодна для фармакокинетических исследований, поскольку обладает необходимой линейностью, точностью и воспроизводимостью. Предел количественного определения при масс-спектрометрическом и спектрофотометрическом детектировании позволяет определять терапевтические уровни концентрации перхлозона в плазме крови.

Список литературы

1. **Мишин В. Ю.** Современная стратегия лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких // Лечащий врач. — 2000. — № 3. — с. 4-10.

2. **Перельман М. И.** Фтизиатрия. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2007.

3. **Репин Ю. М.** Лекарственно-устойчивый туберкулёз лёгких // Хирургическое лечение. — СПб., «Гиппократ». — 2007. — с.168.

4. **Попович В.К.** Медико-экономический анализ и прогноз проблем туберкулеза в России // В.К. Попович. Автореферат дис. док-ра мед.наук. — М. — 2005. — с. 53.

5. **Шилова М. В.** Туберкулёз в России в 2007 году // Монография. — М. — 2008.

6. **Burwen DR, Bloch AB, Griffin LD, et al.** National trends in the concurrence of tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome. // Arch Intern Med. — 1995. — 155:1281-6.

7. Multidrug-resistant tuberculosis // Edited by Ivan Bastian and Francoise Portaels. Kluwer Academic Publishes. — 2000.

8. **Harkin T., Harris H.** Treatment of multidrug resistant tuberculosis. // In Rom W., Stuart G. Tuberculosis, Little Brown and Co., New York. — 1996. — p. 843-850.

High performance liquid chromatographic determination of perchlozone in serum using mass spectrometric detection and its application in human pharmacokinetic studies

A.M. Vlasov, Y.N. Bashkatova, A.Y. Savchenko, M.R. Khaitov,
G.V. Ramenskaya

A new sensitive high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with ultraviolet and mass spectrometry detection was developed for determination of perchlozone, a new Russians antitubercular medicine, in human plasma. Perchlozone were extracted from plasma using acetonitrile and the extract was injected into a column (ZORBAX SB C18 precolumn, 5 μ m, 35 mm $\times$ 2,1 mm I.D.) for clean-up and column (ZORBAX SB C18 analytical column, 5 μ m, 150 mm $\times$ 2,1 mm I.D.) for separation. Mean absolute recoveries were 88.0 for perchlozone. Intra- and inter-day relative standard deviations were less than 9,5 and 14,2% for perchlozone, at the different concentration ranges. The validated concentration ranges of this method were 10–10000 ng/ml for mass spectrometry determination and 250–10000 ng/ml for ultraviolet detector determination. The limits of quantification were 10 ng/ml for mass spectrometry determination and 250ng/ml for ultraviolet detector determination.

Key words: perchlozone; HPLC; pharmacokinetic, mass spectrometry.

Способ моделирования синдрома хронической усталости в эксперименте

М.А. Самотруева¹, Д.Л. Теплый², Т.К. Серезникова¹, Н.Р. Кулешевская¹

¹ — Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань

² — Астраханский государственный университет, Астрахань

Контактная информация: Серезникова Татьяна Константиновна 414057 г.Астрахань, ул.Звездная, д.9, кор.1, к.28.

Предложен способ моделирования «синдрома хронической усталости» в эксперименте, включающий сочетание информационного (формирование пищедобывательного поведения в многоальтернативном лабиринте), физического (плавание с грузом 10 % от массы тела) и социального (агонистические конфронтации между особями) воздействий. Доказано, что комплекс хронических истощающих воздействий сопровождается дисбалансом нейроиммунорегуляторных механизмов, лежащих в основе формирования данного патологического состояния.

Ключевые слова: «синдром хронической усталости», информационно-физический стресс, агонистические конфронтации, нейроиммунный дисбаланс.

«Синдром хронической усталости» (СХУ) — одно из достаточно распространенных патологических состояний настоящего времени, развитие которого связано, прежде всего, с особенностями современной жизни населения крупных городов, типом жизни в развитых странах, а также чрезмерной эмоционально-

психической нагрузкой на организм. Его появление напрямую связано с резким ускорением ритма жизни и увеличением умственной и психологической нагрузки. В большинстве случаев данное заболевание поражает энергичных, ответственных и деловитых людей. Как самостоятельная нозологическая форма «синдром хронической усталости» охарактеризован в конце прошлого века, но этиология и патогенез этого процесса, несмотря на многочисленные исследования, полностью не раскрыты. За последние годы появлялось множество теорий, но все они оказались небезупречны. Поэтому и до сегодняшнего дня это заболевание называется «синдромом». Лидирующее положение имеют несколько гипотез происхождения «синдрома хронической усталости»: вирусная (вирусы Эпштейн-Барра, герпеса 1-го, 2-го и 6-го типов, цитомегаловирусы, энтеровирусы и др.); иммунная (прежде всего, цитокиновая дисрегуляция); «дрожжевая» (грибы рода *Candida* продуцируют нейротоксин, определяющий клинические проявления), генетическая (мутация гена, отвечающего за активность кортизола), «депрессивная» (хроническая усталость — вариант депрессивного состояния). «Синдром хронической усталости» является многофакторным заболеванием с преимущественным нарушением функции центральной нервной, иммунной и эндокринной систем в ответ на различные повреждающие факторы (инфекционные, стрессовые, физические и др.) [4, 6].

Известен способ моделирования СХУ путем однократного внутрибрюшинного введения животным синтетической двучепочечной РНК — Поли И:Ц [2]. Однако, данный способ не является полноценной моделью патологии, так

как он не учитывает многих патогенетических звеньев реальной клинической ситуации, т.е. указанный способ моделирования не позволяет комплексно проанализировать специфику развития патологии. Кроме того, индукция хронической усталости введением синтетической РНК затрудняет проведение патофизиологических и патоморфологических исследований в результате неоднозначного подхода к анализу развивающихся нарушений с позиции «что является причиной нейроиммунных нарушений — инъекция РНК или формирующийся СХУ?».

Целью нашей работы явилось создание такой модели экспериментального СХУ, при которой индуктором патологии рассматривалась бы не инъекция синтетического агента, а комплекс хронических истощающих воздействий на психоэмоциональное, физическое состояние и когнитивные функции организма.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Wistar 5-7 мес. возраста массой 200-250 г. Животные получены из питомника филиала «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН. Содержание крыс осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми «Международной конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986).

Животные были разделены на 2 группы (n=10): контрольную, представленную интактными особями и опытную, которую формировали крысы с моделью СХУ.

Моделирование СХУ проводили путем сочетания информационно-физического и социального воздействий. Информационно-физическое воздействие основано на чередовании двух ви-

дов нагрузок: информационной — формирование пищедобывательного поведения в многоальтернативном лабиринте, структура которого меняется каждые 2-3 дня и физической — плавание с грузом 10 % от массы тела (температура воды 30°C, время «до предела») [1, 3]. Социальные взаимодействия формировались в результате повторного опыта побед и поражений в ежедневных конфронтациях [5]. Для этого животных помещали в экспериментальные клетки, разделенные прозрачной перегородкой с отверстиями, по одному животному в каждый отсек. Ежедневно во второй половине дня (15.00-17.00 часов) перегородку убирали на 10-15 минут, что приводило к конфронтациям. После каждой конфронтации побежденного самца помещали в незнакомую клетку с другим агрессивным самцом за перегородкой.

Ежедневно на фоне конфронтаций лабораторные животные подвергались информационному и физическому «испытаниям» (интервал между проведением поведенческого моделирования 1 час). Продолжительность воздействия 20 дней.

Оценку функционального состояния иммунной системы проводили на основе клеточной реакции гиперчувствительности замедленного типа с определением индекса реакции (ИР ГЗТ), гуморальной реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), латексного теста по изучению фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови с определением фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ). Также определяли уровень различных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови. В качестве антигенного стимула использовали эритроциты барана.

Психоэмоциональный статус и двигательная активность животных изучены

в поведенческих тестах: «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое поле» и «Порсолт».

Результаты были обработаны статистически с использованием программы «STATGRAPH» с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В условиях экспериментальной патологии у животных опытной группы выявлено изменение психоэмоционального статуса. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» снижены время пребывания в аверсивном отсеке лабиринта в 2,6 раз и исследовательская активность в 1,8 раз; увеличилось число актов кратковременного груминга в 2,9 раз ($p < 0,05$), что свидетельствует о повышенном уровне тревожности (табл. 1).

В тесте «Порсолт» отмечено достоверное увеличение суммарного времени иммобильности (на 64 %) и снижение латентного периода до первого «зависания» (на 22 %) в сравнении с контролем ($p < 0,05$) (табл. 2). Результаты свидетельствуют о формировании депрессивноподобного состояния у животных. Изучение поведения животных в тесте «Открытое поле» показало снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности более чем на 40 %, а также исследовательской реакции в 2,8 раз ($p < 0,05$), что также говорит о повышении уровня тревожности (табл. 3). В группе животных с моделью СХУ формировался иммунный дисбаланс. Так, индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа и титр антител в реакции пассивной гемагглютинации были достоверно ниже в сравнении с интактными особями в 1,9 и 3,9 раз соответственно ($p < 0,05$) (табл. 4). Оценка фагоцитарной

Таблица 1

**Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости» в тесте
«Приподнятый крестообразный лабиринт»**

Поведенческие показатели	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
Время, проведенное на открытых рукавах, M ± m, сек.	9,8 ± 1,4	3,8 ± 0,6*
Стойки, M ± m	8,1 ± 0,5	4,4 ± 0,1*
Кратковременные акты груминга, M ± m	0,9 ± 0,1	2,6 ± 0,3*

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Таблица 2

**Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости»
в тесте «Порсолт»**

Поведенческие показатели	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
Иммобильность, M ± m, сек.	53,7 ± 4,6	88,1 ± 7,3*
Латентный период до первой иммобильности, M ± m, сек.	74,9 ± 2,1	58,3 ± 4,4*

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Таблица 3

**Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости»
в тесте «Открытое поле»**

Поведенческие показатели	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
Горизонтальная двигательная активность, M ± m	30 ± 3,0	17 ± 1,7*
Вертикальная двигательная активность, M ± m	6,1 ± 0,5	3,4 ± 0,1*
Исследовательские «заглядывания» в «норки», M ± m	9,1 ± 0,1	3,3 ± 0,3*

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

активности нейтрофилов периферической крови показала активацию процессов неспецифической резистентности на фоне экспериментальной патологии ($p < 0,05$). Неоднозначным было изменение

уровня различных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови: отмечалось снижение IgM на 30,8 % и увеличение IgG более чем на 20 % в сравнении с контролем ($p < 0,05$) (табл. 4).

Таблица 4

**Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости»
в тесте «Открытое поле»**

Группы животных Показатели иммунного ответа	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
ИР ГЗТ, М ± m, %	13,3 ± 2,3	6,9 ± 1,1*
Титр антител в РПГА, М ± m, lg	1,32 ± 0,16	0,34 ± 0,06*
ФИ, М ± m, %	65,5 ± 2,5	77,5 ± 1,4*
ФЧ, М ± m,	5,2 ± 0,26	5,5 ± 0,21
Иммуноглобулин G, М ± m, г/л	6,37 ± 0,06	7,81 ± 0,01*
Иммуноглобулин M, М ± m, г/л	0,52 ± 0,01	0,36 ± 0,06*

*— $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Выводы

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при моделировании «синдрома хронической усталости» путем сочетания информационно-физического и социального воздействий отмечаются нарушения функциональной активности нервной и иммунной систем, что является ведущим признаком при формировании данного патологического состояния. Предложенная модель может найти применение в экспериментальной патофизиологии, патоморфологии и фармакотерапии «синдрома хронической усталости».

Список литературы

1. **Никольская К. А.** Эволюционные аспекты интеллекта позвоночных — может ли интеллект быть фактором, ограничивающим выбор среды обитания? // Электрон. научн. журнал «Исследовано в России», 143/050630. — 2005. — с. 1442-1500.
2. **Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Корнева Е.А.** Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при синдроме хронической усталости в эксперименте // Росс. физиол. Журнал. 2009. — Т.95. — № 12. — с. 1324-1335.
3. **Усик С.В., Ленкова Н.В.** Биоэнергетическая характеристика физических

нагрузок различного характера // Физиол. Журнал СССР. — 1981. — № 9. — с. 1370-1376.

4. *Fukuda K., Straus S.E., Hickie I. et al.* The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study // Ann. Intern. Med. — 1994. — Vol. 121. — p. 953-959.

5. *Kudryavtseva N.N.* Social model of depression in mice of C57BL/6J strain // N.N. Kudryavtseva, I.V. Bakshtanovskaya, L.A. Koryakina //

Pharmacol. Biochem. Behav. — 1991. — Vol. 38. — № 2. — p. 315-320.

6. *Katafuchi T., Kondo T., Yasaka T., Kubo K., Take S.* Prolonged effects of polyribonucleosinic : polyribocytidylic acid on spontaneous running wheel activity and brain interferon alfa mRNA in rats: a model for immunologically induced fatigue // Neuroscience. — 2003. — Vol. 120. — p. 837-845.

The way modeling of a syndrome of chronic weariness in experiment

M.A. Samotrueva, D.L. Tepliy, T.K. Seregnikova, N.R. Kuleshovskaya

The way of modelling of «chronic fatigue syndrome » in the experiment, including a combination information (formation of food-procuring behaviour in a multialternative labyrinth), physical (swimming with the load of 10% from the total body weight) and social (agonistic is offered confrontation between males) influences. It is proved that the complex of chronic exhausting influences is accompanied by a disbalance of neuroimmunoregulation mechanisms underlying formation of the given pathological condition.

Key words: «chronic fatigue syndrome», information-physical stress, agonistic confrontations, neuroimmune disbalance.

***In vivo* модели для изучения анальгетической активности**

Д.А. Бондаренко¹, И.А. Дьяченко^{1,2}, Д.И. Скобцов^{1,2}, А.Н. Мурашев^{1,2}

¹ — Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино

² — Пуцинский государственный университет, Пущино

Контактная информация: Бондаренко Дмитрий Александрович catameno777@gmail.com

В исследовании представлена батарея поведенческих тестов на термическое и химическое воздействие для определения анальгетической активности. Батарея тестов отвечает современным требованиям к исследованию фармакологически активных веществ проявляющих анальгетическую активность, и гуманному обращению с экспериментальными животными. В батарею включены тесты: оценка острой болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта (тест «Горячая пластина»), хемотропная модель острой воспалительной реакции («Формалиновый тест»), чувствительность ноцицептивных рецепторов («Капсаициновый тест»), специфическая болевая реакция методом химического раздражения брюшины (тест «Укусные корчи»), модель воспаления вызванного инфекцией (гиперчувствительность, спровоцированная CFA), исследование анальгетической активности в сочетании с блокаторм опиоидных рецепторов (налуксон — чувствительная анальгезия). Данная батарея тестов полностью отвечает требованиям доклинического испытания новых фармакологически активных анальгетических средств.

Ключевые слова: модель *in vivo*, анальгетическая активность, гуманное обращение с животными, GLP.

Проведение всестороннего изучения активности потенциального лекарственного вещества (ЛВ) в экспериментах на животных является основной частью доклинических испытаний фармакологического исследования. На сегодняшний день исследование новых ЛВ, обладающих анальгетической активностью, занимает ~24% от общего числа исследований в мире [7]. Независимо от причин возникновения, многие острые и хронические заболевания сопровождаются болью, резко снижающие качество жизни человека, его социальную адаптацию, вызывая постоянные страдания. Именно болевые синдромы являются одной из основных причин обращения людей за врачебной помощью. Более 90% заболеваний ассоциированы с болью. Около 20% человечества страдает от хрониче-

ской боли. Ежедневно свыше 30 млн. людей в мире принимают какой-либо анальгетик. Однако их прием является одной из самых типичных причин нежелательных реакций на фармакотерапию. По официальным оценкам, в США использование ненаркотических анальгетиков и нестероидных противовоспалительных препаратов ежегодно приводит более чем к 70 тыс. госпитализаций и 7 тыс. смертельных случаев [2].

Согласно формулировкам международного комитета экспертов, боль — это неприятное сенсорное и эмоциональное переживание, связанное с истинным или потенциальным повреждением ткани или описываемое в терминах такого повреждения [10]. Боль может быть классифицирована различными способами.

а) По локализации боли бывают:

- соматические поверхностные (в случае повреждения кожных покровов);
- соматические глубокие (при повреждении костно-мышечной системы);
- висцеральные (при повреждении внутренних органов).

б) По месту повреждения структур нервной системы выделяют боли:

- нейропатические, возникающие при повреждении периферических нервов;
- центральные, возникающие при повреждении структур ЦНС.

в) При не совпадении боли с местом повреждения возникают боли:

- проецируемые (например, при сдавливании спинномозговых корешков, боль проецируется в иннервируемые ими области тела);
- отраженные (возникают вследствие повреждения внутренних органов и локализуются в отдаленных поверхностных участках тела, т.е., боль отражается на соответствующем дерматоме по отношению к кожной поверхности).

г) По временным характеристикам боль бывает:

- острая (новая, недавняя боль, неразрывно связанная с вызвавшим ее повреждением и, как правило, являющаяся симптомом какого-либо заболевания, исчезает при устранении повреждения);
- хроническая (продолжается длительный период времени даже после устранения причины ее вызвавшей, часто приобретает статус самостоятельной болезни, например, воспалительный процесс) [6].

Детальные механизмы генерирования боли до конца не изучены. Ключевые компоненты рецепторной системы восприятия боли сосредоточены на ноцицепторных нейронах. Ноцицептивная афферентная система состоит из болевых рецепторов (ноцицепторов), болевых нерв-

ных волокон и нейронов в центральной нервной системе. Ноцицепторы — механические, термические и хеморецепторы, которые активируются теплом, электро-током и аллогенами (брадикинин, гистамин, серотонин, изменение концентрации ионов водорода и калия, простагландин Е, ацетилхолин, лейкотриены и ряд других биологически активных веществ). В 1997 году были открыты новые болевые хеморецепторы — ванилоидные (капсаициновые) рецепторы VRPV 1, локализуются на коже, глубоких тканях и внутренних органах, за исключением ткани мозга и печени.

Повреждающий стимул, полученный ноцицепторами, передает сигнал через спинной мозг далее в головной мозг. В передаче сигнала принимают участие Аβ-миелинизированные болевые нервные волокна — для механо- и терморецепторов и С-немиелинизированные — для хеморецепторов. В задних рогах спинного мозга болевые импульсы переключаются по трем путям проведения:

— в передних рогах спинного мозга — на двигательные мотонейроны (их возбуждение проявляется быстрым защитным двигательным рефлексом со стороны скелетных мышц);

— в боковых рогах спинного мозга — на вегетативные нейроны симпатического отдела нервной системы, стимуляция которой приводит к функциональной адаптации внутренних органов;

— в головном мозге — к структурам восприятия и оценки боли по двум путям.

Первый — специфический (неоспиноталамический, Аβ) путь — проводит «эпикритическую» (раннюю, короткую и острую) боль; медиатор — глутаминовая кислота.

Второй — неспецифический (палеоспиноталамический, С) путь — проводит

«протопатическую» (позднюю, тупую и длительную) боль; медиаторы — глутамат, и пептиды — тахикинины (субстанция Р, нейрокинин А), кальцитонин-генсвязанный пептид, и холецистокинин.

Центры боли (тела нейронов в ЦНС) — таламус, сенсомоторные области коры, лобная кора. Антиноцицептивная система — система подавления болевых ощущений. Состоит из 4 отделов — опиатного, каннабиоидного, глицинового и ГАМК-ергического.

Опиатная система — рецепторы 5 эндогенных анальгетических пептидов: лей-энкефалин, мет-энкефалин, диноρφин А, диноρφин В, β -эндорфин. Локализация опиатных рецепторов — пресинаптическая мембрана ноцицепторов (70%), окончания С-волокон, спинной и головной мозг.

Каннабиоидная система — CB1 и CB2 рецепторы. Их активируют производные арахидоната — анандамид и 2-арахидонил-глицерол.

Другие ингибиторы болевых импульсов — ГАМК, глицин, серотонин, дофамин и др.

Обезболивающие средства, применяемые в клинической практике, на разных уровнях воздействуют на различные уровни ноцицептивной системы.

К экзогенным анальгетикам, которые действуют на уровне задних рогов спинного мозга, относят:

1. Экзогенные опиоиды.

2. Препараты, воздействующие на ГАМК-ергические структуры для снижения возбудимости нейронов заднего рога (баклофен, тизанидин, габапентин).

3. Противосудорожные препараты (карбамазепин, дифенин, ламотриджин, вальпроаты и бензодиазепины), тормозящие проведение нервных импульсов по

чувствительным нервам и обладающих агонистическим действием на ГАМК-ергические рецепторы нейронов задних рогов и клеток ядра спинномозгового пути тройничного нерва.

4. Агонисты α_2 -адренорецепторов.

5. Блокаторы обратного захвата серотонина, повышающие концентрацию этого нейротрансмиттера в ядрах ретикулярной формации мозгового ствола, из которых исходят нисходящие тормозящие пути, воздействующие на интернейроны заднего рога (флуоксетин, амитриптилин).

5. Модуляторы активности TRPV1 рецептора.

6. Принципиально нового класса препаратов — SNEPCO (Selective NEuronal Potassium Channel Opener — селективных нейрональных открывателей калиевых каналов), оказывающих воздействие на процессы сенситизации нейронов заднего рога за счет стабилизации мембранного потенциала покоя (флупиртин, катадолон); антагонисты NMDA-рецепторов, «стирающих» болевую память (кетамин, декстраметорфан).

На уровне ствола мозга ингибирующее воздействие оказывается серотонинергическими и норадренергическими структурами. Умеренная кратковременная недостаточность серотонинергических структур приводит к развитию тревоги и боли, при длительно существующем дефиците серотонина может развиваться депрессия. Этим объясняется выраженное анальгетическое действие малых доз антидепрессантов при хроническом болевом синдроме даже при отсутствии антидепрессивного действия. Однако более высокая эффективность трициклических антидепрессантов по сравнению с ингибиторами обратного захвата серотонина может свиде-

тельствовать о большей роли норадренергических структур в формировании хронической боли.

Следующий синаптический уровень включает в себя таламус, лимбическую систему и прилежащие субкортикальные и кортикальные структуры головного мозга. Нейротрансмиттеры, оказывающие ингибирующее воздействие на проведение ноцицептивной информации из субкортикальных структур в кору, мало изучены, одним из них является γ -аминомасляная кислота. Предполагается, что именно на этом уровне оказывают анальгетическое действие антиконвульсанты.

Потенциальной точкой приложения анальгетиков являются каннабиноид-рецепторы (CB1 и CB2). Экспрессия CB2-рецепторов особенно выражена на воспалительных клетках, тогда как CB1-рецепторы локализованы в периферических ноцицепторах и центральной нервной системе. Антиноцицептивные свойства агонистов каннабиноидных рецепторов продемонстрированы в поведенческих и электрофизиологических экспериментах с использованием моделей острой боли и воспаления.

Локальные анестетики, блокируют периферические рецепторы (лидокаин и пр.). Наркотические анальгетики имитируют нейромедиаторные эффекты эндогенных опиоидных пептидов (энкефалинов и эндорфинов). Воздействие оказывается на уровне задних рогов спинного мозга. Механизм обусловлен взаимодействием наркотических анальгетиков с расположенными преимущественно пресинаптически опиатными рецепторами, что приводит к ингибированию межнейронной передачи болевых импульсов к ядрам таламуса, гипоталамуса, миндалевидному комплексу, повышению порога

болевой чувствительности (увеличению интервала переносимости боли). Кроме того, наркотические анальгетики повышают активность и антиноцицептивной системы, энкефалинергических нейронов, на телах которых тоже есть так называемые опиатные рецепторы.

Патогенез боли вызванной воспалением или повреждением тканей обусловлен непосредственным раздражением или сенсibilизацией ноцицептивных нервных окончаний медиаторами воспаления. Источниками этих медиаторов являются поврежденные клетки тканей, кровеносные сосуды, стволовые клетки, лейкоциты [8]. По воздействию на периферические компоненты боли — соматические (воспаление, отек и др.) и нейрохимические (стимуляцию болевых рецепторов) наиболее выраженный эффект имеют нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Механизм анальгетического и противовоспалительного действия НПВП связан с угнетением активности циклооксигеназы (ЦОГ) в спинном мозге и на периферии — фермента, регулирующего биотрансформацию арахидоновой кислоты в простагландины (ПГ) — простаглицлин и тромбоксан.

Известны три изоформы ЦОГ, которые обозначаются как ЦОГ-1, ЦОГ-2, ЦОГ-3. ЦОГ-1 постоянно присутствующий в большинстве тканей, относится к категории «конститутивных» («структурных») ферментов, регулирующих физиологические эффекты простаглицлинов. ЦОГ-2 начинает экспрессироваться генами клеток эффекторов воспаления после первичной альтерации и усиливает воспаление. ЦОГ-3 преимущественно экспрессируется в клетках коры головного мозга, ингибируется парацетамолом, а также метамизолом и фена-

цетином. Принятая на сегодняшний день классификация НПВС выделяет неселективные ингибиторы ЦОГ, селективные ингибиторы ЦОГ-1, селективные ингибиторы ЦОГ-2, ингибиторы ЦОГ-3.

Целью данного исследования является, разработка и стандартизация методов изучения анальгетической активности, в соответствии с международными стандартами проведения экспериментов на лабораторных животных.

Термический ноцицептивный тест «Горячая пластина» (*hot plate*)

Основной стандартной операционной процедурой для измерения порога острой болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта изучаемых фармакологических препаратов в ответ на термическое раздражение является тест «Горячая пластина» (*Hot plate*) [1]. Тест является базисным для исследования анальгетической активности, и используется для выявления анальгетически активных соединений подавляющих соматически поверхностную боль, и острую боль.

При помещении на горячую поверхность, с достижением порога болевой чувствительности со стороны животного наблюдаются двигательные реакции беспокойства: одергивание лап, облизывание подушечек лап и подпрыгивание. В данном тесте учитывается латентное время с момента помещения животного на горячую поверхность до первого облизывания передних и затем задних лап, а также латентное время первого подпрыгивания (любой попытки оторвать от поверхности одновременно все четыре лапы). Данная методика позволяет определять показатели: анальгетическая активность тестируемого объекта, пиковое время анальгезии, длительность анальгезии.

В исследованиях проводимых в ЛБИ для быстрой и эффективной проверки уровня обезболивания на мелких лабораторных животных использовался *Hot plate*-метр (*Hotplate Analgesia Meter, Columbus Instruments, USA* (Рис.1)). *Hot plate*-анальгезия-метр представляет собой термостатически контролируемую, электронагреваемую поверхность (254 мм × 254 мм × 19 мм), ограниченную прозрачными акриловыми стенками вариант клетки (19 см высотой, с открытым верхом). Передняя панель прибора оборудована кнопками для контроля времени с точностью до 0,1 секунды и температурного режима с точностью до 0,1°C. Температурный диапазон нагреваемой пластины от 30°C до 79,9°C.

До начала испытания в течение 10 минут тест-системы акклиматизируются в комнате для проведения исследования. В данном эксперименте следует использовать животных однократно, так как повторное помещение животного на термостатируемую пластину вызывает незамедлительную реакцию на касание поверхности. Каждая группа должна содержать не менее 10-12 животных. Термостат анальгезия-метра устанавливают на температуру 55°C. После инъекции исследуемого вещества животное аккуратно помещают на нагревательную пластину и в тот же момент нажимают кнопку «старт» на панели прибора. Отмечают латентное время облизывания передних и задних лап (с момента помещения животного на поверхность прибора до первого облизывания) и латентное время первого подпрыгивания. После этого нажимают на кнопку «стоп» и животное убирают с горячей поверхности. При этом остальные поведенческие реакции игнорируют. Для уменьшения вероятности теплового повреждения подушечек лап максималь-

ное время эксперимента не должно превышать 60 сек. Если животное не проявило активности в течение 60-секундного интервала, то его убирают с горячей поверхности, а за латентное время подпрыгивания принимают 60 сек., что и является основным при расчете МПЕ (максимального возможного эффекта). Исследование проводится минимум в трех дозировках для расчета ED_{50} . Для определения пикового времени анальгетического действия препарата измеряют латентный период у контрольной группы (точка 0) и через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 сек. после введения препарата у тестируемых групп. Поверхность прибора протирается салфеткой, смоченной дезинфектантом (0,5% хлоргексидин-биглюконат на 70% этаноле), перед помещением на нее очередного животного [4].

Анализ данных определения анальгетической активности препарата: (данный вариант может быть использован как альтернатива стандартному представлению данных в виде $mean \pm sem$):

1. Рассчитать среднее значение и стандартное отклонение латентности для контрольной группы.
2. Подсчитать число животных для данной дозы, у которых показатель латентности больше, чем сумма среднего и двух стандартных отклонений у контрольной группы.
3. Рассчитать процентное отношение таких животных для каждой дозы (конечная точка анальгезии).
4. Подсчитать процент животных, показывающих анальгетический эффект для каждой дозы.
5. Построить кривую дозы-эффекта, отложив дозу препарата по оси абсцисс, а процент животных с анальгетической

активностью — по оси ординат.

6. Определить ED_{50} , т.е. дозу, необходимую для проявления 50%-й анальгетической активности препарата.

7. Построить кривую зависимости латентного периода по группам (ось y) от вводимой дозы препарата (ось x).

Анализ данных определения пикового времени анальгетического действия препарата:

1. Рассчитать средние значения, полученные от всех животных в группе для каждой дозы и стандартное отклонение.

2. Построить кривую зависимости латентного периода по группам (ось y) от времени после введения (ось x).

3. Оценить пиковое время анальгезии по максимальному значению латентного времени, представленного на графике.

Анализ данных определения продолжительности анальгетического действия препарата:

1. Рассчитать средние значения по группам.

2. Построить кривую зависимости латентности по группам от времени после введения.

3. Рассчитать площадь под кривой, которая является мерой длительности анальгезии и которая зависит от дозы препарата и его активности.

«Формалиновый тест»

Адекватной хемогенной моделью острой воспалительной реакции является «Формалиновый тест» (модель неспецифического воспаления). Известно, что болевая реакция на подкожное введение раствора формалина состоит из



Рисунок 1. Hot — plate Analgesia Meter, Columbus Instruments, USA

двух фаз. Первая фаза формалинового теста характеризует острую боль, возникающую в ответ на инъекцию химического раздражителя (длится около 5 мин) и связана в основном с прямой активацией тонких немиелиновых С-волокон, большинство из которых передаёт импульсацию от болевых рецепторов. Вторая фаза позволяет оценить тоническую боль и начинается через 10–15 мин после инъекции раствора формалина и длится более 1 часа (в зависимости от концентрации раствора формалина). Она является результатом развития воспалительного процесса в периферических тканях и изменений функции нейронов задних рогов серого вещества спинного мозга, где лежат нейроны болевых восходящих

путей. Интенсивность болевого ответа в первую и во вторую фазы теста оценивают по продолжительности паттернов вылизывания (в секундах), типичной для данного теста поведенческой реакции мышей. Уменьшение продолжительности паттернов вылизывания доказывает наличие болеутоляющего действия у тестируемых объектов.

За 15 минут до начала опыта вводятся тестируемое вещество. Контрольным животным вводят эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. По истечении 15 минут инъецируется 20 мкл 2% водного раствора формалина при помощи шприца Hamilton (25 мкл) с иглой 0,3 g, интраплаттарно в подушечку задней лапы. Животное помещается в прозрачный бокс, одновременно с этим включалась программа-таймер, ко-

торая представляет собой секундомер с возможностью отметки временных точек. Интенсивность болевого ответа в первую и во вторую фазы теста оценивается по количеству и продолжительности паттернов облизывания (в секундах) инъецированной лапы в течение 60 минут. Время облизывания суммируется для каждого животного. После окончания опыта, полученные данные статистически обрабатываются [3].

«Капсаициновый тест»

Как известно наиболее простой путь боли обусловлен воспалением — непосредственное раздражение или сенсibili-

лизация ноцицептивных нервных окончаний медиаторов воспаления. В настоящее время изучен целый ряд рецепторов из семейства белков TRP-ионных каналов. Наиболее известным представителем данной группы является рецептор капсаицина TRPV1, открытие которого стало важным этапом в изучении природы болевых ощущений на молекулярном уровне. TRPV1 рецепторы находятся главным образом в ноцицептивных нейронах в периферической нервной системе, но они также были описаны во многих других тканях, в том числе центральной нервной системе. Чувствительность ноцицептивных рецепторов TRPV1 может быть активирована разнообразными экзогенными и эндогенными физическими и химическими раздражителями. Активация TRPV1 приводит к повышенной чувствительности на болевые стимулы (гипералгезии) или болевые ощущения в ответ на неболезненные раздражители (аллодинии), снижение температуры тела, усиление потоотделения. Исследование анальгетической активности в селективном тесте с агонистом TRPV1 капсаицином (капсаициновый тест) является необходимым в изучении специфической фармакологической активности [11]. Тест системе вводится тестируемый объект и/или «контрольный» объект. Через 15 минут вводится 10 мкл раствора капсаицина (3 мкг в 10 мкл 10% этанол растворенного в 0,9% NaCl) интраплантарно в подушечку левой задней лапы. После введения лапа протирается этанолом, для предотвращения накожного раздражения капсаицином. После введения отмечается время (латентный период), которое пройдет до начала реакции (мышь начнет сильно трясти лапой и облизывать её). Далее регистрируется количество паттернов облизывания и суммар-

ное время облизывания лапы в течение 15 мин [4].

Тест «Укусные корчи»

Тест направлен на исследование острой висцеральной и соматически глубокой боли. Специфическую болевую реакцию «корчи» методом химического раздражения брюшины (специфическая болевая реакция, сопровождающаяся характерными движениями животных, включающими сокращения брюшных мышц, чередующиеся с их расслаблением, вытягивание задних конечностей и прогибание спины (Acetic acid-induced writhing test, «Writhing» test, *Abdominal constriction test*)) вызывают внутрибрюшинным введением 0,6% уксусной кислоты (0,1 мл/10 г массы тела) [11]. Для выполнения теста необходимо зафиксировать в руке животное, собрав кожу на спинной поверхности так, чтобы кожа на брюхе была максимально натянута. При необходимости — зафиксировать хвост пальцами. Для выполнения инъекции животное опустить вниз головой под углом 45°. В таком положении кишечник сдвигается в брюшной полости вниз от места инъекции по направлению к опущенной голове. Место инъекции — нижний квадрант брюха справа или слева от белой линии обрабатывается антисептиком. Объем введения зависит от веса тела животного и требований протокола исследования. Оптимальный — 5-10 мл/кг, максимальный для крыс — 20 мл/кг, для мышей — 50 мл/кг. Используются шприцы объемом 1-2 мл с размером иглы 25-30 G (0,5-0,3 мм). Игла вводится в место инъекции, держа ее скосом вверх под углом 30°. Производится небольшая аспирация для проверки правильности попадания. Если игла введена правиль-

но, то при аспирации в шприц ничего не засасывается. Если отсасывается жидкость зелено-коричневого цвета, значит, игла попала в кишечник. Если жидкость желтого цвета — игла попала в мочевой пузырь. При аспирации в шприц любой жидкости раствор вводить нельзя. Необходимо сменить иглу и шприц, в шприц набрать новый раствор. При правильном положении иглы вводится раствор и медленно вынимается игла. Тест система помещается в испытательную камеру. В течение следующих 15 мин. после инъекций подсчитывают количество «корчей» возникающих в ответ на введение химического раздражающего агента для каждого животного. Анальгетический эффект оценивается по уменьшению количества «корчей» с одновременным вытягиванием по крайней мере одной задней конечности в процентах к контролю. Контрольным группам вводят изотонический раствор. Критериями эффективности при скрининге — снижение болевой реакции не менее чем на 50% [7].

Гиперчувствительность, спровоцированная CFA

Гиперчувствительность, спровоцированная CFA (модель воспаления вызванного инфекцией). Воспалительный процесс может формировать хронические боли соматически глубокого происхождения (повреждение подушечки лапы). Оценивается острая боль в тестировании и переносимости хронической боли. Протокол исследования направлен на оценку анальгетической активности после развития воспалительного процесса. В заднюю лапу тест системе субплантарно вводится 20μl смеси CFA (полного адьюванта Фрейда)/0,9% NaCl (1:1). Контрольная группа получает 0,9%

NaCl, вторая контрольная группа экспериментальная группа получает CFA. Через 21–24 часа после введения CFA экспериментальным животным вводится тестируемый объект, контрольным животным — 0,9% NaCl. Через 15 — 20 мин. проводится испытание порога болевой чувствительности в тесте «Горячая пластина» ($t=55^{\circ}\text{C}$) контролируя только конечность, в которую вводили CFA. Отмечается время подпрыгивания и/или облизывания конечности, в которую вводили CFA [7].

Налоксон-чувствительная анальгезия

Исследование анальгетической активности в сочетании с блокатором опиоидных рецепторов осуществляется для оценки вовлечения опиатной системы в механизм анальгетической активности. Тестирование тест системы осуществляется в тесте «Горячая пластина». Влияние на опиоидные рецепторы идентифицируется по пробе с налоксоном (Naloxone hydrochloride) — неселективным антагонистом опиоидных рецепторов. Если введение налоксона снимает анальгезию, вызванную предварительно введенным тестируемым объектом, то это обнаруживает его тропность к опиоидным рецепторам и его действие оказывается налоксон-зависимым. Если такого эффекта налоксон не вызывает — агент налоксон-независим и не является лигандом опиоидной рецепторной системы [9].

Для определения возможного участия опиоидно-опосредованных механизмов предварительно, за 12–15 минут до введения исследуемого вещества, подкожно вводится 2,5 мг/кг налоксон. Затем вводится исследуемое вещество и через 15 минут, после введения исследуемого вещества животные помеща-

ются на нагревательную пластину Hot plate-метра (обычно 55°C) и отмечается латентное время облизывания передних и задних лап и первого подпрыгивания в ответ на термически индуцированную боль. Время, прошедшее до первого облизывания одной из лап или подпрыгивания животного считается временем реакции в контрольной и экспериментальных группах. Для предотвращения термического повреждения тканей максимальное время регистрации латентного периода не должно превышать 60 сек. Выявление антагонизма анальгетической активности тестируемого объекта в тесте с налоксоном (укорочение латентного периода болевой чувствительности) может свидетельствовать о его опиоидно-опосредованном механизме действия.

Выводы

Таким образом, представлены основные направления по исследованию анальгетической активности новых фармакологически активных веществ. Включающие в себя: оценку острой болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта (тест «Горячая пластина»), хемотропная модель острой воспалительной реакции («Формалиновый тест»), чувствительность ноцицептивных рецепторов («Капсаициновый тест»), специфическая болевая реакция методом химического раздражения брюшины (тест «Укусные корчи»), модель воспаления вызванного инфекцией (гиперчувствительность спровоцированная CFA), исследование анальгетической активности в сочетании с блокаторм опиоидных рецепторов (налоксон — чувствительная анальгезия). Данная батарея тестов полностью отвечает требованиям доклинического испыта-

ния новых фармакологически активных анальгетических средств в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 «НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (Principles of good laboratory practice)» утвержденным 2010-03-01.

Работа выполнена в рамках ФЦП Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК № 02.740.11.0773).

Список литературы

1. **Вальдман А. В., Игнатов Ю. Д.** Центральные механизмы боли. — Л.: Наука. — 1976.
2. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDA-VeterinarianNewsletter/ucm190729.html>
3. **Merskey H, Bogduk N.** Classification of Chronic Pain. IASP Press Seattle, WA. — 1994.
4. Методические рекомендации для обучаемых. Фармацевтический факультет ГОУ ВПО ММА им. И.М.Сеченова Росздравва. — Москва. — 2006.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина. — 2005.
6. **Eddy N.B., Leimbach D. J.** // Pharmacol Exp Ther. — Mar; 107(3):385-93. — 1953.
7. **Narender R. Gavva, Rami Tamir, Yusheng Qu, Lana Klionsky, T. J. Zhang, David Immke, Judy Wang, Dawn Zhu, Todd W. Vanderah, Frank Porreca, Elizabeth M. Doherty, Mark H. Norman, Kenneth D. Wild, Anthony W. Bannon,**

Jean-Claude Louis, and James J. S. Treanor // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. — 2005. — Vol. 313. — No. 1. — p. 474–484.

8. **David J. Matson, Daniel C. Broom, Susan R. Carson, James Baldassari, John Kehne, and Daniel N. Cortright.** The journal of pharmacology and experimental therapeutics. — 2001. — Vol. 320. — No. 1. — p. 194–201.

9. **Konrad C., Schmelz M.** // Mechanismen der Schmerzentscheidung. Internist. — 2005;46. — p. 1115–1121.

10. **Koster R, Anderson M, Beer EJ.** Acetic acid for analgesic screening. Fed Proc. — 1959. — 18:412–413.

11. **Lu Yu, Fei Yang, Hao Luo, Feng-Yu Liu, Ji-Sheng Han, Guo-Gang Xing and You Wan** // Molecular Pain. — 2008. — 4:61 doi:10.1186/1744-8069-4-61.

***In vivo* models of studying of analgetic activity**

D.A. Bondarenko, I.A. Dyachenko, D.I. Skobtsov, A.N. Murashev

The article describes the set of behavioral tests that use the thermal and chemical effect to determine the analgesic activity. It meets contemporary requirements for a study of the pharmacologically active materials with analgesic activity, and to ethical treatment of experimental animals. The described tests: the evaluation of sharp painful sensitivity and potential analgesic effect («Hot plate» test), the chemogenic model of the sharp inflammatory reaction (Formalin-Induced Nociception), the sensitivity of the nociceptive receptors (Capsaicin-Induced Hyperalgesia), Abdominal Constriction Test of Visceral Pain (Acetic acid induced writhings), the model of the inflammation caused by the infection (Complete Freund's Adjuvant-Induced Thermal Hyperalgesia), the study of analgesic activity in combination with the blocker of the opioid receptors (nolaxone-sensitive analgesia). This set of tests completely satisfies the requirements of preclinical testing of new pharmacologically active analgesic substances.

Key words: *in vivo* models, analgesic activity, ethical treatment of animals, GLP.



Ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование»



(24-26 мая 2011 г. Москва – Светлые горы)

Завершила работу ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование» (24-26 мая 2011 г. Москва – Светлые горы). В рамках конференции состоялись заседания 4 симпозиумов, 3 «круглых столов», школа-семинар молодых ученых. В конференции приняло участие более 150 человек. Было заслушано 80 докладов. Среди них особо можно выделить доклады директора НЦБМТ РАМН, академика РАН, член-корреспондента РАМН Н.Н.Каркищенко «Новые биомедицинские технологии», члена-корреспондента РАМН Т.А.Гуськовой «Лекарственная токсикология и безопасность клинических исследований», члена-корреспондента РАМН Н.А.Фудина «Инновационные технологии в спортивной медицине». В ходе выступлений и дискуссий выступили представители из

НИИ общей патологии патофизиологии РАМН, НИИ нормальной физиологии им.П.К.Анохина РАМН, НИИ фармакологии СО РАМН, Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого, Ростовского государственного медицинского университета, Волгоградского государственного медицинского университета, Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, ООО «Акела-Н», фирмы Metris BV (Нидерланды), научно-производственной фирмы «Мобитек-М», ЗАО «Атом-мед центр» и других учреждений. По результатам работы конференции будут подготовлены статьи и краткие сообщения, которые будут опубликованы в журнале «Биомедицина».



