

Научный журнал.

Основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН

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

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

Редакционный совет:

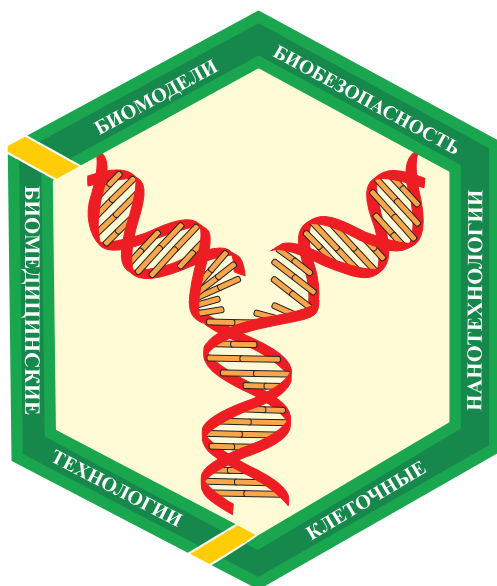
член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, prof. Iorgen Backmen (Германия), акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А. М. Дыгай, prof. Moineau S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С. И. Колесников, акад. РАМН А. А. Кубатиев, акад. РАМН В. Г. Кукес, акад. 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 07.09.2011 г.
Тираж 3 000 экз.



Содержание

НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Д.Б. Чайванов, Н.Н. Каркищенко Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации	6
--	---

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

А.А. Спасов, М. П. Воронкова, Г. Л. Снигур, Н. И. Чепляева, М. В. Чепурнова Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2.....	12
Б.С. Смбатян, Г.Д. Каланадзе, М.В. Ломакин, А.С. Алейников, Г.М. Ожаровская, Н.А. Полевова, Л.Т. Хуцишвили Экспериментальное биомоделирование для оценки возможности изменения морфотипа слизистой оболочки полости рта.....	19
Т. В. Шефер Модификация токсического действия циклофосфана ацетатом аммония на крыс.....	25
А.В. Лобанов, А.Н. Родионов, Е.А. Туховский, А.Н. Мурашев Модель направленного изменения в закладке коры мозга в эмбриогенезе у мышей для изучения постнатальных нарушений развития.....	29
Н.И. Маслова, А.Б. Петрушин, Г.И. Пронина, А.О. Ревякин Особенности изменения биохимического состава крови пойкилотермных биомоделей при недостаточном питании	37

МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н.Н. Каркищенко, А.А. Вартанов, А. В. Вартанов, Д.Б. Чайванов Локализация проекций полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа	40
А.А. Шумков, Е.В. Супрун, В.В. Шумянцева, А.И. Арчаков Сенсорный элемент на основе наночастиц золота для определения кардиомакёров	46

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Г.И. Блохин, Д.А. Беляев, М.М. Пекелис, Е.М. Губская, Л.Х. Казакова Особенности гистологического строения кожных покровов и молочной железы безволосых крыс	50
Л.А. Болотских, Н.Н. Каркищенко, И.Ю. Егорова Внедрение гнотобиотехнологии для создания лабораторных животных СПФ-статуса	53
М.Б. Плотников, А.С. Васильев, О.И. Алиев Особенности гемореологического статуса у крыс с наследственным гипоталамическим несхарным диабетом (линия Brattleboro).....	57

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

И.Н. Тюренков, М.А. Самоутруева, Н.Н. Гражданцева, Е.Б. Хлебцова, В.М. Берестовицкая, О.С.Васильева Иммуномодулирующие свойства композиции фенотропила и глутаминовой кислоты	63
П.И. Скопин, А.В. Зорькина, М.Т. Кулаев, А.А. Пешев Изучение влияния препаратов антиоксидантного действия на физиологические реакции животных, получающих противоопухолевую химиотерапию	70

Материалы научно-практической конференции «Доклиническая оценка безопасности биотехнологических и лекарственных растительных средств»

Т.А. Гуськова, Р.М. Хаитов Особенности доклинических токсикологических исследований лекарственных средств, созданных на основе биотехнологии	76
И.В. Березовская, Т.А. Гуськова, А.Д. Дурнев Методические рекомендации по изучению безопасности воспроизведенных лекарственных препаратов.....	78
О.И. Терёшкина, И.А. Самылина, И.П.Рудакова, И.В. Гравель Гармонизация подходов к оценке безопасности состава лекарственных растительных препаратов	80
О.И. Терёшкина, И.А. Самылина, И.П.Рудакова, И.В. Гравель Сравнительный анализ отечественного и зарубежного подходов к нормированию мышьяка в лекарственном растительном сырье.....	86
Е.Е. Лесиовская, Т.Н. Саватеева-Любимова Критерии доклинической оценки эффективности и безопасности лекарственных растительных средств	91
А.С. Иванова, Т.Б. Мастернак, Е.Ю. Малкина, А.И. Мартынов Принципы оценки иммунологической безопасности фармацевтических продуктов	94
Н.П. Неугодова, Г.В. Долгова, А.В. Гавриков Некоторые вопросы оценки токсичности генно-инженерных лекарственных препаратов.....	98
С.В. Луценко, М.В. Дмитриева, Н.Б. Фельдман Проблемы разработки и оценки безопасности нанопрепаратов	101
Л.В. Крепкова Использование модели гиперлипидемии и атеросклероза у крыс в токсикологическом эксперименте	103
В.В. Бортникова Экспериментальное изучение безопасности гипорамина – нового фитопрепарата противовирусного действия	106
С.В. Козин, Ф.П. Крендаль, Л.В. Левина, В.Н. Чубарев Сравнение общетоксического действия препаратов родиолы розовой биотехнологического и природного происхождения	109
Р.Н. Аляутдин, Ф.П. Крендаль, С.В. Козин, Л.В. Левина, Н.Г. Преферанская, В.Н.Чубарев Оценка безопасности биотехнологического женьшеня в эксперименте.....	112
Р.Н. Аляутдин, М.Д. Гусейнов, И.Н. Зильфикаров, Б.К.Романов Стресс-протекторная фитотерапия.....	115
О.И. Терёшкина Современные критерии оценки безопасности состава лекарственных препаратов	119

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

М.Г. Данилец, Ю.П. Бельский, Н.В. Бельская, Е.С. Трофимова, Е.Г. Учасова, А.А. Лигачева, А.Н. Иванова, В.В. Ковалев, Ю.С. Хотимченко Влияние альгината кальция на Th1 и Th2 иммунный ответ	125
Е.А. Волкова, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко Биорелевантные среды растворения – современный инструмент для моделирования процессов растворения и всасывания ЛС	133
Л.В. Мохирева, Е.Н. Хосева, О.О. Каркач, А.В. Мохирев, П.И. Джура, Т.Е. Морозова Фармакоэпидемиологическое исследование воспроизведенных комбинированных противотуберкулезных препаратов и приверженности к ним врачей-фтизиатров в широкой клинической практике.....	141

CONTENT

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

D.B. Chaivanov, N.N. Karkischenko Mathematical model of biophysical processes at transcranial micropolarization.....	6
--	---

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

A.A. Spasov, M.P. Vorohkova, G.L. Snegur, N.I. Cheplyaeva, M.V. Chepurnova Experimental model of a type 2 diabetes	12
B.S. Smbatyan, G.D. Kapanadze, M.V. Lomakin, A.S. Aleinikov, G.M. Ozharovsky, N.A. Polevova, L.T. Khutsishvili Experimental modeling to assess the possibility of changing the morphological type of the oral mucosa	19
T.V. Shefer Modification of cyclophosphamide toxicity in rat by ammonium acetate	25
A.V. Lobanov, A.N. Rodionov, E.A. Tukhowsky, A.N. Murashev Model of targeted damage of brain cortex anlage during mice embryogenesis for investigation of postnatal developmental disorders	29
N.I. Maslova, A.B. Petrushin, G.I. Pronina, A.O. Revjakin Features of biochemical structure of blood poikilothermic biomodels changes under an insufficient food conditions.....	37

BIOMEDICAL METHODS

N.N. Karkischenko, A.A. Vartanov, A.V. Vartanov, D.B. Chaivanov Localization of Brodmann fields of human cerebral cortex projections on a scalp surface.....	40
A.A. Shumkov, E.V. Suprun, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov Sensing device based on gold nanoparticles for detection of cardiac biomarkers.....	46

LABORATORY ANIMALS

G.I. Blokhin, D.A. Belyaev, M.M. Pekelis, E.M. Gubskaya, L.Kh. Kazakova Peculiarities of histological structure of cutaneous covering and milk gland of hairless rats.....	50
L.A. Bolotskykh, N.N. Karkischenko, I.Uj. Egorova Gnotobiotic introduction for creation of laboratory SPF-animals	53
M.B. Plotnikov, A.S. Vasil'ev, O.I. Aliev The hemorheological status in rats with familial hypothalamic diabetes insipidus (Brattleboro strain)	57

NONCLINICAL TESTS

I.N. Turenkov, M.A. Samotrueva, N.N. Gragdanceva, E.B. Hlebcova, V.M. Berestovickaya, O.S. Vasileva Immunomodulation properties of a composition phenotropila and L-glutaminic acids.....	63
P.I. Skopin, A.V. Zorkina, M.T. Kulaev, A.A. Peshev Effects antioxidant drugs during cytostatic therapy on rats behaviour.....	70

Materials of scientifically-practical conference «Preclinical estimation of safety of biotechnological and medicinal vegetative means»

T.A. Guskova, R.M. Khaitov Features nonclinical toxicologies of researches of medicinal agents created on the biotechnology basis.....	76
I.V. Berezovskaya, T.A. Guskova, A.D. Durnev The methodical recommendations for study of safety reproduced medicinal preparations.....	78
O.I. Tereshkina, I.A. Samylina, I.P. Rudakova, I.V. Gravel Harmonization of approaches to safety assessment of medicinal plant drugs.....	80
O.I. Tereshkina, I.A. Samylina, I.P. Rudakova, I.V. Gravel Comparative analysis of native and approaches to the valuation of arsenic in medical plant raw material	86
E.E. Lesiovskaya, T.N. Savateeva-Lyubimova Criteria for preclinical assessment of the efficiency and safety of pharmaceutical vegetable substances	91
A.S. Ivanova, T.B. Masternak, E.Yu. Malkina, A.I. Martynov The principles for the evaluation of pharmacologic products immune safety.....	94
N.P. Neugodova, G.V. Dolgova, A.V. Gavrikov Some problems of toxicity evaluation for the biotechnological products.....	98
S.V. Lutsenko, M.V. Dmitrieva, N.B. Feldman Problems of development and estimation of safety of nanophytopreparations.....	101
L.V. Krepkova Use of the hyperlipidemic and atherosclerosis models of rats in toxicological studies	103
V.V. Bortnikova Experimental study safety of hiporamin – new antiviral fitopreparation.....	106
S.V. Kosin, F.P. Krendal, L.V. Levina, V.N. Chubarev Comparison of general toxic effect of drugs Rhodiola roseae of biotechnology and natural origin	109
R.N. Alyautdin, F.P. Krendal, S.V. Kosin, L.V. Levina, N.G. Preferanskaya, V.N. Chubarev The safety of evaluation of biotechnology ginseng in the experiment	112
R.N. Alyautdin, M.D. Guseynov, I.N. Zilfikarov, B.K. Romanov Stress-protector herbal medicine	115
O.I. Tereshkina Modern criteria of medical products composition safety estimation	119

CLINICAL PHARMACOLOGY

M.G. Danilets, Y.P. Belsky, N.V. Belska, E.S. Trophimova, E.G. Uchasova, A.A. Ligatcheva, A.N. Ivanova, V.V. Kovalev, Y.S. Khotimchenko Influence of calcium alginate on Th1 and Th2 immune responses.....	125
E.A. Volkova, I.E. Shohin, G.V. Ramenskaya, A.U. Savchenko Biorelevant dissolution media – modern tool for modelling of drugs dissolution and absorption	133
L.V. Mokhireva, E.N. Khoseva, O.O. Karkach, A.V. Mokhirev, P.I. Dzhura, T.E. Morozova Pharmakoepidemiology research of the reproduced combined antitubercular preparations and adherence to them of phthisiatricians in wide clinical practice	141



Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации

Д.Б. Чайванов², Н.Н. Каркищенко¹

¹ – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

² – Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: Чайванов Дмитрий Борисович chaivanov@yandex.ru, тел. (499) 196-89-12

В статье приведена разработанная методика расчета электрических токов, втекающих в головной мозг человека при микрополяризации электродами малого, по сравнению с головой, размера. Найден способ расчета потенциалов, возникающих в коре головного мозга в подэлектродном пространстве.

Ключевые слова: транскраниальная микрополяризация, расчет токов при транскраниальной микрополяризации, расчет потенциалов при транскраниальной микрополяризации, математическое моделирование процессов при транскраниальной микрополяризации.

Методика *транскраниальной микрополяризации* (ТКМП) заключается в использовании поверхностных (на поверхность скальпа) электродов малой площади для направленного поляризационного воздействия на мозг. Установлено, что ТКМП вызывает изменения физиологических (электроэнцефалография, вызванный потенциал) и биофизических (плотность синапсов, их локализация) показателей корковых и подкорковых отделов мозга [5-8, 10]. Слабый постоянный ток, в отличие от таких воздействий как ТЭС, наиболее близок по своим характеристикам к физиологическим процессам, обеспечивающим деятельность нервной ткани [4, 5, 9]. Подаваемые на электрод сильные токи приводят к угнетению функций мозговых структур или даже к их разру-

шению, а микротоки (0,01-0,1 мА·см⁻²) способствуют оптимизации функционального состояния нервной ткани [3, 6, 7, 8]. Было показано, что ТКМП оказывает воздействия как на корковые, так и на подкорковые структуры мозга [5-7, 9]. Например, известно, что микрополяризационное воздействие на височные области коры улучшает слуховую память, память на время и память на слова; на префронтальную кору – улучшает двигательную память; на теменно-затылочную кору – приводит к улучшению зрительной памяти [1]. ТКМП применяют для лечения таких заболеваний как шизофрения с синдромом вербального псевдогаллюциноза, депрессия, [5-7, 9] и т.д. Кроме того, известно, что постоянный ток является фактором, стимулирующим рост клеточных структур, особенно это

выражено в случае органических повреждений мозга [5-7, 9]. Направленность влияния микрополяризации достигается за счет использования малых площадей электродов (100-600 мм²), расположенных на соответствующих корковых (фронтальной, моторной, височной и др. областях) проекциях головного мозга [5-7, 9].

Механизм действия слабого постоянного тока на организм человека хорошо изучен [8]. Приложенное к тканям внешнее электрическое поле вызывает в них ток проводимости. Положительно заряженные частицы (катионы) движутся по направлению к отрицательному полюсу (катоде), а отрицательно заряженные (анионы) – к положительно заряженному полюсу (аноду). Подходя к электроду, ионы теряют свой заряд и превращаются в атомы, обладающие высокой химической активностью (электролиз). Взаимодействуя с водой, эти атомы образуют продукты электролиза. Основными ионами-носителями заряда в живых тканях являются Na⁺, K⁺, Cl⁻. Соответственно, под анодом, вследствие реакции атомарного хлора с водой, образуется соляная кислота (HCl). Под катодом, вследствие взаимодействия натрия и калия с водой, – щелочь (KOH, NaOH). Плотность тока проводимости равна произведению напряженности электрического поля и электропроводности тканей. В силу низкой электропроводности кожи, движение заряженных частиц в подлежащие ткани происходит в основном по выводным протокам потовых желез и волосяных фолликулов и – в наименьшей степени – через межклеточные пространства эпидермиса и дермы. В глубже расположенных тканях максимальная плотность тока проводимости наблюдается в жидких средах

организма: крови, лимфе, интерстиции, периневральных пространствах. Напротив, через плазмолемму проходит тысячная доля тока проводимости, а перемещения ионов в клетке ограничены, чаще всего, пространством компартмента. Наименьшей проводимостью обладает кость. Различия в электрофоретической подвижности ионов обуславливают локальные изменения содержания ионов одинакового знака на различных поверхностях клеточных мембран, вследствие чего в компартменте происходит образование промежуточных полюсов и локальное изменение концентрации ионов. Таким образом, возникает скопление ионов противоположного знака по обеим сторонам клеточных мембран, межканевых перегородок и фасций. Такое перераспределение ионов изменяет поляризацию мембран нейронов и их возбудимость. Вместе с тем, следует учитывать, что пороговая чувствительность нервных волокон к постоянному току минимальна, по сравнению с другими видами токов. Под катодом при действии постоянного тока сначала происходит снижение потенциала покоя при неизменном критическом уровне деполяризации (КУД) возбудимых мембран (рис. 1А). Оно обусловлено инактивацией потенциалзависимых калиевых ионных каналов и приводит к частичной деполяризации возбудимых мембран. Вместе с тем, при длительном воздействии тока происходит инактивация и потенциалзависимых натриевых ионных каналов, что приводит к позитивному смещению КУД и уменьшению возбудимости тканей. Под анодом возникает активация потенциалзависимых калиевых ионных каналов. В результате возрастает величина потенциала покоя при неизменном КУД, что приводит к частичной гипер-

поляризации возбудимых мембран (физиологический анэлектротон, рис. 1Б). В последующем, вследствие негативного смещения КУД, связанного с устранением стационарной инактивации некоторого количества натриевых каналов, возбудимость тканей возрастает [5, 9].

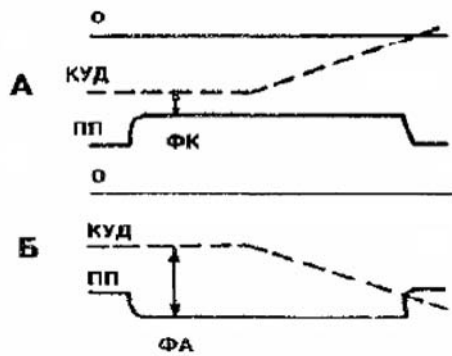


Рис. 1. Динамика потенциала покоя (ПП) и критического уровня деполяризации (КУД) при длительном воздействии постоянного тока. А – под катодом (при подпороговой деполяризации), Б – под анодом (при подпороговой гиперполяризации). ФК – физиологический катэлектротон; ФА – физиологический анэлектротон [8].

Для повышения эффективности и специфичности воздействия, уменьшения побочных эффектов ТКМП необходимо воздействовать постоянными токами малой интенсивности на заданные участки коры. Для этого необходимо использовать электроды малой площади. К сожалению, в силу высокой проводимости скальпа и низкой проводимости черепа, электрический ток с таких электродов преимущественно растекается по скальпу и только частично попадает в головной мозг. Скомпенсировать такое растекание можно увеличением электрических токов, подаваемых на электрод, в случае применения анестезии к коже скальпа. Вследствие этого, использовать слишком малые электроды нельзя. Для выбора оптимальных по размеру электродов и оценки токов,

протекающих по скальпу и через череп, разработана методика, описываемая в данной статье.

Сопrotивление растеканию электрического тока по скальпу от круглого электрода радиуса r_0 до радиуса r_1 можно рассчитать по следующей формуле:

$$R_{\text{скальпа}} = \int_{r_0}^{r_1} \frac{dr}{\lambda_{\text{скальпа}} S_{\text{скальпа}}(r)},$$

где: $\lambda_{\text{скальпа}}$ – проводимость скальпа; $S_{\text{скальпа}}$ – боковая площадь цилиндра скальпа радиуса – r (рис. 2).

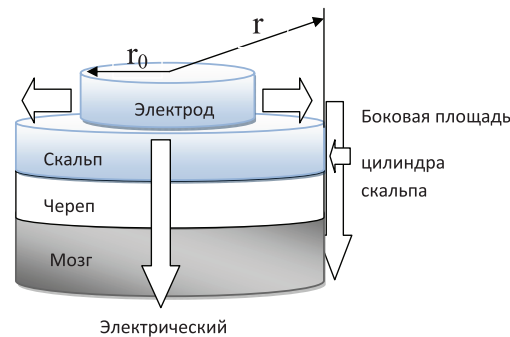


Рис. 2. Модель растекания тока через скальп и череп

После подстановки выражения для боковой площади цилиндра скальпа радиуса- r и интегрирования получим:

$$R_{\text{скальпа}} = \int_{r_0}^{r_1} \frac{dr}{\lambda_{\text{скальпа}} 2\pi \cdot r \cdot x_{\text{скальпа}}} = \frac{1}{\lambda_{\text{скальпа}} 2\pi \cdot x_{\text{скальпа}}}$$

где: $x_{\text{скальпа}}$ – толщина скальпа

Сопrotивление протеканию электрического тока через череп и скальп от круглого электрода радиуса r_0 можно рассчитать по формуле:

$$R_{\text{черепа}} = \frac{1}{\pi \cdot r_0^2} \cdot \left(\frac{x_{\text{черепа}}}{\lambda_{\text{черепа}}} + \frac{x_{\text{скальпа}}}{\lambda_{\text{скальпа}}} \right) \approx$$

$$\approx \frac{1}{\pi \cdot r_0^2} \cdot \left(\frac{x_{\text{черепа}}}{\lambda_{\text{черепа}}} \right),$$

где: $x_{\text{черепа}}$ – толщина черепа; $\lambda_{\text{черепа}}$ – проводимость черепа

Для расчета тока, протекающего по скальпу за пределами стимулирующего электрода, пренебрежем токами, текущими в мозг вблизи электрода (такое предположение правомерно при небольших размерах электрода, как будет показано ниже при радиусе электрода менее 30 мм). Приближенно будем считать равным нулю потенциал скальпа вдали от электрода и потенциал мозга. Это возможно, поскольку при растекании тока по скальпу поверхность черепа под скальпом и площадь бокового цилиндра скальпа становятся большими, а, следовательно, сопротивления маленькими. Протекающий через маленькие сопротивления ток практически не создает разности потенциалов. При таких приближениях для отношения тока, растекающегося по скальпу и втекающего в мозг под электродом, будет верна оценка:

$$K_1 = \frac{I_{\text{мозга}}}{I_{\text{скальпа}}} = \frac{R_{\text{скальпа}}}{R_{\text{черепа}}} = \frac{\lambda_{\text{черепа}} r_0}{2\lambda_{\text{скальпа}} x_{\text{скальпа}} x_{\text{черепа}}} \ln \left(\frac{r_1}{r_0} \right)$$

Примем для проводимости и толщины черепа и скальпа обычно применяемые при решении обратной задачи ЭЭГ значения [2]. Положим r_1 равным 100 мм, т.е. порядка радиуса головы человека. Такой произвольный выбор возможен, поскольку данная величина стоит под знаком логарифма и мало влияет на значение коэффициента K_1 . В таких приближениях вышеприведенное выражение примет вид:

$$K_1 = 1,7 \cdot 10^{-4} r_0^2 \cdot \ln \left(\frac{100}{r_0} \right),$$

где радиус электрода r_0 необходимо брать в миллиметрах.

Для наглядности представим полученные по формуле результаты в виде таблицы (табл.1).

Таблица 1
Коэффициенты затекания для электродов разных размеров

Площадь круглого электрода, мм ²	79	154	254	380	513	700
Радиус электрода, г	5	7	9	11	13	15
Коэффициент затекания K_1	0,013	0,022	0,033	0,045	0,059	0,073

Из таблицы видно, что токи, затекающие в мозг, значительно меньше токов, растекающихся по скальпу. Это подтверждает правильность сделанных выше допущений.

Для отношения тока, втекающего в мозг, и тока, подаваемого на электрод, будет верна оценка:

$$K_2 = \frac{I_{\text{мозга}}}{I_{\text{электрода}}} = \frac{R_{\text{электрода}}}{R_{\text{черепа}}} =$$

$$= \frac{\left(\frac{1}{R_{\text{скальпа}}} + \frac{1}{R_{\text{черепа}}} \right)^{-1}}{R_{\text{черепа}}} = \frac{1}{1 + K_1^{-1}} \approx K_1,$$

где K_1 (при радиусе электрода менее 20 мм) меньше 0,1.

Рассчитаем теперь потенциал мозга в подэлектродном пространстве. Сопrotивление между подэлектродной областью мозга и удаленной от электрода областью мозга может быть оценено по формуле:

$$R_{\text{мозга}} \approx \int_{r_0}^{\infty} \frac{dr}{s(r) \lambda_{\text{мозга}}} = \frac{1}{\pi \cdot r_0 \lambda_{\text{мозга}}} = \frac{1180}{r_0} \text{ Ом}$$

где: $s(r) = 2\pi r^2$ – площадь полусферы радиуса r , $\lambda_{\text{мозга}} = 0,27 \text{ (Ом М)}^{-1}$ – проводимость мозга [2], радиус электрода r_0 необходимо брать в миллиметрах.

Для потенциала, очевидно, можно записать:

$$U = I_{\text{мозга}} R_{\text{мозга}} = K_2 I_{\text{электрода}} R_{\text{мозга}} \approx K_1 I_{\text{электрода}} R_{\text{мозга}} = 0,2 \cdot I_{\text{электрода}} \cdot r_0 \ln \left(\frac{100}{r_0} \right)$$

Для наглядности представим полученные по формуле потенциала результаты в виде таблицы (табл. 2). Здесь мы предполагаем, что максимально допустимая плотность тока на стимулирующих электродах не должна превышать 0,1 мА/см².

Таблица 2

Потенциал мозга в подэлектродном пространстве для электродов разных размеров и максимально допустимых токов

Радиус электрода, мм	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Площадь электрода, мм ²	78,5	113	154	201	254	314	380	452	531	615
Допустимый ток, мА	0,08	0,11	0,15	0,20	0,25	0,31	0,38	0,45	0,53	0,62
Потенциал мозга под электродом, мВ	0,24	0,38	0,57	0,81	1,10	1,45	1,84	2,30	2,81	3,39

Из таблицы 2 видно, что потенциалы в подэлектродном пространстве мозга вполне сопоставимы с естественными медленными потенциалами [4]. Это позволяет сделать вывод о безопасности микрополяризации.

Список литературы

1. *Вартанян Г.А., Гальдинов Г.В., Акимов И.М.* Организация и модуляция процессов памяти. Ленинград, 1981.
2. *Гнездицкий В.В.* Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография. М.: МЕДпресс-информ, 2004.
3. *Гурленя А.М., Багель Г.Е., Смычек В.Б.* Физиотерапия в неврологии. М.: 2008.
4. *Илюхина В.А.* Психофизиология функциональных состояний и познавательной деятельности здорового и больного человека. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010.
5. *Пинчук Д.Ю.* Транскраниальные микрополяризации головного мозга. СПб: Человек, 2007.

6. *Пономаренко Г.Н.* Физические методы лечения. СПб: СЛН, 2002.

7. *Раева С.Н.* Микроэлектродные исследования активности головного мозга человека. М., 1977.

8. Физиотерапия и медицинские новости. Электронный ресурс www.physis.ru.

9. *Шелякин А.М., Пономаренко Г.Н.* Микрополяризация мозга. СПб: ИИЦ Балтика, 2006.

10. *Kadosh R.C., Soskic S., Iuculano T., Kanai R., Walsh V.* Modulating neuronal activity produces specific and long-lasting changes in numerical competence//Current Biology, V.20, I.22, 2016-2020, 04 Nov 2010.

Mathematical model of biophysical processes at transcranial micropolarization

D.B.Chaivanov, N.N.Karkischenko

The article covers the design procedure of electric currents flowing into a brain of the person is developed at micropolarization by electrodes small, in comparison with a head, size. The way of calculation of potentials arising in a cerebral cortex in under-electrode space is found.

Key words: transcranial micropolarization, calculation of currents at transcranial micropolarization, calculation of potentials at transcranial micropolarization, mathematical modeling of processes at transcranial micropolarization.



Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2

А.А. Спасов, М. П. Воронкова, Г. Л. Снигур, Н. И. Чепляева,
М. В. Чепурнова

Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград

Контактная информация: Чепурнова Мария marishka8417@mail.ru

Из-за высокой распространенности диабета в мире продолжают поиски и изучение новых мишеней действия антидиабетических средств, изучаются их механизмы действия. Достаточно большое количество общепринятых экспериментальных моделей СД модифицированы и полностью описаны. Эти модели могут быть классифицированы по двум широким категориям: 1) генетические; 2) негенетические экспериментальные модели СД. Популярность использования последних по сравнению с генетическими обусловлена простым воспроизведением, относительно низкой стоимостью и достоверностью получаемых результатов. Экспериментальный СД такого типа используется для фармакологического скрининга, изучения механизма действия антидиабетических средств и, как правило, представлен стрептозотоцин/аллоксан – индуцированным СД на крысах или мышах. При использовании этих моделей, как правило, формируется СД смешанного типа, что не всегда позволяет четко идентифицировать механизм действия антидиабетических веществ для лечения инсулиннезависимого типа СД, что обуславливает воспроизведение экспериментальной модели СД типа 2, которая должна максимально соответствовать биохимическим изменениям в плазме крови и патогенезу СД типа 2 у человека. Следовательно, целью данной статьи является воспроизведение и сравнительная оценка экспериментальной модели СД типа 2 с СД смешанного типа.

Ключевые слова: сахарный диабет типа 2, стрептозотоцин, никотинамид.

Для скрининга и детального изучения антидиабетических препаратов используют различные генетические и негенетические экспериментальные модели сахарного диабета (СД) [7]. И хотя они не совсем эквивалентны по этиопатогенетическим механизмам данной патологии человека, каждая из них выступает в качестве неотъемлемого инструмента для исследования генетических, эндокринных, метаболических, морфологических изменений, лежащих в основе данного заболевания. Так, СД – генетические дефекты в инсулинпродуцирующих клетках, в структурах, обуславливающих

трансдукцию инсулинового сигнала или секреторную функцию эндокриноцитов, могут быть детально исследованы с использованием специализированных линий животных со спонтанно полученными мутациями или направленным нокаутом генов [9]. Тем не менее, наиболее простыми в воспроизведении являются негенетические модели, в которых используются гидрофильные β -клеточные глюкозные аналоги, такие как аллоксан, стрептозотоцин, хлорозотоцин, ципрогептадин и др. Механизм действия этих веществ заключается, прежде всего, в деструкции β -клеток панкреатического

островка путем: 1) генерации свободных радикалов кислорода, нарушающих целостность клетки; 2) алкилирования ДНК и последующей активизации полиАДФ-рибозо-синтетазы – снижение содержания NAD в β -клетке; 3) угнетения активного транспорта кальция и кальмодулин-активированной протеинкиназы (D.A. Rees, J.C. Alcolado, 2005). В данной категории экспериментальных моделей СД использование стрептозотоцина (N-нитрозопроизводного глюкозамина) является наиболее распространенным (R.M. Cowett, 1994). В зависимости от применяемой в эксперименте дозы цитотоксина (45-70 мг/кг) и пути введения (в/бр, в/в), возможно моделирование различных состояний углеводного обмена, соответствующих определенным клиническим типам диабета (смешанный СД (тип 1-2) или нарушенная толерантность к углеводам, приравниваемая к латентному или скрытому диабету) (K. Srinivasan et al., 2007). При явном СД, характеризующемся появлением клинических признаков (гипергликемия, наличие глюкозы в моче, полиурия, полидипсия, резкая потеря в весе), достаточно трудно решить вопрос о вкладе каждого из звеньев в патогенетическую цепь его развития и количественно определить степень повреждения β -эндокриноцитов. Есть данные (S.H. Bae, 2003), что при увеличении дозы стрептозотоцина уменьшается влияние инсулина на утилизацию глюкозы и на синтез гликогена в диафрагме, а тканевая чувствительность к инсулину прогрессивно снижается с увеличением длительности течения экспериментального диабета (до 60 дней), и в конечном счете приводит к развитию неконтролируемой декомпенсации, поздних осложнений и, как следствие, в 30-50% случаев – к гибели животных. Очевидно, что в эксперименте четко раз-

граничить тип полученного СД в таких условиях не представляется возможным, что, соответственно, затрудняет объективную оценку фармакологического действия исследуемых антидиабетических препаратов. Все это обуславливает проведение поиска новых экспериментальных моделей СД типа 2. Одной из таких возможностей, по литературным данным [6], является превентивное введение никотинамида непосредственно перед интоксикацией стрептозотоцином, которое минимизирует повреждающее действие цитотоксина, и, вероятно, оказывает цитопротективное действие на островки Лангерганса поджелудочной железы. Так как объективно фиксируется развитие умеренной гипергликемии и происходит сокращение количества инсулина на 40%, а также стабилизация других клинических проявлений СД [1].

Целью данной работы явилось воспроизведение экспериментальной модели СД типа 2 с помощью стрептозотоцина и никотинамида, и проведение сравнительной оценки данной экспериментальной модели СД типа 2 с классической моделью стрептозотоцин-индуцированного СД смешанного типа, исходя из показателей уровня глюкозы в крови натощак и при проведении глюкозотолерантных тестов, уровня С-пептида в плазме крови, морфологических изменений и количественной оценки инсулинпродуцирующих клеток в островках Лангерганса поджелудочной железы крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 70-ти половозрелых белых крысах-самцах линии *Wistar*, массой 200-250 г., которые содержались в условиях вива-

рия ВолГМУ с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных, согласно ГОСТ Р50258⁰⁰92. Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96).

Уровень глюкозы в крови и моче определяли глюкозооксидазным методом («Глюкоза ФКД», Россия); уровень кетонных тел в моче определяли с использованием диагностических тест-полосок ФАН (Чехия); концентрацию С-пептида в плазме крови – иммуноферментативным способом (DRG, Австрия); исследование на толерантность к сахарной нагрузке проводили с использованием ПГТТ по Т.П. Бондарь, Г.И. Козинец (2003) с оценкой результатов по А.В. Древаль (2005).

Негенетическую форму экспериментального сахарного диабета типа 2 воспроизводили по Islam S., Choi H. (2007) и моделировали стрептозотоцином («Sigma», США) (внутрибрюшинно – 65 мг/кг) с предварительным (за 15 мин.) введением никотинамида (интраперитонеально – 230 мг/кг). Количество глюкозы в крови проводили на 3, 7, 21, 28 сутки после введения цитотоксина. На 14 сутки эксперимента производили тест пероральной сахарной нагрузки (3 г/кг, интрагастрально) с забором образцов крови через каждые 30 мин. в течение 2 ч. Наличие глюкозы и кетонных тел в моче крыс всех экспериментальных групп оценивали на 7, 14, 21, 28 сутки после введения стрептозотоцина. Определение массы тела и количества потребляемой пищи и воды производили исходно (за 7 дней до введения цитотоксина), а

также на 7, 14, 28 сутки после введения стрептозотоцина.

Фиксацию ткани поджелудочной железы, почек и печени осуществляли в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч. По общепринятым гистологическим методикам изготавливали парафиновые срезы с последующей окраской гематоксилином и эозином, ШИК(PAS)-реакцией, трихром по Массону. Иммунофлюоресцентная микроскопия выполнялась на парафиновых срезах ткани почек с использованием антител к IgG, IgM и фибриногену (DakoCytomation, Дания). Для выявления липидов на замораживающем микротоме изготавливали срезы печени и окрашивали их суданом III. Визуализацию в-эндокриноцитов островков Лангерганса проводили при иммуногистохимической реакции с поликлональными антителами к инсулину (DakoCytomation, Дания) с помощью непрямого иммунопероксидазного метода, используя протокол высокотемпературной демаскировки антигенов в миниавтоклаве. Достоверность полученных результатов контролировали с помощью позитивных и негативных контролей антигенов, а также негативных контролей антител.

Морфометрический анализ проводили на базе компьютерной программы «ВидеоТестМорфо-4» (Россия). Определяли процентное соотношение площади, занимаемой в-инсулоцитами, к общей площади островка, которая составляла 100%, объемную долю (ОД, %) островков по отношению к экзокринной части железы, площадь островков (мкм²), а также размеры ядер инсулоцитов (мкм²) и их количество (% от общего количества клеток панкреатических островков).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «ВидеоТестМорфо-4». Проводился расчет

базовых статистических показателей (M, m), с использованием парного t-критерия Стьюдента при достоверности $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Уровень глюкозы в крови у крыс с СД смешанного типа на 3 день после введения стрептозотоцина достоверно превосходил в 3,2 раза, а в моче – в 5,7 раз, таковой у интактных животных. В течение последующих дней наблюдений количество сахара в крови крыс этой группы животных также оставалось стабильно высоким – 15,9 ммоль/л, практически не изменяясь ($\pm 0,38$ ммоль/л) по сравнению с 7-м днем исследования. При этом максимального значения уровень гликемии натошак достиг к 28-му дню исследования (16,5 ммоль/л). При проведении перорального теста толерантности к глюкозе площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» увеличивалась в 3,4 раза по сравнению с контрольными значениями интактной группы животных. Декомпенсация у таких крыс подтверждалась снижением содержания С-пептида в плазме крови, через 3 недели эксперимента его количество достоверно уменьшилось в группе крыс с диабетом на 42,2% ($p \leq 0,05$); наличием кетонных тел в моче; регистрацией полидипсии (потребление воды увеличивалось в среднем в 2,5 раза) и полиурии; отмечалось снижение количества потребляемой пищи (на 15,81% $p \leq 0,05$) и резкая потеря массы тела (на 7-ой день – 22%, к 14-му дню – 25%, а к 21-му дню – 34%). Животные были вялы и апатичны, шерсть животных была серой и тусклой, наблюдались гнойно-эрозивные повреждения тканей хвоста и конечностей, помутнение зрачка и склеры, с большим количеством различной величины кровоизлияний.

При моделировании СД типа 2 также было зарегистрировано повышение уровня глюкозы в крови животных. Так, на 3-и сутки после интоксикации этот показатель составил $14,92 \pm 1,23$ ммоль/л, но к 7-му дню понизился, составив $10,4 \pm 0,13$ ммоль/л, а к 14-му дню – $8,75 \pm 0,22$ ммоль/л ($p \leq 0,05$) и далее практически не менялся вплоть до 4-й недели исследования. Тем не менее, о наличии дисбаланса в углеводном обмене данной группы крыс свидетельствует присутствие глюкозы в моче, количество которой было не стабильно и варьировало в пределах от 3,8 до 1,9 ммоль/л, при этом кетонных тел обнаружено не было. Полученные результаты подтверждались достоверным увеличением площади под кривой «концентрация глюкоза-время» у экспериментальной группы крыс в 1,8 раза по сравнению с интактными животными при проведении глюкозотолерантного перорального теста на 14-й день исследования. Однако стоит отметить, что при этом скорость элиминации глюкозы из периферического кровотока этой группы животных была существенно выше, чем значения, полученные для группы с СД смешанного типа, что, по-видимому, может свидетельствовать о менее выраженном дисбалансе классической триады показателей этого теста: скорости всасывания глюкозы в кишечнике, скорости утилизации глюкозы периферическими тканями и количества секретируемого инсулина. Последнее подтверждается тем, что количество С-пептида в плазме животных с СД типа 2 уменьшалось к 28-му дню исследования на 33,5% ($p \leq 0,05$) по отношению к значению этого показателя у интактных крыс, что соответствует литературным данным, и выше данного показателя, полученного у крыс с СД смешанного типа.

Кроме того, следует отметить, что в этой группе крыс масса тела либо не изменялась, либо снижалась незначительно, а колебания в количестве потребляемой пищи и воды на всем протяжении исследования не отличались от физиологической нормы.

При стрептозототин-индуцированном СД в поджелудочной железе от-

мечаются выраженные деструктивные и воспалительные изменения островков Лангерганса, что сопровождается статистически достоверным уменьшением их размера, объемной доли, а также количества и площади инсулин-позитивных клеток. У неповрежденных в-эндокриноцитов определяется выраженная гипертрофия ядер.

Таблица 1

Данные морфометрического исследования поджелудочной железы

	Интактный контроль	Стрептозототин-индуцированный сахарный диабет	Сахарный диабет 2 типа
Площадь островков, мкм ²	12452,8±1230	1146,4±190,5*	13467,8±1495 [^]
ОД островков, %	23,8±1,3	11,8±1,5*	18,7±0,8* [^]
Количество в-клеток, %	83,2±5,1	7,1±1,0*	20,9±6,8* [^]
Площадь в-клеток, %	72,1±9,4	37,7±8,2*	57,7±8,3* [^]
Размер ядер в-клеток, мкм ²	23,4±0,4	29,5±2,2*	30,1±0,6*

* – достоверно по сравнению с группой интактного контроля.

[^] – достоверно по сравнению с группой стрептозототин-индуцированного диабета.

При моделировании СД типа 2 в поджелудочной железе признаков воспалительной инфильтрации не определялось. По сравнению с контрольной группой происходило статистически достоверное уменьшение объёмной доли островков с формированием очагового интралобулярного и перидуктального склероза. Панкреатические островки хорошо визуализировались и имели средний и крупный размеры. Площадь панкреатических островков была сопоставима с площадью островков у животных контрольной интактной группы. Количество и площадь инсулин-позитивных клеток достоверно уменьшались по сравнению с контрольной группой. Отмечалась гипертрофия

ядер в-эндокриноцитов. Изменения размера, объемной доли панкреатических островков, а также количества и площади инсулин-позитивных клеток по сравнению с моделью стрептозототин-индуцированного диабета носили менее выраженный характер (табл. 1, рис. 1, 2).

В печени животных – как с моделью стрептозототин индуцированного диабета, так и СД 2 типа – определялись явления умеренно выраженной мелкокапельной жировой дистрофии, преимущественно центрлобулярных гепатоцитов. В интактной группе жировая дистрофия гепатоцитов отсутствовала.

У животных с моделью стрептозототин-индуцированного диабета струк-

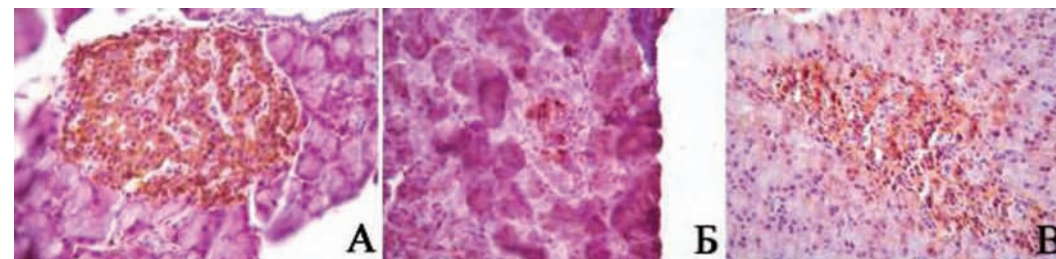


Рис. 1. А. Интактный контроль. Б. Стрептозототин-индуцированный диабет, единичные инсулин-позитивные клетки. В. Модель сахарного диабета 2 типа, уменьшение количества инсулин-позитивных клеток, визуализация диаминобензидином. Ув. х400.

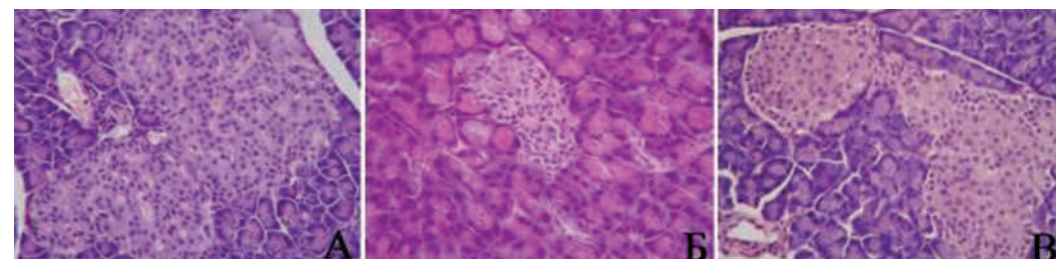


Рис. 2. А. Интактный контроль. Б. Стрептозототин-индуцированный диабет, уменьшение размеров панкреатических островков. В. Модель сахарного диабета 2 типа, гипертрофия ядер в-эндокриноцитов островков. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х400.

турных изменений, характерных для диабетической нефропатии, не определялось. Капиллярные петли клубочков были полнокровны, в эпителии проксимальных и дистальных извитых канальцев определялись дистрофические изменения. В почках животных с моделью СД 2 типа определялась очаговая линейная умеренная флуоресценция IgG вдоль гломерулярной базальной мембраны большинства клубочков (рис. 3). В

эпителии дистальных и проксимальных извитых канальцев отмечались умеренные дистрофические изменения. В просветах канальцев отмечались гомогенные эозинофильные, PAS-позитивные массы. Признаков расширения мезангиального матрикса, утолщения гломерулярной базальной мембраны, «капсульных капель», «фибриноидных шапочек» или узлового гломерулосклероза не определялось.

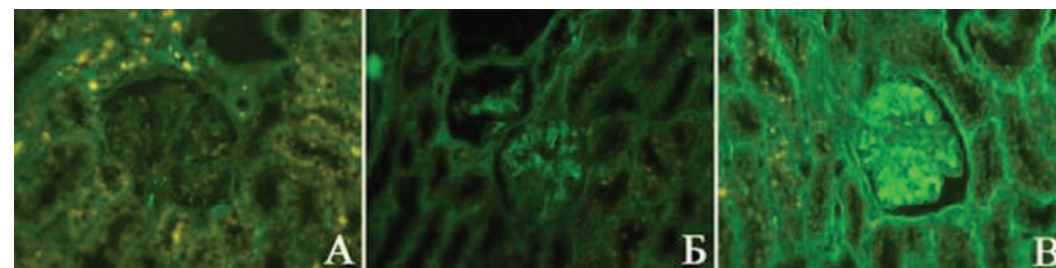


Рис. 3. А. Интактный контроль. Б. Стрептозототин-индуцированный диабет. В. Модель сахарного диабета 2 типа, линейные отложения IgG вдоль гломерулярной базальной мембраны. Иммунофлуоресценция с антителами к IgG. Ув. х400.

Выводы

По полученным результатам можно заключить, что при экспериментальной модели стрептозотоцин-индуцированного СД с предварительным введением никотинамида повышается устойчивость β -клеток островков Лангерганса к повреждающему действию стрептозотцина, что позволяет воспроизводить состояние в значительной степени близкое диабету типа 2, проявляющемуся в умеренной и стабильной гипергликемии, присутствии глюкозы в моче, без явлений ацидоза. Анализ патогистологических изменений островкового аппарата поджелудочной железы и печени также свидетельствует о развитии структурных изменений, характерных для сахарного диабета 2 типа. Изменения в почках не сопровождаются развитием патогномоничных признаков сахарного диабета, однако линейные отложения IgG вдоль гломерулярной базальной мембраны могут расцениваться как ранние проявления диабетической нефропатии. Исследуемая экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 может быть использована при поиске и экспериментальном тестировании новых пероральных антидиабетических средств для лечения инсулинорезистентности, метаболического синдрома и сахарного диабета типа 2.

Список литературы

1. **Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А.** Модификация метода определения перекисей липидов в тесте

с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. 1988. № 11. С. 41-43.

2. **Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г.** Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. №1. С. 16-19.

3. **Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В.** Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. 1990. Т.36. №2. С. 88-91.

4. **Моин В. М.** Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. 1986. №12. С. 724-727.

5. **Чистяков Д. А., Савостьянов К. В., Туракулов Р. И.** Гены антиоксидантной защиты и предрасположенность к сахарному диабету // Сахарный диабет. 2000. № 3. С. 15-17.

6. **Islam S., Choi H.** Nongenetic Model of Type 2 Diabetes: A Comparative Study // Pharmacology. 2007. № 79. P. 243-249.

7. **Islam S., Loots D.T.** Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review // Methods Find Exp Clin Pharmacol 2009. 31(4): P. 249-261.

8. **Древаль А.В.** Оценка внутривенного теста толерантности к глюкозе с помощью простой математической модели // Лабораторное дело. 1985. № 5. С. 276-280.

9. **Сарвилина И.В., Макляков Ю.С., Криштопа А.В., Каркищенко В.Н.** Поиск новых мишеней для разработки сахароснижающих лекарственных средств на основе биомоделирования сахарного диабета второго типа и протеомных технологий // Биомедицина. 2008. № 1. С. 5-13.

Experimental model of a type 2 diabetes

A.A. Spasov, M.P. Vorohkova, G.L. Snegur, N.I. Cheplyaeva, M.V. Chepurnova

Due to the high prevalence of diabetes worldwide, extensive research is still being performed to develop new antidiabetic agents and determine their mechanisms of action. A number of diabetic animal models have been developed and improved over the years, of which rodent models are the most thoroughly described. These rodent models can be classified into two broad categories: 1) genetically induced spontaneous diabetes models; and 2) experimentally induced nonspontaneous diabetes models. The popularity of using experimentally induced nonspontaneous models for diabetes research over that of the genetically induced spontaneous models is due to their comparatively lower cost, ease of diabetes induction, ease of maintenance and wider availability. The various experimentally induced type 2 diabetes (T2D) rodent models developed for both routine pharmacological screening and mechanistic diabetes-linked research trials include: streptozotocin (STZ)/alloxan rat models. The use of these models, however, is not without limitations. A T2D model should ideally portray an identical biochemical blood profile and pathogenesis to T2D in humans. Hence, this article will comparatively evaluate experimentally induced rodent T2D models considering the above-mentioned criteria, in order to guide diabetes research groups to more accurately select the most appropriate models given their specific research requirements.

Key words: type 2 diabetes, streptozotocin, nicotinamide.

Экспериментальное биомоделирование для оценки возможности изменения морфотипа слизистой оболочки полости рта

Б.С. Сибатян¹, Г.Д. Капанадзе², М.В. Ломакин¹, А.С. Алейников¹, Г.М. Ожаровская¹, Н.А. Полевова¹, Л.Т. Хуцишвили¹

¹ – Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Гия Джемалиевич Капанадзе giyak@yandex.ru

В эксперименте на мини-свиньях разными методами проведена пластика альвеолярной слизистой для формирования кератинизированной и прикрепленной слизистой оболочки, чтобы выяснить, какие методы наиболее показаны в различных клинических ситуациях.

Ключевые слова: эксперимент, мини-свиньи, моделирование, слизистая оболочка.

Для высокоэстетичного результата лечения в современной стоматологии недостаточно воссоздать коронковые части зубов, полностью соответствующие анатомическим и физиологическим параметрам, необходимо также иметь естественный контур мягких тканей, ко-

торые в пришеечных областях зубов состоят из кератинизированной слизистой оболочки. В полости рта, помимо пришеечных областей зубов, кератинизированная слизистая имеется на твердом небе. Свободные небные трансплантаты являются основным средством пласти-

ки мягких тканей в полости рта после утраты их естественной анатомической структуры в результате длительной атрофии десны, воспаления или проведенных хирургических вмешательств. Помимо кератинизированной, есть еще один вид слизистой оболочки, создающей стабильный придесневой контур, — это прикрепленная слизистая. Гистологически она похожа на мобильную слизистую губ и щёк, но отличием её является отсутствие мышечного слоя между эпителием и периостом, что и обуславливает отсутствие её мобильности. Именно за счёт этого исключены её движения при активности жевательной и мимической мускулатуры.

Имеется три вида используемых свободных небных трансплантатов: эпителиальный, полнослойный (комбинированный) и соединительнотканый. Свободный эпителиальный трансплантат из-за своей малой толщины (менее 1,5 мм) подвержен некрозу и поэтому не нашёл широкого применения. При пересадке полнослойного трансплантата происходит пересадка соединительнотканного и эпителиального слоёв, следовательно, мы пересаживаем кератинизированную слизистую оболочку с прослойкой подлежащей соединительной ткани. При пересадке соединительнотканного трансплантата используем фрагмент соединительной ткани неба толщиной приблизительно 2 мм. При пересадке полнослойного трансплантата можем получить кератинизированную слизистую, как результат его выживания. При использовании соединительнотканного трансплантата должны получить слой соединительной ткани с ее дальнейшим опосредованным влиянием на регенерацию покровного эпителия, гистологически схожего с эпителием соседних участков. Одна-

ко во многих литературных источниках — как современных, так и второй половины 20-го века — утверждается, что пересадка соединительнотканного трансплантата может привести к формированию кератинизированной слизистой оболочки за счет «возможности соединительнотканного трансплантата менять морфотип эпителиальной ткани». Основу данной теории составляют два положения:

1. **Эпителиальная ткань не имеет собственной генетически заданной дифференцировки, так как она задается подлежащей соединительной тканью.** Cairns в 1954 г. опубликовал работу, где описал революционный по тому времени эксперимент, проведенный на куриных эмбрионах, у которых очищенный фрагмент мезодермы из-под эктодермы бедра был помещён в подготовленное ложе в мезодерме крыла с покрывающей эктодермой [4]. Эксперимент был проведен на эмбриональной стадии развития от 3,5 до 4-х дней, так как именно в этот период формируется эктодерма крыла у эмбриона. В результате было доказано, что мезодерма из бедренного региона после трансплантации вызывает формирование типичных бедренных перьев в эктодерме крыла. Была проведена пересадка мезодермы из апикальной части зачатка ноги под эктодерму крыла с последующим наблюдением формирования эктодермы с чешуйчатым строением, свойственным для ноги эмбриона. Исходя из этих результатов, было сделано заключение о том, что мезодерма выполняет первичную дифференцирующую роль при формировании покровной эктодермы.

2. **Пересаженные свободные мягкотканые трансплантаты даже по истечении длительного периода времени не меняют своего клеточного состава.**

Karring et al. в 1971 г. провели эксперимент на 8-ми обезьянах, у которых была проведена двусторонняя пересадка свободных мягкотканых трансплантатов с неба на нижнюю и верхнюю челюсти. После периода наблюдения (6 мес.) исследователи подтвердили сохранение структуры трансплантата, несмотря на наличие другого гистологического окружения [5].

Эти два исследования являются, безусловно, актуальными и достаточно прогрессивными для своего времени, однако в дальнейшем они были интерпретированы и взяты в основу гипотезы, согласно которой утверждалось, что эпителий взрослого человека не имеет собственной генетической дифференцировки и может меняться под воздействием соединительной ткани, пересаженной из другой области, с другим гистологическим строением эпителиальных покровов, так как соединительная ткань не теряет своей дифференцировки. Alan Edel в 1974 г. провел эксперимент на 8-ми пациентах, у которых было 14 участков пересадки свободного соединительнотканного трансплантата, с последующим гистологическим доказательством формирования кератинизированной слизистой оболочки [3]. Однако, очевидным недостатком данного исследования является то, что во всех донорских участках изначально присутствовала кератинизированная слизистая толщиной в среднем 2 мм, а в описании эксперимента не указывается, каким образом проводился забор материала для гистологического анализа, и поэтому нельзя исключить вероятность попадания изначальной прослойки кератинизированной слизистой оболочки в конечный материал для анализа. Несмотря на указанные условности, это исследование является на сегодняшний день базовым, при

утверждении, что пересадка свободного соединительнотканного трансплантата способна изменить дифференцировку эпителия и создать кератинизированную слизистую оболочку.

Таким образом, на сегодняшний день остается открытым вопрос для научных дискуссий, какими методами пластики альвеолярной слизистой можно сформировать кератинизированную слизистую оболочку, а какими прикрепленную, и какие методы наиболее показаны в различных клинических ситуациях.

Материалы и методы

Кафедрой реконструктивной хирургической стоматологии и имплантологии ФПДО МГМСУ и Научным центром биомедицинских технологий РАМН запланировано и совместно проводится экспериментальное исследование по определению возможности изменения морфотипа слизистой оболочки полости рта после пересадки соединительнотканного трансплантата. Эксперимент проводится на мини-свиньях светлогорской породы, участвуют в опыте 12 животных в возрасте от 1,5 до 2-х лет, живой массой 24-29 кг. В пасти каждого животного созданы два операционных участка, с двух сторон на нижней челюсти. Верхняя челюсть не включена в исследование в связи с ее топографическими особенностями у мини-свиней. Суммарно проведена пластика свободным соединительнотканым трансплантатом в 24 участках. Протокол эксперимента был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией НЦБМТ РАМН.

Получение трансплантата проводилось по методу Bosco A.F., предложенному в 2007 г. [2]. Согласно данной технике, на донорском участке неба производился забор полнослойного транс-

плантата, затем на стерильной салфетке, смоченной физ. раствором, проводилась его дезэпителизация, после чего соединительнотканый трансплантат был готов к использованию (рис.1-3).



Рис.1. Участок забора полнослойного трансплантата



Рис.2. Проводится дезэпителизация трансплантата

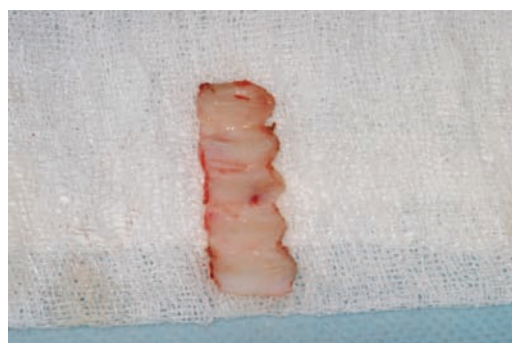


Рис.3. Трансплантат подготовлен к фиксации в реципиентном ложе

Фиксация трансплантата в реципиентном участке проводилась тремя различными методами. Суммарно в эксперименте каждой техникой было прооперировано по 8 участков.

Использовались следующие хирургические методы:

Метод свободной фиксации трансплантата — заключался в подготовке воспринимающего ложа на периосте путем отслаивания слизисто-мышечного прикрепления, занижения его уровня фиксации, тем самым создания открытой периостальной поверхности, на которую фиксировался соединительнотканый трансплантат погружными швами (рис. 4-5).

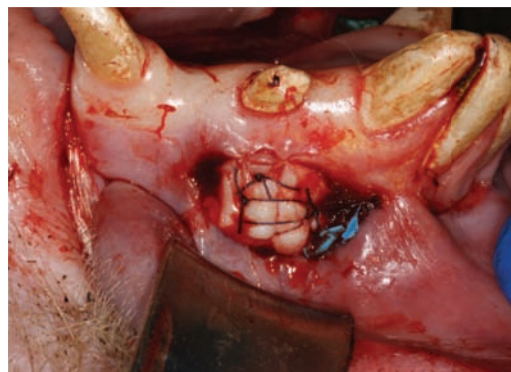


Рис.4. Внешний вид после открытой фиксации соединительнотканного трансплантата



Рис.5. Состояние через 1 месяц после фиксации соединительнотканного трансплантата

Метод туннельной вестибулопластики с фиксацией соединительнотканного трансплантата заключался в создании подслизистого туннеля по типу модифицированной вестибулопластики [1]. После чего соединительнотканый трансплантат вводился в подслизистый туннель и фиксировался погружными швами (рис.6-10).

Метод вестибулопластики по Эдлан-Мейхеру [1] с фиксацией соединительнотканного трансплантата подслизистый лоскут заключался в проведении вышеупомянутой операции, только перед фиксацией вестибулярного щечного лоскута на периосте в промежутке между лоскутом и периостом вводился соединительнотканый трансплантат (рис.6-10).



Рис.6. С левой стороны подготовлено воспринимающее ложе по типу вестибулопластики Эдлан-Мейхер, с правой – туннельным методом



Рис.7. С левой стороны произведена фиксация соединительнотканного трансплантата

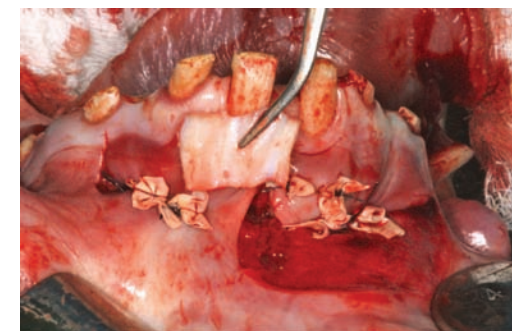


Рис.8. Проводится введение соединительнотканного трансплантата в подслизистый туннель



Рис.9. Завершена фиксация трансплантатов



Рис.10. Внешний вид через 1 месяц после проведенной операции

Все операционные и смотровые этапы проводились под внутримышечной седацией препаратом Золетил. После проведенной операции в течение трех дней животным проводились разовые внутримышечные инъекции Ампицилина 1 гр. Швы снимались через 2 недели, через 1 мес. после операции прово-

дился повторный визуальный контроль. Выведение животных из эксперимента запланировано через 6 мес. после проведенного хирургического этапа. Полученные результаты данного экспериментального исследования позволят нам найти ответы на следующие вопросы:

1. Способны ли эпителиальные ткани у взрослых особей менять свой морфотип после пересадки соединительнотканного трансплантата из области с другим строением вышележащего эпителия.

2. Возможна ли перестройка соединительнотканного трансплантата, фиксированного на открытую периостальную поверхность с последующим формированием слизистой оболочки, сходной по строению с таковой в донорском участке на небе, или же трансплантат замещается рубцовыми тканями, которые из-за своей плотности создают обманчивое визуальное впечатление кератинизированной слизистой.

3. Возможно ли сохранение соединительнотканного трансплантата своего строения через 6 мес. после трансплантации.

Список литературы

1. *Грудянов А.И., Ерохин А.И.* Хирургические методы лечения заболеваний пародонта // Изд. Медицинское информационное агенство. 2006. С. 82-90.

2. *Лапина С.Л.* Контурная пластика альвеолярного отростка соединительнотканым трансплантатом // Канд. диссер. 2009. С. 20-21.

3. *Edel A.* Clinical evaluation of free connective tissue grafts used to increase the width of keratinised gingiva// Journal of Clinical Periodontology. 1974. 1. P. 185-196.

4. *Cairns J.M., Saunders J.W.* The influence of embryonic mesoderm on the regional specification of epidermal derivatives in the chick // Journal of Experimental Zoology. 1954. Vol. 127. P. 221-248.

5. *Karring T., Osteogaard E., Loe H.* Conservation of tissue specificity after heterotopic transplantation of gingiva and alveolar mucosa// Journal of periodontic restorations. 1971. 6. P. 282-293.

Experimental modeling to assess the possibility of changing the morphological type of the oral mucosa

B.S. Sambatyan, G.D. Kapanadze, M.V. Lomakin, A.S. Aleinikov,
G.M. Ozharovsky, N.A. Polevova, L.T. Khutsishvili

In the experiment, the mini-pigs using different methods carried plastic alveolar mucosa to form a keratinized attached mucosa and to determine what methods are shown in various clinical situations.

Key words: experiment, mini-pigs, modeling, mucosa.

Модификация токсического действия циклофосфана ацетатом аммония на крыс

Т. В. Шефер

НИИЦ (МБЗ) ФГУ «ГосНИИИ ВМ Минобороны России», Санкт-Петербург

Контактная информация: Шефер Тимур Васильевич schafer@yandex.ru

Определены динамика содержания аммиака, глутамина и мочевины в крови крыс после внутрибрюшинного введения циклофосфана (600 мг/кг) на фоне внутрижелудочного введения ацетата аммония в нелетальной дозе 12 ммоль/кг (0,4 ЛД₅₀), клинические проявления интоксикации и продолжительность жизни крыс после введения циклофосфана в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг per se, либо в сочетании с ацетатом аммония. Введение ацетата аммония усиливало азотемический эффект циклофосфана. Сочетанное действие токсикантов сопровождалось симптомами, характерными для острого отравления солями аммония; при изолированном действии ацетата аммония эти симптомы не наблюдались. Ацетатом аммония усиливался летальный эффект циклофосфана, вводившегося в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг: средняя продолжительность жизни крыс снижалась в 1,5; 2,1; 2,8 или 6,1 раз соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что перераспределение аммиака из пищеварительного тракта в общий кровоток является одним из механизмов танатогенеза при острой интоксикации циклофосфаном.

Ключевые слова: крысы, циклофосфан, ацетат аммония, аммиак крови, средняя продолжительность жизни.

Высокодозовая цитостатическая терапия β-галогенированными алкиламидами сопровождается нейротоксическими эффектами [5]; другими побочными эффектами являются гепатотоксичность [3] и энтеротоксичность [2]. Нарушение барьерной функции печени и кишечного эпителия может вести к увеличению потока аммиака из просвета желудочно-кишечного тракта в кровь и формированию гипераммониемии, а нейротоксическое действие аммиака способно усугубить побочные эффекты цитостатиков и снизить порог их непереносимости.

Целью исследования явилась оценка роли люминального пула аммиака желудочно-кишечного тракта в реализации токсического действия циклофосфана на крыс.

Материалы и методы

Исследования проводили на самцах беспородных крыс-альбиносов массой 200–240 г, приобретённых в питомнике Рапполово АМН РФ. В течение суток перед использованием в эксперименте животных не кормили при неограниченном доступе к воде. Число животных в каждой из экспериментальных групп составляло шесть, исключая определение средней продолжительности жизни (СПЖ), где число крыс составляло 11 на каждую дозу циклофосфана.

Ацетат аммония (АА) вводили однократно в/ж в виде водного раствора в дозе 12 ммоль/кг (0,35 ЛД₅₀). Циклофосфан растворяли в дистиллированной воде ex tempore и вводили однократно тотчас после АА в/б в дозах 200, 600,

1000 или 1400 мг/кг, соответствовавших величинам СПЖ, предварительно установленным для крыс этой же серии, 240, 51, 13 и 2 ч. Каждый токсикант вводили в объеме 10 мл/кг. Контрольные животные вместо циклофосфана получали воду, а вместо АА – эквивалентное количество ацетата натрия (АН).

Для определения азотистых метаболитов кровь немедленно депротеинировали 10%-ной трихлоруксусной кислотой. Аммиак определяли с реактивом Несслера [1]. Содержание глутамин рассчитывали по возрастанию концентрации аммиака в пробах после 10-минутного гидролиза при 100°C в присутствии 0,3 М H₂SO₄ [4]. Мочевину определяли с диацетилмонооксимом, используя наборы реактивов ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия).

В 1-й серии экспериментов оценивали влияние циклофосфана на обмен аммиака на фоне увеличенного пула аммиака в просвете желудочно-кишечного тракта. Аммиак, глутамин и мочевину определяли в крови, полученной из туловища крыс через 0,5; 1,5 или 3 ч после введения АА и (или) циклофосфана (600 мг/кг). Рассчитывали уровень азотемии (сумма концентраций аммиака, амидного азота глутамин и азота мочевины).

Во 2-й серии экспериментов выявляли клиническое значение обнаруженных изменений обмена аммиака. Для этого оценивали влияние АА на симптоматику интоксикации, вызванной введением циклофосфана в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг, и на продолжительность жизни животных.

Значимость межгрупповых различий средних величин содержания метаболитов в крови оценивали с помощью апостериорного критерия наименьших значимых различий Фишера, межгруп-

повых различий СПЖ – с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Изолированное введение интактным крысам АА не сопровождалось какими-либо клиническими проявлениями токсичности. Введение циклофосфана в дозе 200 мг/кг заметно не влияло на поведение животных в течение 18 ч; при дозе 600 мг/кг в эти сроки, начиная с 0,5 ч после введения циклофосфана, прогрессировали сомнолентия и ступор. Циклофосфан в дозах 1000 или 1400 мг/кг вызывал тремор, потерю постурального и аудиомоторного рефлексов в течение 3 ч; в сроки 1–6 ч эпизодически возникали тонические судороги. Видимых признаков интоксикации не было в ближайшие 0,5 ч после введения циклофосфана в любой из испытанных доз, кроме 1400 мг/кг.

Через 0,5–3 ч после введения циклофосфана и (или) АА уровень аммиака, глутамин, мочевины в крови и азотемии был повышен. На фоне совместного применения токсикантов уровень аммиака в крови возрастал в 2,3 раза, в сравнении с контролем, в то время как на фоне изолированного применения циклофосфана такой уровень достигался на 1,5–2,5 ч позже. Повышение уровня аммиака в крови через 1,5 ч, а мочевины и азотемии – через 0,5 и 3 ч после совместного применения АА и циклофосфана было более существенным, чем при изолированном применении циклофосфана (рис. 1).

Премедикация нелетальной дозой АА усугубляла токсическое действие циклофосфана: у крыс, получивших циклофосфан в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг, на фоне введения АА СПЖ была в 1,5, 2,1, 2,8 или 6,1 раза меньше, чем при введении циклофосфана в сочетании с АН (рис. 2).

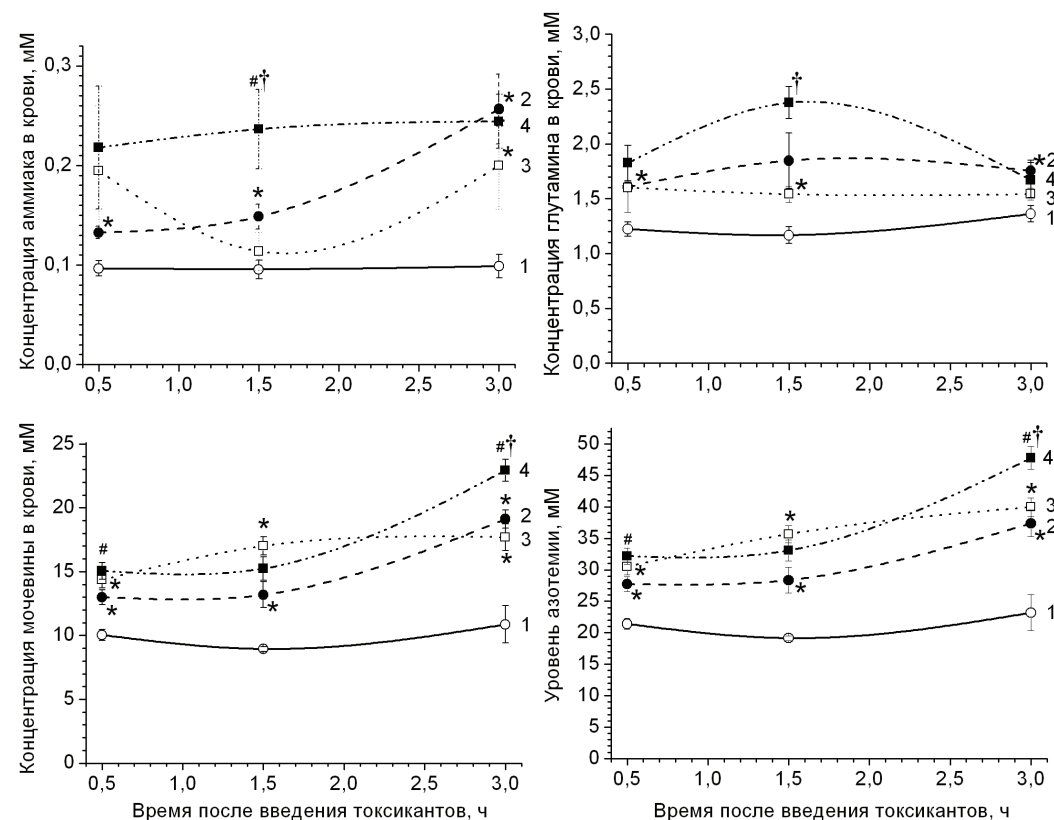


Рис. 1. Содержание аммиака, глутамин, мочевины в крови и уровень азотемии (сумма концентраций аммиака, амидного азота глутамин и азота мочевины) у крыс ($M \pm m$, $n = 6$) после внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 600 мг/кг и (или) внутривентрикулярного введения ацетата аммония в дозе 12 ммоль/кг. 1 – контроль; 2 – циклофосфан; 3 – ацетат аммония; 4 – ацетат аммония и циклофосфан.

* – значимое различие с контрольной группой, $p \leq 0,05$; † – значимое различие с группой «ацетат аммония», $p \leq 0,05$; # – значимое различие с группой «циклофосфан», $p \leq 0,05$.

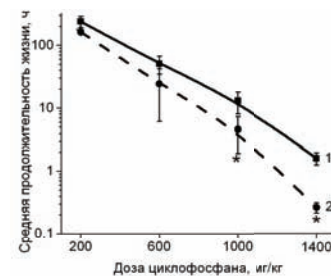


Рис. 2. Влияние внутривентрикулярного введения ацетата аммония в дозе 12 ммоль/кг на среднюю продолжительность жизни крыс ($M \pm m$, $n = 11$) после последующего внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозах 200–1400 мг/кг. 1 – контроль; 2 – ацетат аммония. * – значимое различие с контрольной группой, $p \leq 0,05$

Премедикация нелетальной дозой АА усугубляла токсическое действие циклофосфана: у крыс, получивших циклофосфан в дозах 200, 600, 1000 или 1400 мг/кг, на фоне введения АА СПЖ была в 1,5, 2,1, 2,8 или 6,1 раза меньше, чем при введении циклофосфана в сочетании с АН (рис. 2).

У животных, получавших циклофосфан в сочетании с АА, проявлялись симптомы, характерные для отравления солями аммония – экзофтальм, транзиторное возбуждение, крупный тремор, сменяющийся опистотонусом и апноэ.

Выводы

1. Увеличение люминального пула аммиака пищеварительного тракта крыс усугубляет азотемический и токсический эффекты циклофосфана, вызывая появление у отравленных циклофосфаном животных симптомов, характерных для острого отравления солями аммония и сокращая продолжительность их жизни.

2. Полученные данные свидетельствуют о неблагоприятной роли аммиака желудочно-кишечного происхождения в патогенезе острой тяжёлой интоксикации циклофосфаном.

Список литературы

1. **Barrett J. F.** A modified Nessler's reagent for the micro-determination of urea in tungstic acid blood filtrate / J.

F. Barrett // *Biochem. J.* 1935. Vol. 29. P. 2442-2445.

2. **Haubitz M.** Acute and long-term toxicity of cyclophosphamide / M. Haubitz // *Transplantationsmedizin.* 2007. Vol. 19. P. 26-31.

3. **McDonald G. B.** Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation / G. B. McDonald, J. T. Slattey, M. E. Bouvier [et al.] // *Blood.* 2003. Vol. 101. P. 2043-2048.

4. **Whitehead T. P.** A method for the determination of glutamine in cerebrospinal fluid and the results in hepatic coma / T. P. Whitehead, S. R. F. Whittaker // *J. Clin. Path.* 1955. Vol. 8. P. 81-84.

5. **Wolfgang G. H. J.** Antineoplastic agents / G. H. J. Wolfgang, M. E. I. Leibbrandt // In: *Comprehensive toxicology*, Vol. 7. – Cambridge: Cambridge University Press. 1997. P. 525-547.

Modification of cyclophosphamide toxicity in rat by ammonium acetate

T.V. Shefer

The dynamics of blood ammonia, glutamine and urea level, symptoms of toxic action and the survival time have been studied in rats, intraperitoneally treated with cyclophosphamide, at the background of the gavage with non-lethal dose of ammonium acetate (12 mmol/kg, i. e. 0.35 LD₅₀). Ammonium acetate enhanced the azotaemic action of cyclophosphamide while promoting its lethal action: the mean survival time decreased 1.5, 2.1, 2.8, or 6.1 times at the background of cyclophosphamide i/p doses 200, 600, 1000, or 1400 mg/kg, respectively. Animals exposed to the combination of toxicants, manifested symptoms which were characteristic of the effect of lethal doses of ammonia salts. These data provide the evidence of the detrimental role of gastrointestinal luminal ammonia in the acute high-dose cyclophosphamide toxicity.

Key words: rats, cyclophosphamide, ammonium acetate, blood ammonia, blood urea, mean survival time.

Модель направленного изменения в закладке коры мозга в эмбриогенезе у мышей для изучения постнатальных нарушений развития

А.В. Лобанов, А.Н. Родионов, Е.А. Туховский, А.Н. Мурашев

Филиал учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Пушчинский государственный университет, Пушкино

Контактная информация: д.м.н. Аркадий Николаевич Мурашев murashev@fibkh.serpukhov.su

Создание экспериментальных биологических моделей, сочетающих определенность механизмов поражения и их направленность при воздействии на мозг, – актуальная задача экспериментальной нейробиологии и нейрофизиологии. В данной работе изучались особенности формирования поведения в постнатальном периоде у мышей линии C57BL/6, у которых вызывали направленное нарушение закладки коры на раннем и позднем этапах пренатального кортикогенеза при помощи антипролиферативного агента цитозинарабинозы (Ara-c). Исследованная модель впервые позволила охарактеризовать взаимосвязи между вызванными изменениями в закладке коры и сдвигами в формировании поведенческого фенотипа в постнатальном периоде развития. Выявленные изменения характеризуют специфическую роль клеточного обеспечения коры в формировании поведенческих актов в постнатальном периоде развития у мышей и определяются этапами наибольшей восприимчивости организма к нарушению морфогенеза коры.

Ключевые слова: модель нарушения кортикогенеза, постнатальное развитие, поведение, мыши.

Формирование головного мозга млекопитающих происходит в течение продолжительного пренатального и постнатального периодов, в результате чего возникают упорядоченные клеточные структуры со строго специфическими связями [2, 6]. Сдвиги в процессах нейрогенеза, миграции клеток и их дифференцировки, происходящие в результате воздействия внутренних и внешних факторов в определённые критические периоды пренатального развития животных, приводят к структурно-функциональным изменениям в развитии мозга [12, 15]. Изменение поведенческих реакций в дальнейшем онтогенезе является их следствием [13]. Специфика изменений в поведении может характеризоваться двигательными, когнитивными, эмоциональными расстройствами и определяется сроками и силой воздействия повреждающих фак-

торов на развивающийся мозг [3]. Однако механизмы возникновения нарушений развития мозга, без знания которых невозможна разработка профилактики двигательных и ментальных нарушений, особенно в ранний постнатальный период, пока еще недостаточно изучены.

Актуальной задачей нейробиологии является создание моделей, позволяющих устанавливать взаимосвязь между вызванными изменениями в развитии мозга и, как следствие, – в развитии поведенческого фенотипа. Несмотря на большое разнообразие тератогенных веществ, влияющих на формирование мозга животных, для создания таких моделей в первую очередь используются вещества, обладающие цитотоксическим эффектом. В частности, цитозинарабиноза (Ara-c) является одним из наиболее сильных антипролиферативных агентов, влияющим на процессы нейрогенеза в сроки его введения [15].

В эмбриональном периоде закладки коры у мышей можно выделить ранний (12,5-13,5-е сутки) этап, когда преимущественно делятся клетки глубоких, пятого и шестого слоев коры, и поздний этап (15,5-16,5-е сутки), когда происходит пролиферация клеток верхних, второго и третьего слоев [14]. Предполагается, что воздействие Ага-с в каждый из этих периодов должно приводить к специфическим морфофункциональным нарушениям в соответствующих слоях коры.

Целью настоящей работы является разработка и изучение модели нарушения формирования поведения у мышей в постнатальном периоде развития в зависимости от изменений в морфогенезе коры мозга, которые вызывались введением Ага-с на разных этапах пренатального кортикогенеза. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: (1) оценить апоптотическую гибель клеток и изучить характер морфологических изменений в новой коре развивающегося мозга в зависимости от сроков воздействия на закладку мозга при использовании Ага-с у мышей линии C57BL/6, (2)

изучить формирование поведенческих актов у мышей в постнатальный период при пренатальном введении Ага-с на раннем (12,5-13,5-е сутки) и позднем (15,5-16,5-е сутки) этапах кортикогенеза.

Материалы и методы

Экспериментальные животные и группы. В работе использовались линейные мыши C57BL/6 SPF-статуса, полученные из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, Пущино. У 3-4-х месячных самок получали датированную беременность, первым днем беременности считался день определения вагинальной пробки. Беременным самкам на 12,5-13,5-е сутки эмбрионального развития или на 15,5-16,5-е сутки внутрибрюшинно вводилось вещество Ara-c (1-β-D-Arabinofuranosylcytosine) (Sigma, USA) в дозе 3 мг/кг. Контролем к этим группам служили животные, самки которых получали растворитель – 1% диметилсульфоксид (Dimethyl Sulfoxide (DMSO)) (Serva, France) в те же сроки беременности, что и соответствующие опытные группы (табл. 1).

Таблица 1

Распределение животных по группам в эксперименте

Название группы	Интактная	DMSO1	DMSO2	Ara-c1	Ara-c2
Вводимые вещества	Нет	DMSO	DMSO	DMSO+	DMSO+Ara-c
Эмбриональные сутки введения вещества	Нет	12,5-13,5	15,5-16,5	12,5-13,5	15,5-16,5

Объем введения составлял 10 мл/кг. Мыши содержались в барьерной зоне в клетках МАК2 по одному животному с потомством. Отсадка потомства осуществлялась на 21-е сутки постнатального развития.

Гистологическое исследование. Мозг плодов мышей фиксировался через 12 ч после введения веществ, т.е. на

14-е и 17-е сутки эмбрионального развития. Фиксация и проводка материала, а также заливка ткани в парафин осуществлялась по общепринятой методике [5]. Нарезка осуществлялась через весь конечный мозг животного, расстояние между секциями составляло 30-50 мкм, из одного участка последовательно брали срезы толщиной 4 мкм и 7 мкм.

Окраска 4-х мкм срезов проводилась гематоксилин-эозином. Срезы толщиной 7 мкм окрашивались иммуногистохимически по методу TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling) с использованием Apo-BrdU-IHC In Situ DNA Fragmentation Assay Kit (BioVision, США). Микроскопическое исследование срезов проводилось при помощи светового микроскопа Leica DM LA (Германия). Апоптотический индекс рассчитывался как отношение числа апоптотических телец к числу неповрежденных клеток в процентах. Клетки учитывались на участке фиксированной ширины (150 мкм) через всю длину исследуемой структуры.

Поведенческое тестирование. Для тестирования потомства использовалась батарея тестов по оценке развивающегося поведенческого фенотипа мышей, разработанная в НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН [1] и представляющая собой расширенную модификацию батарей сенсомоторных тестов Альтмана (Altman) [5] и Фокса (Fox) [7]. Тестирование животных проводилось непрерывно в период с 1 по 21 сутки после рождения. Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с требованиями Институтской комиссии по контролю над содер-

жением и использованием лабораторных животных.

Статистический анализ. Результаты гистологических исследований мозга представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Межгрупповые сравнения проводили с определением непараметрического критерия Манна-Витни. Результаты поведенческого тестирования оценивались бинарно, вычислялись средние значения для группы в процентах и средние ошибки выборки. Бинарные данные сравнивали по Фишеру с определением критерия Chi2. Обработка данных проводилась программой STATISTICA 7.0.

Результаты и их обсуждение

В наших исследованиях было показано, что у мышей, получавших Ага-с в дозе 3мг/кг при ее растворении в DMSO, происходили достоверные нарушения в формировании мозга, выраженность которых зависела от сроков введения антипролиферативного агента. Введение Ага-с на 12,5-13,5-е и 15,5-16,5-е сутки эмбрионального развития вызывало апоптоз в пролиферативных зонах новой коры. При этом более высокие апоптотические индексы были выявлены при раннем сроке введения Ага-с (табл.2).

Таблица 2

Апоптотические индексы в пролиферативных зонах новой коры у мышей C57BL/6 в пренатальном периоде через 12 часов после введения Ага-с

Апоптотические индексы в пролиферативных зонах	Сроки эмбрионального развития, сутки					
	12,5-13,5-е			15,5-16,5-е		
	Интактная n=3	DMSO1 n=3	Ara-c1 n=3	Интактная n=3	DMSO2 n=3	Ara-c2 n=3
Моторной коры	0,0	0,2±0,2	11,9±1,7+ #	0,0	0,0	1,1±0,6
Соматосенсорной коры	0,0	0,1±0,1	6,9±3,0 + #	0,0	0,0	0,7±0,2 + #
Зрительной коры	0,0	0,0	3,2±0,8+ #	0,0	0,0	1,2±0,3 + #

Примечание: + - p < 0,05 относительно интактной группы, # - p < 0,05 относительно группы DMSO, по тесту Манн-Витни.

Морфологические изменения в структурах конечного мозга были выявлены только у мышей с поздним сроком введения

агента и характеризовались уменьшением толщины пролиферативной зоны соматосенсорной области коры (табл.3).

Таблица 3

Изменение толщины пролиферативных зон новой коры у мышей C57BL/6 в пренатальном периоде через 12 ч. после второго введения Ага-с

Толщина пролиферативных участков, мкм	Сроки эмбрионального развития, сутки					
	12,5-13,5-е			15,5-16,5-е		
	Интактная n=3	DMSO1 n=3	Aga-c1 n=3	Интактная n=3	DMSO2 n=3	Aga-c2 n=3
Моторной коры	155,3±5,9	143,3±12,7	157,4±16,3	152,8±6,3	138,9±5,7	139,5±5,0
Соматосенсорной коры	147,5±22,0	150,7±8,6	173,2±23,0	136,3±2,2	148,0±6,8	117,4±5,9 + #
Зрительной коры	136,5±16,0	161,7±7,3	120,7±20,0	124,8±10,1	116,0±13,6	131,9±1,7

Примечание: + - $p < 0,05$ относительно интактной группы, # - $p < 0,05$ относительно группы DMSO, по тесту Манна-Витни.

Таким образом, установлено, что Ага-с в используемой нами дозе 3 мг/кг вызывала направленную гибель делящихся в момент введения клеток в пролиферативных зонах конечного мозга, что определялось основным эффектом Ага-с – нарушением клеточного цикла в S-фазе митоза [9].

Дальнейшее изучение формирования поведения мышей с нарушениями закладки клеточных структур разных слоев коры мозга в период эмбриогенеза позволило выявить специфические изменения в созревании животных в зависимости от сроков введения Ага-с. В работе представлены эффекты разных сроков введения Ага-с на формирование поведения поддержания позы (переворачивание на горизонтальной поверхности и избегание края обрыва), на развитие способности координировать движения конечностей для обретения опоры на основе тактильной чувствительности (координация конечностей при тактильном раздражении вентральной части тела деревянным стержнем) и

зрительной чувствительности (координация конечностей при использовании зрения).

Во всех группах исследованных животных с 1-х по 9-е сутки постнатального развития наблюдалась возрастная динамика увеличения числа особей, способных переворачиваться на горизонтальной поверхности и избегать края обрыва. Эффекты Ага-с на формирование поведения поддержания позы характеризовались изменением динамики числа мышей, которые осуществляли данные акты.

В группе животных, получавших Ага-с на 12,5-13,5-е сутки, наблюдалось увеличение числа особей, переворачивающихся на плоскости на 2-е сутки постнатального развития (животные, которые переворачивались, в интактной группе составляли 0%, $n=21$; в DMSO1 – 0%, $n=19$; в Ага-с1 – 24±7%, $n=33$; $p < 0,05$) в сравнении мышами контрольных и интактных групп, и увеличение числа животных, избегавших края обрыва на 8-е сутки постнатально-

го развития (животные, которые избегали края обрыва, в интактной группе составляли 72±7%, $n=37$; в DMSO1 – 66±9 % $n=27$; в Ага-с1 – 88±5%, $n=40$; $p < 0,05$) относительно контрольных животных.

У животных, получавших Ага-с на 15,5-16,5-е сутки эмбрионального развития, было показано отставание в развитии переворачивания на 6-е сутки постнатального развития (животные, которые переворачивались, в интактной группе составляли 75±9%, $n=21$; в DMSO2 – 80±9%, $n=30$; в Ага-с2 – 63±8%, $n=36$; $p < 0,05$) и 7-е сутки постнатального развития (животные, которые переворачивались, в интактной группе составляли 100%, $n=21$; в DMSO2 – 97±3%, $n=30$; в Ага-с2 – 74±7%, $n=36$; $p < 0,05$) относительно интактных и контрольных мышей, а также выявлено худшее избегание обрыва на 3-и сутки (животные, которые избегали обрыва, в интактной группе составляли 27±7%, $n=37$; в DMSO2 – 59±8%, $n=32$; в Ага-с2 – 15±6%, $n=40$; $p < 0,05$) и 6-е сутки (животные, которые избегали обрыва, в интактной группе составляли 68±8%, $n=37$; в DMSO2 – 91±3%, $n=32$; в Ага-с2 – 68±7%, $n=40$; $p < 0,05$) в сравнении с мышами контрольной группы.

У животных всех групп происходило развитие координации передних конечностей на деревянном стержне в период с 7-х по 12-е и задних конечностей – с 7-х по 14-е сутки постнатального развития. При этом у мышей с введением Ага-с на 12,5-13,5-е сутки эмбрионального развития было выявлено отставание в развитии координации на стержне передних конечностей на 8-9-е сутки (рис. 1), а у мышей с введением агента на 15,5-16,5-е сутки эмбрионального развития – задних конечностей на 11-12-е сутки относительно контроля (рис. 2).

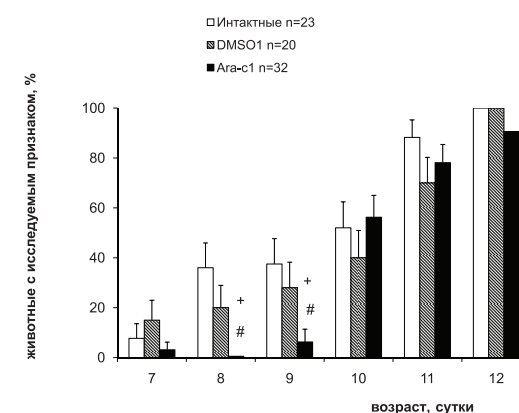


Рис. 1. Отставание в развитии координации передних конечностей на деревянном стержне в постнатальный период у мышей C57BL/6 с ранним воздействием за закладку коры

+ - $p < 0,05$ группа с введением Ага-с относительно интактной группы; # - $p < 0,05$ группа с введением Ага-с относительно контроля DMSO, по Фишеру, критерий Chi2.

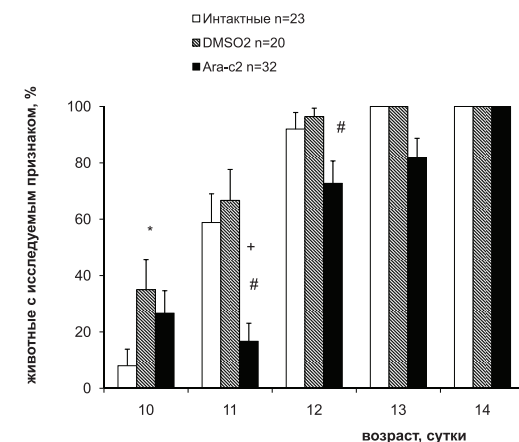


Рис. 2. Отставание в развитии координации задних конечностей на деревянном стержне в постнатальный период у мышей C57BL/6 с поздним воздействием за закладку коры

* - $p < 0,05$ группа с введением DMSO относительно интактной группы, + - $p < 0,05$ группа с введением Ага-с относительно интактной группы; # - $p < 0,05$ группа с введением Ага-с относительно контроля DMSO, по Фишеру, критерий Chi2.

Поведение, обеспечивающее обретение опоры передними конечностями на основе зрительной афферентации,

наблюдалось с 14-х по 18-е сутки постнатального развития, при этом у мышей экспериментальных групп были выявлены отставания в развитии поведения относительно контроля. У мышей с ранним сроком введения Ага-с сдвиги в развитии координации конечностей возникали на 15-16-е сутки постнатального развития (рис. 3а), а у мышей с поздним сроком введения препарата на – 15-18-е сутки относительно соответствующих контрольных групп (рис. 3б).

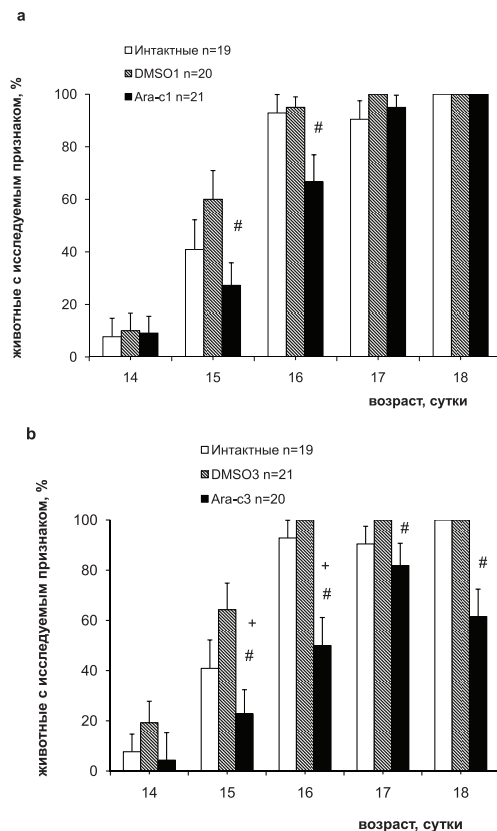


Рис. 3. Развитие координации конечностей в постнатальный период у мышей C57BL/6 с ранним (а) и поздним (б) воздействием за закладку коры

+ - $p < 0,05$ группа с введением Ага-с относительно интактной группы, # - $p < 0,05$ группа с введением Ага-с относительно контроля DMSO, по Фишеру, критерий Chi2.

Таким образом, было установлено, что эффекты воздействия Ага-с на раннем сроке характеризовались изменениями на начальных этапах формирования поведенческих актов, которые быстро компенсировались. При введении Ага-с на позднем сроке, изменения в созревании поведения были наиболее продолжительными и могли выходить за рамки формирования актов в раннем онтогенезе, свойственных линии мышей C57BL/6. Показано, что при раннем сроке введения Ага-с сдвиги в формировании ранних поведенческих актов носили характер как отставания, так и ускорения, тогда как при позднем сроке введения препарата наблюдалось только замедление в развитии поведения.

Специфичность эффектов разных сроков введения антипролиферативного агента на формирование ранних двигательных координаций, вероятно, определяется изменениями в формировании нейронных сетей и межклеточных контактов в новой коре, которые происходят при нарушении пролиферации клеток мозга в результате действия различных повреждающих факторов [15, 11]. Предполагается, что при раннем сроке введения препарата происходит изменение эфферентного контроля и планирования движений на уровне моторной коры с вовлечением сенсорных и ассоциативных областей и базальных ганглий (нарушение пролиферации клеток IV, V слоев новой коры). При позднем сроке введения, по-видимому, происходит изменение ассоциативных взаимодействий между различными отделами коры (выпадение клеток II, III слоев новой коры) [10, 8].

Таким образом, в настоящем исследовании была отработана экспериментальная модель направленного наруше-

ния морфогенеза мозга в пренатальном периоде у мышей при помощи антипролиферативного агента Ага-с. Исследованная модель впервые позволила охарактеризовать взаимосвязи между вызванными изменениями в закладке коры и сдвигами в формировании поведенческого фенотипа в постнатальном периоде развития. Выявленные изменения характеризуют специфическую роль клеточного обеспечения коры в формировании поведенческих актов в постнатальном периоде развития у мышей и определяют этапы наибольшей восприимчивости организма к нарушению морфогенеза коры.

Выводы

1. Действие Ага-с на раннем и позднем сроках кортикогенеза приводит к апоптотической гибели клеток в пролиферативных зонах конечного мозга и морфологическим изменениям в структуре формирующейся коры.
2. Воздействие Ага-с на раннем и позднем сроках кортикогенеза приводит к изменениям в динамике формирования поведения, которые выражаются как в ускорении, так и замедлении созревания сенсомоторных координаций в постнатальный период развития. Изменения в формировании поведения при раннем воздействии затрагивают начальные этапы формирования поведенческих актов и быстрее компенсируются.

Список литературы

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и образованию, государственный контракт от 05 октября 2009 г. № 02.740.11.5100

1. Зарайская И.Ю., Александрова Е.А. Сравнительный подход к изучению

системогенеза ранних поведенческих актов // XVIII съезд физиологического общества им И.П.Павлова: Тез. Докл. Казань. 2001. 93 с.

2. Максимова Е.В. Функциональное созревание неокортекса в пренатальном онтогенезе. М.: Наука. 1979. 146 с.

3. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Гилеревич Е.Г., Коржевский Д.Э., Косткин В.Б., Белостоцкая Г.Б. Повреждающие воздействия в критические периоды пренатального онтогенеза как фактор, модифицирующий структурное развитие головного мозга и поведенческие реакции после рождения // Вестн. Росс. Акад. Мед. Наук. 2002. № 12. С. 32-35.

4. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника (руководство для врачей и лаборантов). М.: Медицина. 1996. 548 с.

5. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat // Anim.Behav. 1975. 23. P. 896-920.

6. Bayer S.A., Altman J. Neocortical development. New York: Raven Press, 1991.

7. Fox M.W. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse // Anim. Behav. 1965. 13. P. 234-241.

8. Georgopoulos A.P. News in Motor Cortical Physiology. News Physiol Sci. 1999.14. P. 64-68.

9. Grant S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology // Adv Cancer Res. 1998. 72. P. 197-233.

10. Mink J.W., Thach W.T. Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior // Curr Opin Neurobiol. 1993.3(6). P. 950-957.

11. Nakanishi K., Watanabe K., Kawabata M., Fukuda A., Oohira A. Altered synaptic activities in cultures of neocortical neurons from prenatally

X-irradiated rats // *Neurosci Lett.* 2004. 355(1-2). 61-5.

12. Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Dammerman R.S., Kriegstein A.R. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex // *Nature*. 2001. 409. P. 714-720.

13. Ono-Yagi K., Ohno M., Iwami M., Takano T., Yamano T., Shimada M. Heterotopia in microcephaly induced by cytosine arabinoside: hippocampus in the neocortex // *Acta Neuropathol.* 2000. 100. P. 403-408.

14. Takahashi T., Goto T., Miyama S., Nowakowski R.S., Caviness V.S. Jr. Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall // *J Neurosci.* 1999. 19. P. 10357-10371.

15. Takano T., Akahori S., Takeuchi Y., Ohno M. Neuronal apoptosis and gray matter heterotopia in microcephaly produced by cytosine arabinoside in mice // *Brain Res.* 2006. 1089 (1). P. 55-66.

Model of targeted damage of brain cortex anlage during mice embriogenesis for investigation of postnatal developmental disorders

A.V. Lobanov, A.N. Rodionov, E.A. Tukhowsky, A.N. Murashev

Design of experimental biological models, combining the determinancy of damaging mechanisms with targeting during effecting on the brain, is relevant objective of experimental neurobiology and neurophysiology. In this work, we investigated characteristics of behavior forming during postnatal period in mice C57BL/6 with targeted damage of cortex anlage at early and late stages of prenatal corticogenesis, coursed with antiproliferative agent cytosine arabinoside (Ara-c). This experimental model firstly allowed to characterize the connections between caused changes in cortex anlage and shifting in the forming of behavioral phenotype at the postnatal developmental period. Found changes are characterize specific role of cortex supplement with cells in the forming of behavioral acts at the postnatal period of mice development and determined by stages of maximum susceptibility of organism to cortex morphogenesis damaging.

Key words: model of corticogenesis damage, postnatal development, behavior, mice.

Особенности изменения биохимического состава крови пойкилотермных биомоделей при недостаточном питании

Н.И. Маслова¹, А.Б. Петрушин¹, Г.И. Пронина¹, А.О. Ревякин²

¹ – Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИР), Московская область

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Gidrobiont4@Yandex.ru

В работе представлены данные по изучению изменения биохимического состава крови у рыб при смоделированном дефиците питания.

Ключевые слова: альтернативные биомодели, недостаток питания, биохимия крови.

Рыбы являются биологическим объектом, позволяющим изучать метаболические реакции при разных условиях жизни. В литературе приводятся данные о значительных изменениях обмена веществ рыб на разных этапах голодания. Длительное голодание характеризуется падением активности большинства ферментных систем, что соответствует значительному снижению метаболических процессов в целом. Резко снижается секреция и активность ферментов в пищеварительном тракте. Следствием прекращения поступления пищи являются признаки атрофии желудочно-кишечного тракта (отмечено снижение индекса кишечника примерно в два раза). В целом сумма изменений в пищеварительном тракте, наблюдаемых при голодании, может быть охарактеризована как явление ферментативной дезадаптации, связанной с полным выключением функции пищеварения.

А.А. Покровский (1974) выделяет три последовательные стадии ферментной адаптации при голодании. Первая стадия кратковременна и характеризуется быстрым истощением резервов гликогена

с последующей активацией его синтеза (глюконеогенеза). Вторая стадия связана с длительным адаптивным повышением активности жиромобилизующих ферментов – липаз и ферментов, катализирующих окисление жирных кислот. Длительность этой фазы в определенной степени зависит от емкости жировых депо в организме. Третья стадия характеризуется практическим истощением лабильных энергетических ресурсов организма и резким усилением распада белков, которые используются теперь и как источники энергии. Эта критическая фаза жизни голодающего организма характеризуется падением активности жиромобилизующих ферментов и некоторой активацией ферментов белкового метаболизма.

Объектами исследований были двухлетки чешуйчатого карпа. Недостаточное питание было смоделировано путем увеличения плотности посадки. Норматив естественной рыбопродуктивности (по карпу, карасю) для 5 зоны рыбоводства – 220 кг/га (Козлов, Абрамович, 1980). В данной модели нами было получено 680 кг/га без кормления и удобрения прудов,

поэтому с августа карпы находились в условиях хронического голодания. Забор крови осуществляли в ноябре месяце. Биохимические показатели определяли на анализаторе ChemWell с использованием реактивов VITAL.

Результаты исследований показали, что активность АСТ и КК в сыворотке крови опытных рыб были несколько выше, чем в контроле, а содержание общего белка и альбуминов не имело достоверных отличий между группами. Были выявлены межгрупповые различия показателей энергетического обмена. Так, у карпов, находившихся в условиях хронического голодания, было отмечено повышение глюкозы более чем на 60% при одновременном трехкратном уменьшении триглицеридов, что соответствует 2 фазе ферментной адаптации (по

А.А. Покровскому), характеризующейся повышением активности жиромобилизующих ферментов. Увеличение концентрации мочевины в крови объясняется, по всей видимости, не избыточным образованием (т.к. наблюдается дефицит корма), а ее недостаточным выведением из организма. Это, вероятно, связано с нарушением коллоидно-осмотического давления крови, вызванным недостаточным поступлением в организм ионов хлора и др.

Кроме того, при недостаточном питании наблюдалось довольно редкое для рыб явление – желчно-каменная болезнь, обусловленная застоем желчи и накоплением желчных кислот в желчном пузыре из-за отсутствия пищи в кишечнике (Маслова и др., 2010).

Таблица 1

Биохимическая оценка крови двухлеток карпа при смоделированном дефиците питания

Показатель	Достаток корма	Дефицит корма
Общий белок, г/дл	20,3±0,84	17,2±1,03
Альбумины, г/дл	9,3±0,39	8,2±0,50
Триглицериды, мг/дл	144,9±13,0	49,7±6,85
Глюкоза, ммоль/л	5,8±0,83	9,1±1,12
АЛТ, Ед/л	33,2±5,34	37,8±4,46
АСТ, Ед/л	98,3±16,7	139,0±7,29
КК, Ед/л	2397,7±591,	4026±426,1
ЩФ, Ед/л	55,4±7,26	27,9±4,85
Лактат, мг/дл	42,0±12,9	37,3±6,82
Холестерин, мг/дл	94,3±6,90	92,4±5,58
Мочевая кислота, мг/дл	4,1±0,28	5,6±0,28
Мочевина, мг/дл	4,8±1,22	17,4±1,58

Совокупность биохимических показателей крови свидетельствуют о негативном влиянии условий жизни второго периода выращивания.

Таким образом, при недостаточном питании у рыб с высоким потенциалом роста, во 2-й фазе ферментной адапта-

ции наблюдаются изменения энергетического обмена: значительно снижается уровень триглицеридов в сыворотке крови и возрастает активность креатинкиназы. Одновременно с этим отмечается накопление мочевины, а также застой желчи в желчном пузыре.

Список литературы

1. *Козлов В.И., Абрамович Л.С.* Справочник рыбвода. М.: Россельхозиздат. 1980. 220 с.
2. *Маслова Н.И., Пронина Г.И., Петрушин А.Б.* Случаи желчнокаменной

болезни у двухлетков карпа чешуйчатой линии // Вестник РАСХН. 2010. № 4. С. 68-70.

3. *Покровский А.А.* Роль биохимии в развитии науки о питании. М.: Наука. 1974. 119 с.

Features of biochemical structure of blood poikilothermic biomodels changes under an insufficient food contitions

N.I. Maslova, A.B. Petrushin, G.I. Pronina, A.O. Revjakin

Data of change in blood chemistry of fish in simulated food's deficite ar presented.

Key words: alternative biomodels, food's deficite, blood cemistry.



Локализация проекций полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа

Н.Н. Каркищенко¹, А.А. Вартанов², А. В. Вартанов³, Д.Б. Чайванов²

¹ – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

³ – МГУ, факультет психологии, Москва

Контактная информация: чл.-корр. РАМН Каркищенко Николай Николаевич
niknik2808@yandex.ru

В статье предлагается метод локализации проекций полей коры больших полушарий на поверхность головы. В качестве модели мозга принят стереотаксический атлас Тайлераха. Результат получен в угловых координатах, что делает его инвариантным к размерам головы.

Ключевые слова: поле Бродмана, транскраниальная нейростимуляция, нейронавигация.

В настоящее время представляет интерес решение задачи локализации проекций на поверхность головы различных полей Бродмана коры головного мозга человека. Эта задача очень важна для проведения нейростимуляции различного вида – микрополяризации, электростимуляции, ультразвуковой и магнитной стимуляции. Если ультразвуковая стимуляция находится в стадии разработки [4], то микрополяризация широко применяется в практике лечения детского церебрального паралича, задержки психического развития, болезни Паркинсона, нарушений речи, головных болей и других заболеваний ЦНС [6].

Возможные методы решения задачи

К настоящему моменту известны способы решения этой задачи с помощью проведения МРТ-обследования, схемы

Кронлейна-Брюсовой или таблицы соответствия местоположения электродов электроэнцефалографической системы «10-20%» и полей по Бродману [8, 9]. Схема Кронлейна-Брюсовой описана в монографии Д. Ю. Пинчука [6]. При использовании схемы Кронлейна-Брюсовой на черепе проводится ряд параллельных линий, позволяющих сориентироваться относительно основных борозд головного мозга. За опорные точки берутся надпереносье, выступ затылочной кости (inion), верхний и нижний края глазницы, верхний и нижний края слуховых проходов, середина скуловой дуги, суставной отросток нижней челюсти, задний край сосцевидного отростка. Система Кронлейна-Брюсовой имеет невысокую точность и рекомендуется на начальных этапах освоения методов транскраниальной стимуляции. Электроэнцефалографические схе-

мы дают несколько лучшую точность локализации, и невысокую стоимость по сравнению с методами, использующими МРТ-обследование. Более того, в таблицах, опубликованных в двух вышеуказанных статьях [8, 9], приведены различные результаты измерений. В случае же МРТ-обследования обеспечивается высокая точность локализации, но для реализации такого метода необходимо использовать дорогостоящее оборудование. Решение задачи локализации с МРТ-обследованием используется при стереотаксическом вмешательстве [1].

Стереотаксическая система наведения нашла на сегодняшний день широкое применение при нейрохирургических операциях [1]. В этой системе наведения применяется как непосредственная, так и опосредованная локализация. Непосредственная локализация имеет высокую точность и заключается в измерении координат целевой точки по данным интроскопического обследования (МРТ, РКТ). Опосредованная локализация заключается в построении системы координат мозга по локализованным внутримозговым ориентирам, сравнении внутримозгового пространства пациента со стереотаксическим атласом. Опосредованная локализация часто применяется в клинической практике, это происходит в случае, если мишень не видна на рентгеновском интроскопическом обследовании. А именно, для функционального стереотаксиса с прицельной имплантацией в ядра и проводящие пути головного мозга необходимо использовать предоперационное МРТ-обследование, для нефункционального стереотаксиса с наведением и воздействием на опухоли, кисты, абсцессы, гематомы головного мозга – РКТ-обследование, производимое перед операцией. Основным недостатком

РКТ-обследования является сложность идентификации структур мозга на полученном изображении, недостатком МРТ в ряде случаев – большая величина ошибки по одной из 3-х координат изображения, для некоторых томографов она может достигать 5-6 мм.

Расчетное МРТ-обследование проводится с использованием МРТ-локализатора, состоящего из капы для прикусывания пациентом, и системы, состоящей из основания и трех стержней с полостями на концах, заполненными МР-контрастной жидкостью. Капа фиксируется на локализаторе, благодаря чему пространственное расположение зубов человека можно обнаружить на томограмме. Затем, при помощи ЭВМ, производится расчет местоположения целевых точек, соответствующих объектам на МРТ-изображении, и с помощью локализатора, зная расположение зубов пациента, эти точки находят непосредственно на поверхности головы пациента. Расчетное МРТ обследование можно разделить на следующие основные этапы [1]:

- 1) изготовление оттиска для зубов;
- 2) изготовление МРТ-локализатора;
- 3) проведение томографии пациента с МРТ-локализатором;
- 4) идентификация меток локализатора на МРТ-изображении;
- 5) расчетная часть (расчет преобразования координат, вычисление координат целевых точек).

Общая погрешность стереотаксической процедуры невысока и составляет 1-3 мм [1].

Для задач магнитной стимуляции наиболее точными являются методы стереотаксической нейронавигации с использованием радиочастотного зонда Polhemus Isotrack (Polhemus Digital Corp), а также с использованием опти-

ческих и механических шарнирных сенсоров для детектирования положения головы и магнитной катушки [2]. Эти методы также используют предварительное МРТ-обследование.

Однако для задач нейростимуляции можно обойтись менее точными методами, так как обычно стимулируемая область мозга достаточно велика относительно возможной ошибки определения местоположения этой области. Так, для магнитной стимуляции допустимо использование электроэнцефалографической схемы «10-20%» [2], радиус области воздействия составляет примерно 16 мм. При микрополяризации, как показано в работе [5], область затекания тока не меньше размера используемых электродов. В свою очередь, радиус используемых электродов может составлять 5 – 15 мм [5, 6], что делает возможным применение схемы «10-20%» для локализации мишени. При ультразвуковой стимуляции область воздействия также достаточно велика и составляет 5-10 мм [4].

Нами предлагается достаточно точный способ локализации с использованием стереотаксического атласа без использования МРТ-обследования и без обязательной процедуры изготовления МРТ-локализатора для каждого конкретного пациента.

Алгоритм локализации полей коры по Бродману

Для локализации полей коры по Бродману нами предлагается использовать алгоритм, учитывающий неоднородности формы головы и кривизну черепа. Для этого предлагается использовать угловые криволинейные координаты на поверхности головы, позволяющие наилучшим образом учесть возможные

вариации размеров и формы черепа различных испытуемых. Нами разработана компьютерная программа, реализующая этот алгоритм и позволяющая находить местоположение проекций полей коры больших полушарий головного мозга (по Бродману) на поверхности головы.

Алгоритм использует атлас Тайлера [7]. Атлас (в электронном виде) представляет собой трехмерный массив, каждый элемент которого – число от 0 до 1105 – соответствует кубическому вокселю $1 \text{ мм} \times 1 \text{ мм} \times 1 \text{ мм}$, представляющему участок головы. Число характеризует тип структуры мозга, находящейся на данном участке, при этом 0 соответствует пустоте или не распознанной структуре мозга. Вначале программа распознает пустоту внутри мозга и заполняет соответствующие ячейки массива, при этом пустота вне головы остается помеченной символом 0. Это делается с помощью построения выпуклой оболочки структур, отмеченных в атласе.

Затем программа находит границу головы по внешней границе зон, отмеченных на атласе. Затем в каждой точке поверхности головы строится нормаль к плоскости, касательной к этой поверхности. Это делается с помощью приближенного алгоритма, который находит плоскость, «приблизительно параллельную» касательной в данной точке, а затем проводит нужный перпендикуляр. Эта плоскость строится следующим образом. Пусть нормаль строится в точке О поверхности. Программа находит точки поверхности, удаленные от точки О на расстояние не более R, и находит множество вокселей, являющихся границей этой области. Граница представляет собой кривую, лежащую на поверхности головы. На этой кривой выбираются три точки, достаточно далеко отстоящие друг от друга (так, чтобы угол между

соответствующими радиус-векторами, проведенными из точки О, был больше 90 градусов), и затем через эти точки проводится плоскость. Параметр R был выбран нами равным 10 мм, что является допустимым с учетом размеров и средней кривизны черепа взрослого человека.

После этого программа строит векторное поле внутри головы, определенное следующим правилом: в каждой точке рассматривается вектор, направленный по прямой, содержащей нормаль, проведенную из некоторой точки поверхности и проходящую через данную точку. Это можно сделать однозначным образом, если точка находится на небольшом расстоянии от поверхности головы, что справедливо для коры мозга.

Далее программа находит геометрический центр нужной зоны коры головного мозга и производит смещение этой точки вдоль векторного поля, порожденного нормальными к поверхности головы.

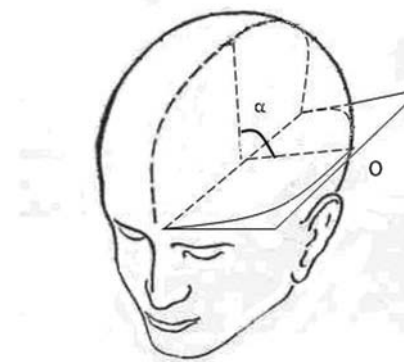


Рис. 1. На схеме головы представлена первая угловая координата (угол α) точки О на поверхности головы.

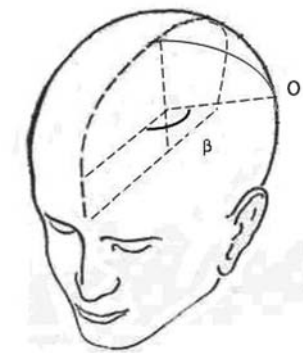


Рис. 2. Аналогично рис. 1 представлена вторая угловая координата (угол β) той же точки О на поверхности головы.

Для применения полученных результатов необходимо изготовить из растягивающегося материала специальную «шапку», на которой размечено расположение проекций центров полей по Бродману. «Шапка» надевается на го-

лову человека так, чтобы дуга nasion-inion, отмеченная на ней, совпала с соответствующей дугой на поверхности головы. Это будет означать, что «шапка» надета симметрично, и зоны мозга, помеченные на шапке, находятся над соот-

Смещение оканчивается на поверхности головы, и в результате точка оказывается на поверхности. Таким образом, мы получаем евклидовы координаты точки проекции, нужно теперь перевести их в угловые, для того чтобы полученный результат можно было применять при локализации проекций для пациентов с различными размерами и формой головы. Это делается по следующему алгоритму. Из атласа Тайлера нам известны координаты точек nasion и inion, которые задают прямую nasion – inion и дугу в саггитальной плоскости сечения головы. Вторая прямая проводится через середину этой дуги перпендикулярно прямой nasion – inion. Теперь каждая точка на поверхности головы может быть задана двумя углами α и β в соответствии с рис. 1 и 2. Полученные угловые координаты точек и есть результат работы программы. Требуемая программа была разработана А. А. Вартановым в вычислительной среде MATLAB.

ветствующими зонами мозга человека. Для этого достаточно, чтобы совпали точки nasion-inion, то есть ямка на переносице и затылочная ямка, а также расстояние между боковыми краями шапки и ушными отверстиями были одинаковы для левого и правого полушария. На «шапке» отмечены центры проекций полей по Бродману в угловых координатах,

а также центры проекций зон атласа, расположенных внутри полей по Бродману. Схема соответствия этих зон для правого и левого полушарий представлена в табл. 1. Слева в таблице находится номер поля Бродмана коры больших полушарий, а справа – номера зон в атласе, которые соответствуют этому полю.

Таблица 1

Соответствие зон в атласе Тайлерах полям по Бродману, лежащим на поверхности мозга

N	Номера зон в атласе Тайлерах (правое полушарие)	Номера зон в атласе Тайлерах (левое полушарие)
3	896, 898, 940, 1019, 1091, 1092	895, 897, 938, 939, 1088
4	805, 806, 1090, 1093, 1099, 1100, 1105	804, 808, 835, 836, 1003, 1089, 1104
5	1067, 1070, 1086, 1096, 1098	1064, 1068, 1083, 1095, 1097
6	683, 810, 1011, 1012, 1024, 1076, 1078, 1094	682, 809, 1009, 1010, 1022, 1023, 1075, 1077
7	953, 969, 972, 1040, 1044, 1066, 1081, 1087, 1102	952, 968, 971, 1039, 1043, 1065, 1080, 1101
8	1026, 1028, 1034, 1036	1025, 1027, 1033, 1035
9	815, 816, 900, 901, 903, 944, 982, 984	813, 814, 841, 899, 902, 943, 981, 983, 1004
10	407, 408, 411, 412, 471, 484, 517, 754	405, 406, 410, 413, 483, 516
11	103, 109, 145, 153, 192, 198, 236, 301	102, 142, 152, 191, 197, 235, 300
17	245, 305, 477	242, 303, 475
18	205, 249, 254, 304, 307, 478, 488	203, 247, 250, 306, 474, 487
19	259, 263, 266, 316, 415, 418, 423, 426, 427, 480, 564, 568, 700, 819, 844, 849, 987	258, 264, 265, 315, 414, 417, 421, 425, 428, 479, 566, 699, 818, 820, 843, 848, 986
20	13, 18, 19, 26, 29, 46, 124, 135, 167, 172, 218	8, 15, 23, 53, 123, 171, 217
21	78, 79, 275, 276	77, 97, 286, 352
22	445, 446, 460, 588, 634, 766	442, 443, 458, 587, 764, 765, 767
37	209, 214, 268, 270, 271, 324, 328, 330, 331, 333, 334, 422, 560, 627	208, 213, 267, 269, 323, 329, 332, 420, 558, 628
38	35, 36, 41, 44, 60, 221, 222	33, 34, 38, 45, 59, 101
39	704, 705, 709, 907, 910, 918, 959, 970, 975, 989, 991, 1015	702, 703, 708, 906, 908, 917, 958, 967, 974, 990, 1014
40	778, 781, 872, 881, 885, 928, 993, 1000, 1062, 1082	774, 785, 869, 877, 878, 927, 992, 999, 1061
41	673, 719, 722, 768, 771	672, 720, 721, 723, 770
42	675, 727, 741	674, 729, 742
43	740, 793, 797	738, 739, 792
44	689, 691, 749	690, 748
45	603, 653, 656	602, 655
46	608, 658, 696	607, 697
47	147, 188, 299, 302, 393, 401, 402, 466, 467	146, 185, 298, 392, 399, 409, 468, 511, 604

Вариация размера головы человека при этом не играет существенной роли, поскольку в угловых координатах проек-

ции данных точек мозга на поверхность головы мало изменяется при изменении масштаба. Погрешностью, возникаю-

щей из-за неоднородности волосяного покрова, также можно пренебречь, опять же потому, что рассматриваются угловые координаты точек. Таким образом, мы получаем средство для локализации проекций полей по Бродману.

Результат работы программы для полей Бродмана левого и правого полушария, перечисленных в табл. 1, представлен в табл. 2. В ней приведены абсолютные величины угловых координат центров проекций областей в градусах.

Таблица 2

Результат расчета угловых координат для полей Бродмана коры больших полушарий (даны абсолютные величины углов в градусах)

Номер поля	Левое полушарие		Правое полушарие	
	1-й угол	2-й угол	1-й угол	2-й угол
3	33	92	30	93
4	31	85	29	88
5	14	142	20	127
6	30	64	22	54
7	13	144	17	154
8	27	42	26	37
9	23	27	29	32
10	33	19	33	19
11	53	15	53	14
17	44	170	53	168
18	56	159	48	161
19	43	151	45	149
20	63	109	88	83
21	57	55	19	29
22	62	92	61	102
37	73	121	74	121
38	84	46	87	45
39	49	131	48	131
40	38	115	39	114
41	19	132	56	89
42	–	–	59	92
43	58	81	55	80
44	56	75	57	61
45	56	61	54	51
46	54	50	47	41
47	53	38	65	35

Список литературы

1. **Бехтерева Н.П., Аничков А.Д., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А., Илюхина В.А. и др.** Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека / под ред. Н.П. Бехтеревой. – М.: АСТ; СПб.: Сова. Владимир:ВКТ. 2008. 464 с.
2. **Вальтер Х.** Функциональная визуализация в психиатрии и психотерапии // АСТ Астрель. Полиграфиздат. Москва. 2004.
3. **Гнездицкий В.В.** Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография. Москва «МЕДпресс-информ». 2004. 624 с.
4. **Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Вартанов А.А.** Об эффективности и безопасности транскраниальной ультразвуковой стимуляции головного мозга человека // Биомедицина. № 3. 2011.
5. **Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.,** Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации // Биомедицина. №3. 2011.
6. **Пинчук Д.Ю.** Транскраниальные микрополяризации головного мозга: клиника, физиология. С.-Пб. «Человек». 2007. 496 с.
7. **Taillerah J, Tournoux P.** Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain, George Thieme Verlag Stuttgart New York, Thieme Medical Publishers. Inc. New York. 1988.
8. **Homan R.W., Herman J., Stewart C., Purdy P.** Cerebral location of international «10-20» system electrodes placement. / EEG and Clin. Neuropsychol. 1987. V. 66. P. 377-382.
9. **Towle V. L. et al.** The spatial location of EEG electrodes: locating the best-fitting sphere relative to cortical anatomy. / EEG and Clin. Neuropsychol. 1993. V.86. P. 1-6.

Localization of Brodmann fields of human cerebral cortex projections on a scalp surface

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

In this paper we develop method of localizing projections of cortical areas on a scalp surface. Method uses co-planar stereotaxic atlas as a model of a human brain. Result is given in angular coordinates, which makes it invariant to the differences of a head size.

Key words: Brodman area, transcranial neurostimulation, neuronavigation

Сенсорный элемент на основе наночастиц золота для определения кардиомаркёров

А.А. Шумков, Е.В. Супрун, В.В. Шумянцева, А.И. Арчаков

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии В.Н. Ореховича РАМН, Москва

Контактная информация: Андрей Алексеевич Шумков тел.: +7(499)-246-58-20; факс: +7(499)-245-08-57, sumkov@list.ru

Разработан метод определения кардиомаркёра тропонина I с помощью инверсионной вольтамперометрии (ИВА). Метод основан на регистрации сигнала золотых наночастиц (AuНЧ) на электродах с иммобилизованными антителами к тропонину I. Достоверный предел обнаружения тропонина I составил 3.46 нг/мл – 32 нг/мл (147 pM – 1.36 nM).

Ключевые слова: кардиомаркеры, инверсионная вольтамперометрия, золотые наночастицы, тропонин I, антитела.

Одной из основных причин смерти и инвалидности во всем мире продолжают оставаться болезни сердца. Некроз миокарда сопровождается появлением в крови специфичных биомаркёров – белков, высвобождающихся при разрушении миоцитов: миоглобина, сердечного тропонина и специфичных ферментов – креатинкиназы, лактатдегидрогеназы и др. [1]. В настоящее время биологические маркеры широко используются в кардиологии для диагностики острого коронарного синдрома, повреждения функции миокарда, а также для оценки прогноза

заболевания и развития осложнений. Однако, несмотря на это, не существует «идеального» кардиального маркера, который был бы высокочувствителен и информативен на ранних стадиях развития патологического процесса [2]. Тропонин I и T специфические маркёры повреждения ткани миокарда: их обнаружение в сыворотке крови является индикатором повреждения миокарда, и, следовательно, оба белка имеют большой потенциал в качестве определяемых сердечных биомаркёров [3, 4]. При инфаркте миокарда на 4-6 ч. количество тропонина I

начинает увеличиваться, и максимальная концентрация достигается через 12-24 ч [4]. Для селективного определения тропонина I использовали антитела (Ат) к данному белку. Тропонин T и I электронеактивные белки распределены в диапазоне потенциалов от -600 до +600 мВ, что делает невозможным прямое определение их в плазме крови по электрохимическим параметрам.

Цель исследования

Разработать методику определения тропонина I в плазме крови по регистрации сигнала AuНЧ на поверхности электрода с помощью ИВА.

Материалы и методы

Оборудование и реактивы

Электрохимические измерения были выполнены с использованием потенциостата «PGSTAT12 Autolab» (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) с программным обеспечением «GPES». В работе использовались трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП «ЭЛКОМ», Москва), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Для измерения pH буфера использовался ионметр фирмы «Inolab». Спектрофотометрические измерения проводились с помощью спектрофотометра фирмы «Vari-an» – «Cary 100 Scan», с программным обеспечением «Cary WinUV». В работе пользовались следующие реактивы: Ат к тропонину I (17В), дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ) (Sigma), тетрахлорзолотая кислота (HAuCl₄) (Sigma), плазма крови здоровых доноров и доноров больных острым инфарктом миокарда (ОИМ)

с различной концентрацией [5]. AuНЧ получали путём электролиза из тетрахлорзолотой кислоты (HAuCl₄) при потенциале –500 мВ и временем электроосаждения 180 – 600 с.

Приготовление иммуносенсоров

На рабочую поверхность печатного графитового электрода модифицированного AuНЧ, полученного в ходе электроосаждения, наносили 1 мкл 0.1М ДДАБ и высушивали в течение 15 мин. Затем на рабочую поверхность наносили 1 мкл раствора Ат к тропонину I (120 нг/мкл) и высушивали в течение 20 мин. Приготовленный иммуносенсор оставляли на ночь в холодильнике при температуре 4°C.

Определение тропонина I с помощью иммуносенсоров

На рабочую поверхность иммуносенсора наносили 1 мкл плазмы крови здоровых или больных доноров ОИМ. Связывание белка со специфическими Ат проводилось при 37 °C в течение 50 мин. в термостате. Электрод перед измерением сигнала помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл ФБ (0.1М K₂HPO₄ + 50 mM NaCl), pH=7,4 на 30 мин. при 37° C.

Электрохимические измерения

Сенсорный элемент после 30-минутной отмывки при 37°C закрепляли в электрохимической ячейке. Фоновая кривая (а) снималась в диапазоне сканирования от – 600 мВ до 600 мВ, $v = 50$ мВ/с, затем подавали потенциал +1,2 В, 30 с и регистрировали сигнал (b) в этом же диапазоне потенциалов. Аналитическим сигналом нам служила высота катодного пика восстановления AuНЧ, рассчитываемая по получен-

ной ВАГ ($\Delta H = H_{\text{сигнал}} - H_{\text{фон}}$) с использованием программы GPES к потенциостату «Autolab».

Результаты и их обсуждение

Было исследовано влияние температуры и времени инкубации на интенсивность сигнала, получаемого от АНЧ. На рис. 1 показан график зависимости величины сигнала от температуры и времени инкубации.

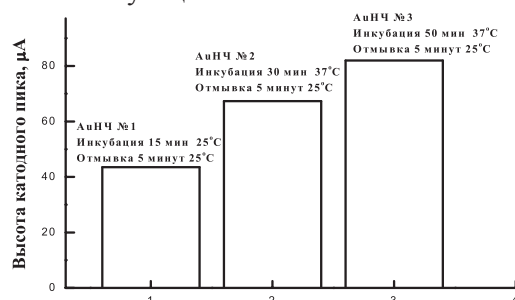


Рис. 1. Зависимость высоты катодного пика восстановления АНЧ с разным временем термообработки: 1) АНЧ №1 инкубация $t=15$ мин. 25°C отмывка $t=5$ мин. 25°C 2) АНЧ №2 инкубация $t=15$ мин. 37°C отмывка $t=5$ мин. 25°C 3) АНЧ №3 инкубация $t=45$ мин. 37°C отмывка $t=5$ мин. 25°C .

С увеличением температуры и времени инкубации электрохимический сигнал от АНЧ увеличивается. С целью установления оптимального времени электронанесения и объема ДДАБ был проведен следующий эксперимент: были взяты электроды с разным временем электронанесения (180 с и 600 с) и разным объемом ДДАБ (1 мкл и 2 мкл) (рис. 2).

Как видно из представленного рисунка, электрохимический сигнал, получаемый от АНЧ с 1 мкл, больше, чем для 2 мкл. Это связано с тем, что поверхностно-активные вещества снижают интенсивность сигнала АНЧ при измерении методом ИВА. Было рассчитано относительное стандартное отклонение (ОСО) для АНЧ с разным

временем электронанесения. Величина ОСО для АНЧ, полученных со временем электронанесения 180 с, составила 10%, а для 600 с – 15%. По этим данным были выбраны оптимальными условия получения электродов с АНЧ: время электролиза 180 с, время инкубации – 50 мин. при температуре 37°C , объем ДДАБ – 1 мкл.

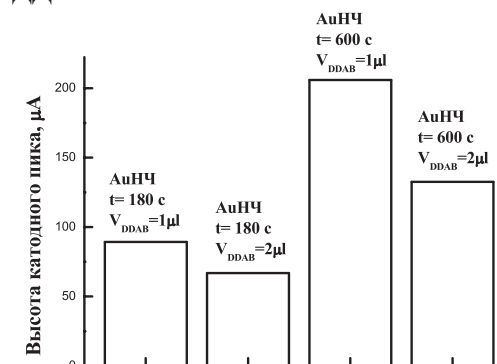


Рис. 2. Зависимость высоты катодного пика восстановления АНЧ при различных модификациях электродов АНЧ, полученных в ходе электролиза.

Метод инверсионной вольтамперометрии основан на катодном электрохимическом растворении определяемого вещества после предварительного концентрирования. Избирательное связывание тропонина I обеспечивалось с помощью Ат, иммобилизованных на электрод. На рис. 3 показан график зависимости концентрации тропонина I для

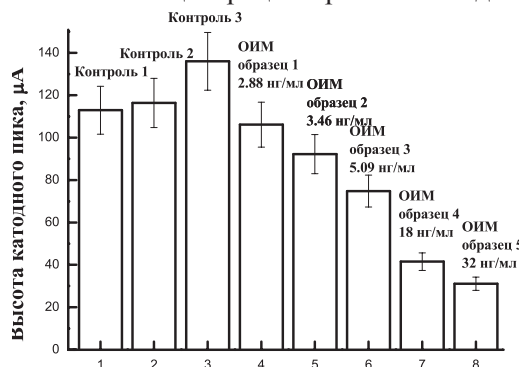


Рис. 3. Концентрационная зависимость тропонина I для здоровых доноров и доноров с ОИМ.

здоровых доноров и доноров больных ОИМ. Как видно из представленного рисунка, образцы плазмы крови больных доноров ОИМ и образцы плазмы крови здоровых доноров достоверно различаются между собой, также наблюдается концентрационная зависимость: чем больше белка в плазме крови, тем интенсивность сигнала, получаемая от АНЧ, меньше.

Заключение

Были разработаны условия получения нанопокртия АНЧ и электрохимический метод определения электроактивного белка на примере тропонина I. Интенсивность сигнала АНЧ, регистрируемая методом ИВА, зависит от концентрации тропонина I в плазме крови. Диапазон достоверно определяемых концентраций тропонина I составляет 3,46 – 32 нг/мл (0.14 pM – 134 pM).

Sensing device based on gold nanoparticles for detection of cardiac biomarkers

A.A. Shumkov, E.V. Suprun, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov

We developed electrochemical method for the determination of cardiac markers troponin I in blood plasma. This approach based on registration of gold nanoparticles on the electrode surface by means of cathodic stripping voltammetry. Electrode surface was modified with antibodies to cardiac troponin I. Sensitivity of proposed method corresponds to 3.46 ng / ml - 32 ng / ml (147 pM – 1.36 nM).

Key words: cardiac markers, stripping voltammetry, gold nanoparticles, troponin I, antibodies.

Список литературы

1. Будников Г.К. Химический анализ в медицинской диагностике // М. – Наука. 2010.
2. Дементьева И.И. и др. Сердечный белок, связывающий жирные кислоты, в оценке повреждений миокарда в кардиологии и кардиохирургии // Врач скорой помощи, 2010. 1. Р. 53-58.
3. Mahmarian J.J. The troponin conundrum: clarification through stress myocardial perfusion SPECT// J Nucl Cardiol. 2007. 14(1). Р. 6-8.
4. McDonnell B. et al. Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing// Clin Biochem. 2009. 42(7-8). Р. 549-61.
5. Suprun E. et al. Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma// Biosens Bioelectron. 2010. 25(7). Р. 1694-8.



Особенности гистологического строения кожных покровов и молочной железы безволосых крыс

Г.И. Блохин¹, Д.А. Беляев¹, М.М. Пекелис¹, Е.М. Губская¹, Л.Х. Казакова²

¹ – РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская обл.

Контактная информация: Казакова Лилия Хыдыркулиевна scolt@mail.ru

В статье охарактеризованы некоторые особенности строения кожного покрова и молочных желез безволосых крыс в сравнении с крысами с нормальным волосным покровом и помесными крысами. Выявлены вероятные причины неспособности безволосых крыс к выкармливанию потомства.

Ключевые слова: безволосые крысы, кожный покров, молочная железа, лактация.

Крысы широко используются как биомодели в лабораторной и биомедицинской практике с 1856 г. [1]. В конце XX века появились мутации с неразвитым волосным покровом (hairless и nude). При ведении линий, несущих эти мутации, было замечено, что самки-гомозиготы не способны к выкармливанию потомства. Однако гистологических исследований, объясняющих этот феномен, не проводилось [5]. Поскольку и эпидермис кожи, и молочные железы образуются в процессе онтогенеза из эктодермы [3], мы предположили, что недоразвитие кожных покровов повлекло за собой недоразвитие и молочных желез.

Целью данной работы было изучить различия в гистологическом строении кожного покрова и молочных желез крыс с различным развитым волосным покровом.

Материалы и методы

Крысы находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Содержались в клетках типа Т-3 при световом цикле 12:12, получали комбикорм для хомяков, крыс и мышей производства ООО «Лабораторкорм». Вода была в свободном доступе.

Были сформированы три группы животных в возрасте 24 недели:

Группа 1 (контрольная) – нелинейные крысы с нормально развитым шерстным покровом, опытная группа 2 – безволосые крысы и опытная группа 3 – гибриды F1 между крысами из групп 1 и 2 с промежуточным состоянием волосного покрова. Изучали гистологическое строение кожи с лопаточной области и молочных желез на 2-5 день лактации.

Микропрепараты кожи исследовали качественно (состояние и развитие сальных и потовых желез, состояние и рас-

положение волосных фолликулов). Измеряли следующие параметры: толщина эпидермиса, дермы и подкожно-жировой клетчатки, диаметр фолликулов, число фолликулов в группе, число фолликулов в поле зрения, плотность фолликулов. Срезы молочных желез исследовали качественно: отмечали степень развития железы, ее протоков, состояние альвеол и секретирующего эпителия.

Результаты и их обсуждение

Измерение слоев кожи (эпидермис, дерма и подкожно-жировая клетчатка) показали, что более толстую кожу имели крысы с нормальным волосным покровом ($94,9 \pm 2,04$ мкм), у помесных крыс толщина кожи составляла $73,6 \pm 3,82$ мкм, у безволосых крыс – $72,4 \pm 1,55$ мкм. Крысы с нормальным волосным покровом обладали более толстой дермой ($92,4 \pm 2,04$ мкм), хотя эпидермис самым толстым оказался у помесей ($3,0 \pm 0,14$ мкм). При этом кожа была достоверно толще у крыс с нормальным волосным покровом относительно помесных крыс на 28,0%, а безволосых крыс – на 31,0% ($P \leq 0,99$ и $P \leq 0,999$ соответственно). Между гибридами и безволосыми крысами разница в толщине кожи не была достоверной, хотя у гибридов толщина кожи была немного больше (рис.1).

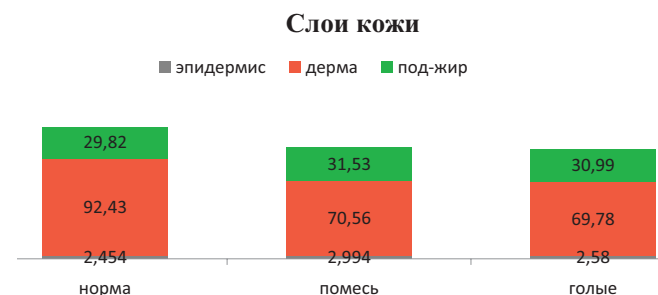


Рис. 1. Толщина слоев кожи

Дерма у крыс с нормальным волосным покровом также была достоверно толще на 31,0%, чем у помесных крыс, и на 32,5% толще, чем у безволосых ($P \leq 0,99$ и $P \leq 0,999$ соответственно).

У помесных крыс эпидермис был достоверно толще, чем у крыс с нормальным волосным покровом на 22,0% ($P \leq 0,95$), и на 16,0% толще, чем у безволосых крыс ($P \leq 0,9$). В целом, толщина кожи крыс с нормальным волосным покровом довольно сходна с толщиной кожи диких серых крыс (*Rattus norvegicus*), но все же тоньше, чем у них (Соколов, 1973).

По толщине подкожно-жировой клетчатки достоверных различий между группами не обнаружено.

Было также произведено измерение фолликула (волоса). Измерения показали, что самым толстым волосом обладают крысы с нормальным волосным покровом ($6,2 \pm 0,2$), гибриды имеют более тонкий волос ($2,6 \pm 0,08$), а самыми тонкими волосами обладают безволосые крысы ($4,5 \pm 0,12$). Разница достоверна ($P \leq 0,99$).

По мере уменьшения развитости шерстного покрова у крыс наблюдаются следующие явления: в контрольной группе фолликулы расположены в упорядоченных вытянутых группах, группы располагаются цепочкой, каждой волосной фолликул окружен сальной железой, в целом фолликулы мелкие. У гибридов появляется тенденция к увеличению фолликулов и потере упорядоченности групп – фолликулов в группе меньше на 20,0%, чем у крыс с нормальным волосным покровом ($P \leq 0,9$), и больше, чем у безволосых в 2,4 раза ($P \leq 0,999$).

Также у безволосых крыс было достоверно меньше

фолликулов в поле зрения, чем у крыс с нормальным волосным покровом и у помесных (в 2,2 и 2,0 раза соответственно $P \leq 0,999$).

У безволосых заметно снижена плотность расположения фолликулов в поле зрения, отдельные группы не упорядочены, фолликулы расположены в округлых группах, число фолликулов в группе ниже, волос развивается не из всех фолликулов, большинство фолликулов не имеют волоса, но имеют гипертрофированную сальную железу. Также у них фолликулы залегают более поверхностно. Еще одной особенностью было отсутствие у безволосых крыс потовых желез. В целом, волосы крыс с нормальным волосным покровом имеют строение, характерное для крыс в целом [2], волосы помесных крыс и, особенно, безволосых имеют строение, нехарактерное для диких животных. Схожие результаты получены при сравнении строения кожи безволосых крыс линии Wistar с крысами линии Wistar с нормальной шерстью [6].

Изучение молочных желез показало следующие результаты: общий размер железы больше у крыс с нормальным волосным покровом, средний – у помесных крыс, и меньше всего молочная железа развита у безволосых крыс. Сосок возвышается над кожей у нормы и помеси, не возвышается – у безволосых крыс. Железистый эпителий был нормально развит у крыс с нормальным волосным покровом, альвеолы активно секретировали молоко. У помесных крыс железистый эпителий был менее развит, равно как и вся молочная железа в целом. Железы безволосых крыс были развиты хуже всего, эпителий практически не развит, клетки не лактировали, и у безволосых крыс наблюдалось состояние молочных желез,

абсолютно не соответствующее срокам лактации.

Выводы

Результаты исследования показали следующую картину: крысы с нормальным волосным покровом имеют развитые молочные железы, соответствующие сроку лактации; у помесей лактация несколько ослаблена по сравнению с нормой, есть тенденция к ее более раннему окончанию (на более поздних сроках лактация слабее, чем у нормы при таком сроке); у безволосых крыс молочные железы недоразвиты – при нормально сформированном соске у них очень слабо развит железистый эпителий, наблюдается несоответствие развития железы сроку лактации, ставится под вопрос возможность этих крыс выкармливать потомство.

Список литературы

1. **Котенкова Е.** Мыши и крысы. Компания Дельта. М. 2000. 62 с.
2. **Ноздрачев А., Поляков Е.** Анатомия крысы (Лабораторные животные). СПб., Изд. «Лань». 2001. 464 с.
3. **Ромер А., Парсонс Т.** Анатомия позвоночных. т.1-2. М. Мир. 1992.
4. **Соколов В.,** Кожный покров млекопитающих. М. Наука. 1973. 487 с.
5. **Festing M.F.W., Lovell D.P.** The breeding of athymic nude rats// Animal Quality and Models in Biomedical Research, 7th ICLAS Symposium Utrecht 1979, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York. 1980. P. 81-84.
6. **Ishii Y. et al.** Hair follicles of young Wistar strain hairless rats: a histological study// J. Anat. 191. 1997. P. 99-106.

Peculiarities of histological structure of cutaneous covering and milk gland of hairless rats

G.I. Blokhin, D.A. Belyaev, M.M. Pekelis, E.M. Gubskaya, L.Kh. Kazakova

Some differences of histological structure of cutaneous covering and milk gland of hairless rats from the same of rats with normal hair and mixed bred rats are described in this article. Probable causes of hairless rats' inability to rear their offspring are revealed.

Key words: hairless rats, cutaneous covering, milk gland, lactation.

Внедрение гнотобиотехнологии для создания лабораторных животных СПФ-статуса

Л.А. Болотских, Н.Н. Каркищенко, И.Ю. Егорова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: к.с.-х.н. Болотских Любовь Александровна тел.: (495)561-52-57

Внедрена технология получения и выращивания лабораторных животных СПФ-статуса в изоляторной системе. Усовершенствованные методические приемы могут быть успешно использованы в лабораторном животноводстве для очистки конвенциональных животных от патогенной микрофлоры и перевода их в СПФ-статус.

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

Достижение современного уровня медикобиологических исследований стало возможным благодаря созданию стандартных лабораторных животных. Стандартизация животных основана на исключении возможности возникновения инфекционной и инвазионной патологии. Лабораторные животные, свободные от патогенной микрофлоры, т.е. животные СПФ-статуса, наряду с их генетической однородностью обеспечивают надежность и воспроизводимость результатов медико-биологических экспериментов [4]. В соответствии с международным опытом, стандартность лабораторных животных обеспечивается

современной технологией, в основе которой лежит гнотобиотехнология. Она гарантирует надежность защиты лабораторных животных от любых видов внешней контаминации, создает адекватные условия для жизнедеятельности, широко используется для получения и содержания гнотобиотехнологических животных с заданным и управляемым составом микрофлоры. В последнее время гнотобиотехнология интенсивно используется также для получения и содержания животных СПФ-категории (племенные ядра, маточное поголовье животных, предназначенных для использования в эксперименте) [1-3, 5-8].

С развитием гнотобиотехнологии вырисовываются дальнейшие перспективы совершенствования исследований, проводимых на стандартных, качественных животных в самых различных областях биологической науки.

Целью нашей работы было внедрение технологии получения и выращивания племенных ядер мышей СПФ-статуса коллекционного фонда НЦБМТ РАМН с использованием новой современной изоляторной системы.

Материалы и методы

В работе использовались конвенциональные мыши коллекционного фонда: BALB/c, C57BL/6, DBA/2, CDA/Lac, AKR, BRSUNT, C57BL/10, A/sn, WR, B10GFP. В качестве самок-кормилиц использовали мышей СПФ-статуса линии BALB/c-wal и гибриды (DBA/2 x BALB/c).

Очистка мышей коллекционного фонда от патогенной микрофлоры проводилась усовершенствованным методом гистерэктомии. Животные получали стерильный гранулированный корм и белково-витаминную добавку.

Работа проводилась на новом зарубежном и отечественном оборудовании: изоляторная система «RAIR», английский изолятор «TCOL», ламинар – С-1,2, стерилизатор воздушный ГП-640-ПЗ, автоклавы ГК-100-3М и т.д.

Основой гнотобиологической аппаратуры была приобретенная современная зарубежная изоляторная вентилируемая система «RAIR» (рис.1).

Данная изоляторная система содержания лабораторных животных обеспечивает защиту не только самих лабораторных животных, но и обслуживающего их персонала. Специальные воздушные клапаны очищают воздух, обеспечивая

комфортную температуру и влажность для животных. Специальные датчики постоянно следят за состоянием клеток микро-изоляторов, отображая их условия на табло, что существенно упрощает обслуживание клеток. Изоляторная система состоит из 144 клеток микро-изоляторов.



Рис. 1. Изоляторная вентилируемая система «RAIR»

Разработка технологии получения и выращивания СПФ племенных ядер мышей коллекционного фонда

Изоляторная система «RAIR» использовалась нами для перевода конвенциональных мышей коллекционного фонда в СПФ-категорию. В основу работы положен гнотобиологический подход, т.к. каждая клетка этой системы представляет собой микро-изолятор.

Новое оборудование позволило усовершенствовать методические приемы получения стерильного потомства племенных ядер мышей, которое является исходным материалом для перевода их в СПФ-статус.

Данная изоляторная система может использоваться только в комплексе с ламинаром, т.к. смена клеток, раздача корма, воды и т.д. производится только в стерильных условиях (рис.2).



Рис. 2. Ламинар

Отработаны режимы стерилизации всех необходимых материалов для жизнеобеспечения животных. Стерилизацию клеток, опилок и т.д. осуществляли в воздушных стерилизаторах при соответствующих режимах.

Установлено, что во избежание случайной контаминации, работу по обслуживанию животных в микро-изоляторах в ламинаре надежнее проводить двум сотрудникам. Обслуживающий персонал работает с клетками микро-изоляторами в масках и стерильных перчатках.

Успех в работе во многом зависит от подготовки специалистов и их добросовестности.

Для содержания самок-кормилиц СПФ-статуса был приобретен новый английский гнотобиологический изолятор как самая надежная барьерная система. Вся работа осуществлялась согласно правилам работы с гнотобиологическим изолятором. Были использованы ранее разработанные жесткие режимы стерилизации корма, воды, подстилочного материала и т.д. Все необходимые стерильные материалы проводились в гнотобиологический изолятор в специальных контейнерах (рис.3).

Регулярно проводился микробиологический контроль животных. По

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



Рис. 3. Гнотобиологический изолятор

Результаты и их обсуждение

Впервые в НЦБМТ РАМН внедрена технология получения и выращивания лабораторных животных СПФ-статуса в изоляторной системе. В настоящее время от патогенной микрофлоры освобождены 10 основных линий мышей коллекционного фонда: BALB/c, C57BL/6, DBA/2, 101/H, CBA/J, C57BL/10, A/sn, WR, B10.GFP. Состояние животных хорошее. По росту и плодовитости опережают конвенциональных животных.

Выводы

Подводя итоги, можно заключить, что гнотобиотехнология представляет наилучший способ развития базовой линии СПФ-лабораторных животных. Для этой цели необходимо прежде всего иметь современное оборудование, отработанную гнотобиологическую технологию и хорошо обученный персонал.

Следует отметить, что разработанная технология создания лабораторных животных СПФ-статуса, в отсутствии

помещений со строгой барьерной системой, позволяет производить качественных лабораторных животных, а также проводить эксперименты на стандартных контролируемых по микробному фактору животных и может быть использована в любом научном учреждении.

Список литературы

1. **Абдрашитова Э.Х., Березовская И.В., Болотских Л.А. и др.** Гнотобиология для содержания лабораторных животных и выполнения экспериментов / В кн.: Лабораторные животные. М.: Межакадемическое изд-во ВПК. 2003. С. 67-70. 138 с.
2. **Болотских Л.А., Лушникова З.С.** Усовершенствованный способ получения гнотобиотических животных // Биомедицина. 2005. № 1. С. 114-115.
3. **Болотских Л.А., Подопригора Г.И.** Разработка и использование гнотобиологических методов в лаборатор-

ном животноводстве / В сб.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: 1987. 23 с.

4. **Душкин В.А., Интизаров М.М. и др.** Теоретические и практические основы гнотобиологии. М.: Колос. 1983. С. 3-11.

5. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. М.: Изд-во ВПК. 2007. 448 с.

6. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое изд-во ВПК. 2004. 607с.

7. **Подопригора Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А. и др.** Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс и морских свинок. Вестник АМН. 1981. № 12. С. 54-58.

8. 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.

Gnotobiotic introduction for creation of laboratory SPF-animals

L.A. Bolotskykh, N.N. Karkischenko, I.Uj. Egorova

The technology of reception and cultivation of laboratory SPF-status animals in isolator system is introduced. Advanced methodical receptions can be successfully used in laboratory animal industries for clearing of conventional animals of pathogenic microflora and their transfer in the SPF-status.

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

Особенности гемореологического статуса у крыс с наследственным гипоталамическим несахарным диабетом (линия Brattleboro)

М.Б. Плотников, А.С. Васильев, О.И. Алиев

НИИ фармакологии СО РАМН, Томск

Контактная информация: профессор Плотников Марк Борисович oal@pharm.tsu.ru

Исследованы гемореологические показатели у крыс с наследственным гипоталамическим несахарным диабетом (линия Brattleboro). В сравнении с крысами Вистар у крыс линии Brattleboro значения вязкости цельной крови, вязкости плазмы, агрегации эритроцитов, концентрации фибриногена, гематокрита были повышены, а деформируемость эритроцитов и показатель доставки кислорода к тканям снижены.

Ключевые слова: гемореологические показатели, несахарный диабет, крысы линии Brattleboro.

Несахарный диабет – сложное по патогенезу эндокринное заболевание, основным симптомом которого является полиурия [1]. Вне зависимости от этиологии, полиурия приводит к сгущению крови [1], что должно отражаться в нарушении реологических свойств крови. Однако вопрос о состоянии реологических свойств крови у больных несахарным диабетом остается полностью неизученным. Вместе с тем, существует линия крыс *Brattleboro*, воспроизводящая основные патогенетические факторы наследственного гипоталамического несахарного диабета (diabetes insipidus) [15, 19].

Целью нашей работы явилось исследование гемореологического статуса у крыс линии *Brattleboro* в сравнении с гемореологическими показателями крыс линии *Wistar*.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 8 крысах-самцах линии *Brattleboro* и 8 крысах-самцах линии *Wistar* массой

200–250 г. Крысы линии *Brattleboro* были получены из НИИ цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, крысы *Wistar* – из лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск. Экспериментальные животные по микробиологическому статусу относятся к конвенциональным, содержались по 8 особей в поликарбонатных клетках (Тип 825 см²) на стандартном рационе вивария. Кровь забирали под эфирным наркозом из общей сонной артерии. В качестве стабилизатора использовали 3,8% раствор натрия цитрата в соотношении с кровью 1:9. Относительную вязкость цельной крови и плазмы определяли на ротационном вискозиметре АКР-2, гематокрит оценивали методом центрифугирования в стеклянных капиллярах (центрифуга РС-6, 2000 об/мин. 15 мин.), содержание фибриногена измеряли фотометрическим методом по Klausс на гемокоагулометре Cormay KG-4. Спонтанную агрегацию эритроцитов исследовали методом силлектометрии на модифицированном микроколориметре МКМФ-1 с графиче-

ской регистрацией на графопостроителе Н306 [9] и рассчитывали $T_{1/2}$ (полупериод агрегации эритроцитов) – время, за которое величина исходного фотометрического сигнала снижается в два раза. Деформируемость эритроцитов изучали методом эктацитометрии на скоростях сдвига 90, 180, 360 и 890 с⁻¹ [10]; показатель оценивали по индексу деформируемости эритроцитов (ИДЭ), рассчитываемому как отношение (L-H)/(L+H), где L и H – соответственно больший и меньший диаметры первого дифракционного максимума. Индекс доставки кислорода к тканям определяли как отношение гематокрита к вязкости крови [17]. Эксперименты на животных проводили передозировкой диэтилового эфира для наркоза.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica for Windows 6.0».

Таблица 1
Вязкость крови (мПа•с) при различных скоростях сдвига (3–300 с⁻¹) у крыс линии *Wistar* и крыс линии *Brattleboro*

Серии опытов	3 с-1	5 с-1	7 с-1	10 с-1	100 с-1	300 с-1
Крысы <i>Wistar</i> (n=8)	6,6±0,2	6,3±0,2	6,1±0,2	5,8±0,2	3,9±0,1	3,6±0,1
Крысы <i>Brattleboro</i> (n=8)	10,1±0,2*	8,6±0,2*	8,0±0,1*	7,6±0,1*	5,1±0,1*	4,5±0,1*

Примечание (здесь и в табл. 2 и 3): * - p<0,05 в сравнении с крысами линии *Wistar*

Таблица 2
Вязкость плазмы (ВП, мПа•с), полупериод агрегации эритроцитов (T1/2, с), гематокрит (Hct, %), концентрация фибриногена (Fb, г/л), индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ, усл. ед.) при различных скоростях сдвига у крыс линии *Wistar* и крыс линии *Brattleboro*

Серии опытов	ВП	T1/2	Hct	Fb	ИДЭ			
					90 с-1	180 с-1	350 с-1	890 с-1
Крысы <i>Wistar</i> (n=8)	1,4±0,1	10,1±0,5	45±1	2,15±12	0,128±0,010	0,250±0,016	0,384±0,018	0,535±0,019
Крысы <i>Brattleboro</i> (n=8)	1,7±0,1*	5,9±0,3*	49±1*	3,25±26*	0,122±0,010	0,209±0,0012	0,309±0,026*	0,420±0,014*

У крыс линии *Brattleboro* индекс доставки кислорода к тканям во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига

Рассчитывали среднее значение, ошибку среднего значения. Межгрупповые различия оценивали с помощью *t* – критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна–Уитни (*U* тест). Для определения взаимосвязи между исследуемыми показателями использовали метод ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение

У крыс линии *Brattleboro* в сравнении с крысами линии *Wistar* вязкость крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига (3–300 с⁻¹) была повышена на 25–53%, вязкость плазмы – на 20%, агрегация эритроцитов – на 38%, концентрация фибриногена – на 51%, показатель гематокрита – на 7%, деформируемость эритроцитов при скоростях сдвига 90–890 с⁻¹ была ниже на 5–21% (табл. 1, 2).

Таблица 1

Таблица 2

был ниже на 13–28% в сравнении со значениями этого показателя у крыс линии *Wistar* (табл. 3).

Таблица 3

Индекс доставки кислорода к тканям при различных скоростях сдвига (3–300 с-1) у крыс линии *Wistar* и крыс линии *Brattleboro*

Серии опытов	3 с-1	5 с-1	7 с-1	10 с-1	100 с-1	300 с-1
Крысы <i>Wistar</i> (n=8)	6,8±0,1	7,1±0,1	7,4±0,2	7,8±0,2	11,5±0,2	12,5±0,2
Крысы <i>Brattleboro</i> (n=8)	4,9±0,1*	5,7±0,1*	6,1±0,1*	6,4±0,1*	9,6±0,2*	10,9±0,2*

Гемореологический профиль у крыс линии *Brattleboro* значительно отличается от такового у крыс линии *Wistar*. У крыс линии *Brattleboro* выявлены высокие значения вязкости крови в широком диапазоне скоростей сдвига, даже превосходящие аналогичные показатели у спонтанно гипертензивных крыс (линия *SHR*) и крыс линии *Wistar* с моделями сердечно-сосудистых расстройств – острая ишемия головного мозга и инфаркт миокарда [7, 8, 14].

Вязкость крови – интегральный показатель, который определяется как макрореологическими параметрами (гематокрит, вязкость плазмы), так и микрореологическими параметрами (агрегация и деформируемость эритроцитов) [5]. При анализе макрореологических показателей у крыс линии *Brattleboro* обращает на себя внимание значительное повышение гематокрита, что обусловлено гемоконцентрацией и является следствием полиурии [1]. Возрастание гематокрита закономерно приводит к повышению вязкости крови, причем зависимость эта носит не прямопропорциональный, а экспоненциальный характер [4]. С точки зрения гемодинамики, оптимальными считаются значения гематокрита 43–45%, при которых происходит максимальная доставка кислорода к органам (судя по pO_2 в тканях). Дальнейшее возрастание гематокрита сопровождается снижением доставки кислорода к тканям и уменьшением pO_2 ,

то есть состоянием тканевой гипоксии [5]. Очевидно, этот феномен может проявляться у крыс линии *Brattleboro*, у которых при значении гематокрита 49% настолько повышается вязкость крови, что это приводит к резкому снижению индекса доставки кислорода к тканям.

У крыс линии *Brattleboro* выявлены отчетливые нарушения микрореологических показателей – агрегации и деформируемости эритроцитов. Значения этих показателей во многом определяются состоянием мембран эритроцитов и активностью мембраносвязанных ферментов, ответственных за поддержание ионного гомеостаза клеток [2, 6, 11, 13]. В основе патогенеза НГНД лежит нарушение выработки антидиуретического гормона – вазопрессина [1]. При недостатке вазопрессина нарушается обмен воды и электролитов, что может играть существенную роль в формировании нарушений ионного гомеостаза эритроцитов. При дефиците вазопрессина наблюдается гипернатриемия, гиперосмолярность плазмы, гипокалиемия [16] и нарушение обмена ионов натрия и калия в эритроцитах [12, 18]. Известно, что нарушения ионного гомеостаза эритроцитов может приводить к изменению морфо-функционального состояния красных клеток крови с появлением в сосудистом русле эритроцитов с патологически измененными формами, склонных к повышенной агрегационной активности и, одновременно, снижен-

ной деформируемости [4, 5, 6]. Повышенной агрегации эритроцитов может также способствовать возрастание в плазме крови содержания фибриногена, концентрация которого у крыс линии *Brattleboro* в 1,5 раза превосходит таковую у крыс линии *Wistar*. Фибриноген обладает большой молекулярной массой, выраженной асимметричностью молекулы и играет активную роль в процессе агрегации эритроцитов по мостиковому механизму [4, 5].

При сравнительном анализе гемореологических показателей у крыс линии *Brattleboro* и крыс линии *Wistar* возникает вопрос: являются ли особенности гемореологического статуса крыс *Brattleboro* отражением специфических биологических характеристик животных этой линии, или же у крыс линии *Brattleboro* формируется синдром повышенной вязкости крови (СПВК) как патологическое состояние? На этот вопрос позволяет ответить анализ корреляционных взаимосвязей гемореологических параметров.

Корреляционный анализ обнаружил у крыс линии *Wistar* наличие множественных взаимосвязей: отрицательная корреляция выявлена между вязкостью крови на высоких скоростях сдвига ($100\text{--}300\text{ с}^{-1}$) и деформируемостью эритроцитов ($r = -0,856$; $p < 0,05$), полупериодом агрегации эритроцитов и гематокритом ($r = -0,789$; $p < 0,05$), полупериодом агрегации эритроцитов и уровнем фибриногена в плазме крови ($r = -0,937$; $p < 0,05$); отрицательная корреляция средней степени выявлена между вязкостью крови при низких скоростях сдвига ($3\text{--}10\text{ с}^{-1}$) с полупериодом агрегации эритроцитов ($r = -0,656$; $p < 0,05$) (рис. 1). Кроме этого, установлена положительная корреляция вязкости крови с концентрацией фибри-

ногена в плазме ($r = 0,856$; $p < 0,05$) и гематокритом ($r = 0,726$; $p < 0,05$). У крыс линии *Brattleboro* утрачивалась взаимосвязь вязкости крови с макрореологическими параметрами (гематокритом, вязкостью плазмы и концентрацией фибриногена), однако сохранялась лишь взаимосвязь между вязкостью крови на скорости сдвига 300 с^{-1} и деформируемостью эритроцитов на высоких скоростях сдвига ($r = -0,81\text{--}0,88$; $p < 0,05$).

Следовательно, у крыс линии *Brattleboro* при генетически детерминированном НГНД отсутствует взаимосвязь процессов регуляции и согласованности элементов функциональных систем реологии крови. Очевидно, отсутствие корреляционных взаимосвязей между гемореологическими параметрами у крыс линии *Brattleboro* свидетельствует о предельном случае состояния дисрегуляции, при котором адаптация невозможна, и ведущими становятся деструктивные процессы [3].

На основании полученных данных и выявленных корреляций можно сделать вывод, что наличие синдрома повышенной вязкости крови у крыс линии *Brattleboro* является не биологической особенностью данной линии животных, а именно патологическим состоянием, формирующимся за счет изменения макрореологических и микрореологических параметров.

Выводы

1. Гемореологические параметры у крыс линии *Brattleboro* значительно отличаются от таковых показателей у крыс линии *Wistar*, что выражается в повышенных значениях вязкости крови и плазмы, агрегации эритроцитов, гематокрита, концентрации фибрино-

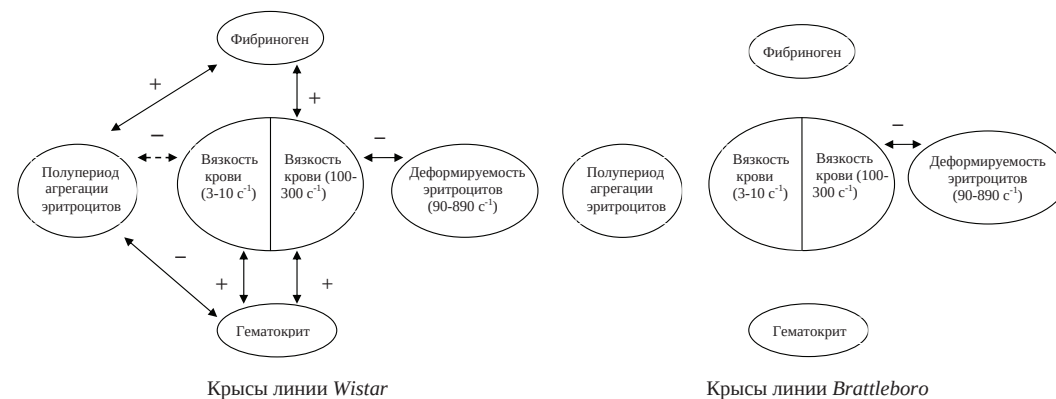


Рис. Корреляционные связи между гемореологическими параметрами у крыс линии *Wistar* и у крыс линии *Brattleboro*.

↔ – высокая степень корреляционной связи, – средняя степень корреляционной связи.

гена и характеризуется сниженным индексом деформируемости эритроцитов и уменьшением индекса доставки кислорода к тканям.

2. У крыс линии *Brattleboro* нарушены корреляции между основными гемореологическими параметрами, что характеризует формирование у крыс этой линии синдрома повышенной вязкости крови.

Список литературы

1. Алёшин Б.В., Генес И.Г., Возгралик В.Г. Руководство по эндокринологии. М.: Медицина. 1973. 512 с.
2. Габриэлян Э.С., Акопов С.Э. Клетки крови и кровообращение. Ереван. 1985. 399 с.
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Удуг В.В. и др. Структурная организация систем жизнеобеспечения в норме и при развитии патологического процесса. Томск. 1997. 304 с.
4. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрин И.Х. Реология крови. М.: Медицина. 1982. 272 с.
5. Муравьев А.В., Чоноров С.В. Гемореология (экспериментальные и

клинические аспекты реологии крови). Ярославль: Изд-во ЯГПУ. 2009. 178 с.

6. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во ТГУ. 2004. 202 с.

7. Плотников М.Б., Алиев О.И., Колтунов А.А., Маслов М.Ю. Синдром повышенной вязкости крови у крыс линии SHR: анализ адекватной модели // Бюл. экспер. биол. и медицины. 1998. № 8. С. 150-152.

8. Плотников М.Б., Колтунов А.А., Алиев О.И. Моделирование синдрома повышенной вязкости крови у крыс: оценка взаимосвязи гемореологических показателей и их информативности при ишемии мозга // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1996. № 9. С. 274-275.

9. Плотников М.Б., Алиев О.И., Попель Ф.В. Модификация микроколориметра МКМФ-1 для регистрации агрегации эритроцитов // Клини. лаб. диагностика. 1995. № 3. С. 457-458.

10. Bessis M., Mohandas N. A diffractometric method for the measurement of cellular deformability // Blood Cells. 1975. Vol. 1. P. 307-313.

11. De Franceschi L., Villa-Moruz-

zi E., Fumagalli L., Brugnara C., Tur-rini F. et al. K-Cl cotransport modulation by intracellular Mg in erythrocytes from mice bred for low and high Mg levels. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2001. Vol. 281. P. 1385-1395.

12. Doczi T., Joo F., Szerdahelyi P., Bodosi M. Regulation of brain water and electrolyte con-tents: the opposite actions of central vasopressin and atrial natriuretic factor (ANF) // Acta Neurochir Suppl (Wien). 1988. Vol. 43. P. 186-188.

13. Liu F., Mizukami H., Sarnaik S. Calciumdependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy // J. Struct. Biol. 2005. Vol. 150. P. 200-210.

14. Plotnikov M.B., Aliev O.I., Maslov M.Ju., Vasiliev A.S. and Tjukavkina N.A. Correction of Haemorheological Disturbances in Myocardial Infarction by Diquertin and Ascorbic Acid // Phytother. Res. 2003. Vol. 17. P. 86-88.

15. Schmale H., Richter D. Single

base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. // Nature. 1984. Vol. 308(5961). P. 705-709.

16. Somova L.; Ivanova E.; Zaharieva S.; Kirilov G.; Popov P. Water-electrolyte balance and hypothalamopituitary-adrenocortical function in rats with inherited diabetes insipidus (Brattleboro strain) // Acta Physiol. Pharmacol. Bulg. 1985. Vol. 11(4) P. 63-68.

17. Stoltz J.E., Donner M. New trends in clinical hemorheology: an introduction to the concept of the hemorheological profile // Schweiz. Med. Wochenschr. 1991. Vol. 121, Suppl. P. 41-49.

18. Talib H.K., Zicha J. Red cell sodium in DOCA-salt hypertension: a Brattleboro study. // Life Sci. 1992. Vol. 50(14). P. 1021-1030.

19. Valtin H., Schroeder H.A. Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain) // Am. J. Physiol. 1964. Vol. 206. P. 425-430.

The hemorheological status in rats with familial hypothalamic diabetes insipidus (brattleboro strain)

M.B. Plotnikov, A.S. Vasil'ev, O.I. Aliev

The hemorheological indices in rats with familial hypothalamic diabetes insipidus (Brattleboro strain) were investigated. The whole blood viscosity, plasma viscosity, aggregation of erythrocytes, fibrinogen concentration, hematocrit rate were increased and deformability of erythrocytes and blood's overall oxygen transport capacity were decreased in Brattleboro rats in comparison with Wistar rats.

Key words: hemorheology, diabetes insipidus, Brattleboro rats.



Иммуномодулирующие свойства композиции фенотропила и глутаминовой кислоты

И.Н. Тюренков¹, М.А. Самотруева², Н.Н. Гражданцева², Е.Б. Хлебцова², В.М. Берестовицкая³, О.С. Васильева³

¹ – Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

² – Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань

³ – Российский государственный педагогический университет, Санкт-Петербург

Контактная информация: Самотруева Марина Александровна ms1506@mail.ru

В данной работе проводили экспериментальное изучение иммунокорригирующих свойств композиции «фенотропил + L-глутаминовая кислота» (РГПУ-158) на моделях циклофосфамидной иммунодепрессии и ЛПС-индуцированного иммунного стресса. Установлено, что РГПУ-158 восстанавливает клеточное (индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа) и гуморальное (титр антиэритроцитарных антител) звенья иммунитета, а также лимфопротективные процессы в иммунокомпетентных органах.

Ключевые слова: фенотропил, L-глутаминовая кислота, композиция, иммунный стресс, иммунодепрессия, иммунокоррекция.

В связи с широким использованием нейротропных лекарственных средств в неврологической и психиатрической практике и подтверждением теории «вовлеченности» иммунных механизмов в развитие нейropsychической патологии (синдром хронической усталости, болезнь Альцгеймера, депрессия, эпилепсия и др.), стали актуальными фармакологические разработки, направленные на создание препаратов из группы аналогов нейромедиаторов, способных наряду с положительным влиянием на психоэмоциональный статус устранять еще и нарушения в иммунной системе [1, 2, 4].

В последние годы получены данные о влиянии ГАМК, ГОМК, глутаминовой кислоты на различные звенья иммуногенеза [3]. Так, нами ранее показано, что известные производные ГАМК – фенибут и фенотропил – проявляют иммунокорригирующие свойства, восстанавливая показатели клеточной, гуморальной иммунореактивности, а также фагоцитарного звена иммунного ответа в условиях экспериментальной иммунопатологии [5, 6]. В исследованиях А. Sali (1997) и С. Schubert (2009) установлено, что глутаминовая кислота также оказывает стимулирующее влияние на активность иммунной системы, увеличивая количе-

ство антителообразующих и розеткообразующих клеток в селезенке у лабораторных животных с иммунодепрессией [9, 10]. Учитывая способность производных ГАМК и глутаминовой кислоты устранять нарушения иммуногенеза, интерес представляют исследования, посвященные изучению иммуномодулирующей активности веществ, представляющих комбинацию известных аналогов нейрамино кислот, в сравнении с эталонными препаратами.

Целью настоящего исследования является сравнительная оценка иммуномодулирующего действия вещества, представляющего собой комбинацию «фенотропил + глутаминовая кислота» (химическое соединение под лабораторным шифром РГПУ-158) и исходных веществ.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 240 мышах линии СВА обоих полов 3-4-мес. возраста, содержащихся в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета и Астраханской государственной медицинской академии. Животных распределяли на группы по 8 особей для каждого эксперимента. Контролем 1 служили животные, получавшие 0,5 мл физ. раствора «плацебо». В качестве контроля 2 использовали животных с иммунной патологией: иммунная недостаточность смоделирована внутрибрюшинным введением циклофосфамида (ЦФА) в дозе 150 мг/кг; иммунный стресс – внутрибрюшинным введением липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa* в дозе 100 мкг/кг. Животные опытных групп (опыт № 1-3) получали однократно внутрибрюшинно фенотро-

пил (50 мг/кг), соединение РГПУ-158 (60 мг/кг) и L-глутаминовую кислоту (30 мг/кг) соответственно.

Сравнительное изучение влияния веществ на клеточное звено первичного иммунного ответа проводили на основе реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), на гуморальное звено – на основе реакции прямой геммагглютинации (РПГА), где в качестве антигена использовали эритроциты барана (ЭБ). Также определяли массу и клеточность иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки) с целью сравнительного изучения влияния РГПУ-158, фенотропила и L-глутаминовой кислоты на пролиферативные процессы в них [7].

При постановке РГЗТ иммунизацию проводили подкожным введением ЭБ в дозе 2×10^8 в 100 мкл физ. раствора (сенсibilизация), на 5-е сутки вводили под апоневротическую пластинку правой задней конечности разрешающую дозу – 108 ЭБ в 50 мкл физ. раствора («опытная» лапа), в левую лапку – 50 мкл физ. раствора («контрольная» лапа). Местную реакцию оценивали через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена и подсчитывали индекс реакции ГЗТ (ИР) по формуле: $ИР = (M_o - M_k) / M_k \times 100\%$, где M_o – масса «опытной» лапы, M_k – масса «контрольной» лапы [7].

Для изучения влияния веществ на формирование гуморального звена иммунного ответа антигенную стимуляцию проводили однократным внутрибрюшинным введением ЭБ в дозе 5×10^8 в 100 мкл физ. раствора. Через 7 дней после иммунизации животных выводили из эксперимента с использованием хлороформа, получали сыворотку. Для инактивации комплемента сыворотку прогревали при $t = 56^\circ\text{C}$ в течение 30

мин. Реакцию геммагглютинации проводили в 96-луночных планшетах; для подавления неспецифического связывания антител реакцию ставили в 50 мкл разводящей жидкости (0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина, приготовленного на физ. растворе), в которой последовательно двукратно разводили исследуемые сыворотки. После разведения сывороток в лунки вносили по 25 мкл 1% взвеси ЭБ. Предварительный учет результатов РПГА производили через 1 ч инкубации при $t = 37^\circ\text{C}$, затем планшеты переставляли в холодильник при $t = +4^\circ\text{C}$, и через 18 ч реакцию учитывали окончательно. Титр антител (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается агглютинация ЭБ) выражали в среднегеометрических показателях [7].

Для определения изменений массы и клеточности органов иммунной системы лабораторных животных выводили из опыта через сутки после введения веществ. Извлеченные тимус и селезенку взвешивали, готовили клеточные суспензии в среде 199 из расчета для селезенки 50 мг/мл, для тимуса – 10 мг/мл, фильтровали, отмывали двукратно средой 199 от частиц жировой ткани (по 10 мин. при 1500 об.), после чего ресуспендировали в среде 199 до исходной концентрации. Суспензии лимфоидных органов для подсчета предварительно смешивали с 3% уксусной кислотой (1:1), подкрашенной метиленовой синью, и подсчитывали количество ядросодержащих клеток (ЯСК) в камере Горяева. Количество ЯСК выражали в абсолютных и относительных значениях [7].

Все манипуляции с животными проводили, соблюдая правила GLP [8]. Полученные результаты подвергали статистической обработке: достоверность различий между сравниваемыми показате-

телями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Фенотропил у животных с циклофосфамидной иммунодепрессией оказывает иммунокорригирующее действие: ИР ГЗТ и титр антител в РПГА достигают показателей «нормы» в контроле № 1 ($p_1 > 0,05$, $p_2 < 0,05$) (табл. 1). Установлено также, что фенотропил уменьшает нарушения лимфопролиферативных процессов в иммунокомпетентных органах крыс с иммунной недостаточностью, увеличивая массу тимуса и селезенки и количество ядросодержащих клеток в них более чем на 20% по сравнению с контролем 2 ($p_2 < 0,05$); при этом показатель массы тимуса практически достигает фоновых значений в контроле 1 ($p_1 > 0,05$).

При анализе иммунотропного действия L-глутаминовой кислоты отмечено, что изучаемое вещество уменьшает действие иммунодепрессанта ЦФА, но в меньшей мере, чем производное ГАМК – фенотропил. Под влиянием глутаминовой кислоты наблюдается стимуляция местноклеточной реакции и процесса антителообразования, что проявляется увеличением показателей РГЗТ и РПГА более чем на 40% по сравнению с группой животных с патологией ($p_2 < 0,05$). Глутаминовая кислота увеличивала массу тимуса и количество тимоцитов и спленоцитов по сравнению с контролем 2 более чем на 30% ($p_2 < 0,05$), но на массу селезенки практически не влияла ($p_2 > 0,05$).

Соединение РГПУ-158, представляющее собой композицию фенотропила и глутаминовой кислоты, проявляет иммуномодулирующую активность, превышающую по силе действия исходные вещества. Так, уровень геммагглютини-

Таблица 1

Влияние РГПУ-158, фенотропила и L-глутаминовой кислоты на формирование иммунного ответа в условиях циклофосфамидной иммунодепрессии

Группы животных n = 8	Контроль 1: физ. раствор	Контроль 2: циклофосфамид (150 мг/кг)	Опыт № 1: фенотропил (50 мг/кг) + циклофосфамид (150 мг/кг)	Опыт № 2: L-глутаминовая кислота (30 мг/кг) + циклофосфамид (150 мг/кг)	Опыт № 3: РГПУ-158 (60 мг/кг) + циклофосфамид (150 мг/кг)
Показатели иммунного ответа					
ИР ГЗТ, М ± m, %	17,3 ± 1,0	6,0 ± 0,7 t ₁ = 9,3 при p ₁ < 0,001	21,25 ± 4,9 t ₁ = 0,8 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 3,1 при p ₂ < 0,05	8,5 ± 0,8 t ₁ = 6,8 при p ₁ < 0,001 t ₂ = 2,4 при p ₂ < 0,05	20,5 ± 1,3 t ₁ = 2,0 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 9,7 при p ₂ < 0,001
Титр антител в РПГА М ± m, lg	1,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2 t ₁ = 3,5 при p ₁ < 0,05	1,7 ± 0,08 t ₁ = 0,8 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 3,95 при p ₂ < 0,05	1,5 ± 0,08 t ₁ = 0,77 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 2,7 при p ₂ < 0,05	2,0 ± 0,2 t ₁ = 2,0 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 3,7 при p ₂ < 0,05
Масса селезенки, М ± m, мг	152,0 ± 14,0	113,0 ± 2,8 t ₁ = 2,7 при p ₁ < 0,05	137,3 ± 8,7 t ₁ = 2,0 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 2,7 при p ₂ < 0,05	125,8 ± 7,3 t ₁ = 1,7 при p ₂ > 0,05 t ₂ = 1,6 при p ₂ > 0,05	142,5 ± 12,6 t ₁ = 0,5 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 2,3 при p ₂ < 0,05
Количество спленоцитов в 1 мг селезенки, М ± m, x 10 ⁵	5,0 ± 0,7	2,4 ± 0,2 t ₁ = 2,7 при p ₁ < 0,05	4,4 ± 0,5 t ₁ = 0,6 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 4,0 при p ₂ < 0,01	4,8 ± 0,3 t ₁ = 0,2 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 6,0 при p ₂ < 0,001	9,8 ± 0,7 t ₁ = 4,9 при p ₁ < 0,01 t ₂ = 10,6 при p ₂ < 0,001
Масса тимуса, М ± m, мг	40,0 ± 4,0	25,3 ± 3,7 t ₁ = 2,7 при p ₁ < 0,05	38,5 ± 2,0 t ₁ = 0,3 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 3,1 при p ₂ < 0,05	37,6 ± 1,5 t ₁ = 0,6 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 3,0 при p ₂ < 0,05	43,1 ± 2,1 t ₁ = 0,7 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 4,1 при p ₂ < 0,01
Кол-во тимокитов в 1 мг тимуса, М ± m, x 10 ⁵	5,0 ± 0,8	1,1 ± 0,09 t ₁ = 4,9 при p ₁ < 0,01	3,0 ± 0,2 t ₁ = 2,5 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 9,4 при p ₂ < 0,001	1,9 ± 0,3 t ₁ = 3,4 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 2,7 при p ₂ < 0,05	3,7 ± 0,3 t ₁ = 1,5 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 8,7 при p ₂ < 0,001
Кол-во тимокитов в 1 мг тимуса, М ± m, x 10 ⁵	5,0 ± 0,8	1,1 ± 0,09 t ₁ = 4,9 при p ₁ < 0,01	3,0 ± 0,2 t ₁ = 2,5 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 9,4 при p ₂ < 0,001	1,9 ± 0,3 t ₁ = 3,4 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 2,7 при p ₂ < 0,05	3,7 ± 0,3 t ₁ = 1,5 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 8,7 при p ₂ < 0,001

Здесь и далее: статистические показатели относительно контроля 1 (t₁, p₁) и контроля 2 (t₂, p₂)

нов в РПГА, масса тимуса и селезенки, а также количество кариокитов в иммунокомпетентных органах под влиянием РГПУ-158 превышает соответствующие показатели в опытных группах живот-

ных, получавших препараты сравнения, более чем на 20%; лишь ИР ГЗТ сопоставим с действием фенотропила.

В большинстве работ, посвященных изучению корректирующих свойств ве-

ществ, рассматривается их действие в условиях экспериментальной иммунодепрессии, проведение односторонней оценки активности иммуномодуляторов, однако в последние годы отмечается интенсивный рост заболеваний, обусловленных гиперреактивностью иммунной системы (аллергические и аутоиммунные процессы), поэтому целесообразно изучать действие веществ и в условиях

иммуностимуляции (при экспериментальном иммунном стрессе, вызванном введением ЛПС).

Исследуемые в работе препараты сравнения – фенотропил и L-глутаминовая кислота уменьшали показатели РГЗТ и РПГА, развивающиеся под воздействием ЛПС, более чем на 30 и 10% соответственно по сравнению с контролем 2. (табл. 2). В отношении пролифера-

Таблица 2

Влияние РГПУ-158, фенотропила и L-глутаминовой кислоты на формирование иммунного ответа в условиях ЛПС-индуцированного иммунного стресса

Группы животных n = 8	Контроль 1: физ. раствор	Контроль 2: ЛПС (100 мкг/кг)	Опыт № 1: фенотропил (50 мг/кг) + ЛПС (100 мкг/кг)	Опыт № 2: L-глутаминовая кислота (30 мг/кг) + ЛПС (100 мкг/кг)	Опыт № 3: РГПУ-158 (60 мг/кг) + ЛПС (100 мкг/кг)
Показатели иммунного ответа					
ИР ГЗТ, М ± m, %	17,3 ± 1,0	35,8 ± 4,7 t ₁ = 3,9 при p ₁ < 0,05	23,4 ± 3,1 t ₁ = 1,9 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 2,2 при p ₂ > 0,05	23 ± 1,7 t ₁ = 2,9 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 2,6 при p ₂ < 0,05	18,1 ± 1,7 t ₁ = 0,4 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 3,6 при p ₂ < 0,05
Титр антител в РПГА М ± m, lg	1,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1 t ₁ = 10,0 при p ₁ < 0,001	2,3 ± 0,1 t ₁ = 5,0 при p ₁ < 0,001 t ₂ = 2,3 при p ₂ < 0,05	2,18 ± 2,1 t ₁ = 2,9 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 2,2 при p ₂ < 0,05	2,0 ± 0,08 t ₁ = 2,9 при p ₁ < 0,01 t ₂ = 4,3 при p ₂ < 0,001
Масса селезенки, М ± m, мг	151,5 ± 14,1	204,4 ± 5,2 t ₁ = 3,5 при p ₁ < 0,05	163,8 ± 13,3 t ₁ = 0,6 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 2,8 при p ₁ < 0,05	189,4 ± 2,0 t ₁ = 2,7 при p ₁ < 0,01 t ₂ = 2,7 при p ₂ < 0,05	157,5 ± 9,8 t ₁ = 0,4 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 4,3 при p ₁ < 0,01
Количество спленоцитов в 1 мг селезенки, М ± m, x 10 ⁵	4,4 ± 0,6	6,5 ± 0,5 t ₁ = 2,6 при p ₁ < 0,05	6,2 ± 0,4 t ₁ = 2,6 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 0,5 при p ₂ > 0,05	6,2 ± 0,4 t ₁ = 2,6 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 0,7 при p ₂ > 0,05	4,1 ± 0,5 t ₁ = 0,4 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 3,5 при p ₂ < 0,05
Масса тимуса, М ± m, мг	30,3 ± 2,7	42,5 ± 1,7 t ₁ = 3,8 при p ₁ < 0,05	38,5 ± 2,0 t ₁ = 2,5 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 1,5 при p ₂ > 0,05	37,6 ± 0,8 t ₁ = 2,6 при p ₁ < 0,05 t ₂ = 5,9 при p ₂ < 0,05	31,4 ± 0,8 t ₁ = 0,4 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 5,9 при p ₂ < 0,001
Кол-во тимокитов в 1 мг тимуса, М ± m, x 10 ⁵	3,5 ± 0,3	4,8 ± 0,3 t ₁ = 3,3 при p ₁ < 0,05	3,0 ± 0,2 t ₁ = 1,3 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 5,0 при p ₂ < 0,001	2,75 ± 0,2 t ₁ = 1,9 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 5,1 при p ₂ < 0,001	3,0 ± 0,2 t ₁ = 1,3 при p ₁ > 0,05 t ₂ = 4,5 при p ₂ < 0,01

тивных процессов в иммунных органах вещества проявили неравнозначное действие: под влиянием фенотропила отмечено восстановление массы селезенки и количества тимоцитов (показатели практически достигают «нормы» в контроле 1) ($p_2 < 0,05$), тогда как L-глутаминовая кислота более выраженное влияние оказывает лишь на процессы в тимусе, восстанавливая количество тимоцитов до фоновых значений в контроле 1 ($p_2 < 0,001$).

Композиция фенотропила и глутаминовой кислоты так же, как и при иммуносупрессии, вызвала нормализацию всех изучаемых в работе показателей иммунитета у животных с иммунным стрессом, которые достигли значений в контрольной группе № 1 («плацебо») ($p_2 < 0,05$).

Заключение

Таким образом, полученные в ходе эксперимента результаты позволяют сделать заключение, что новое химическое соединение, представляющее собой композицию «фенотропил + L-глутаминовая кислота» (РГПУ-158), проявляет выраженные иммунокорригирующие свойства на фоне как подавления, так и гиперактивации иммунной системы. При этом выраженность иммунокорригирующего действия соединения РГПУ-158 превышает активность взятых в отдельности исходных веществ, что, вероятно, обусловлено наличием феномена «потенцирование» при сочетанном действии фенотропила и глутаминовой кислоты. Считаем, что новая изучаемая композиция является перспективной для разработки на ее основе высокоэффективного иммуномодулятора, проявляющего активность при различных вариантах иммунного дисбаланса.

Список литературы

1. *Девойно Л.В., Ильюченко Р.Ю.* Нейромедиаторные системы в психо-нейроиммунотропности: дофамин, серотонин, ГАМК, нейропептиды. Новосибирск, Ц.Э.РИС. 1993. 237 с.
2. *Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В., Сениашивили Р.И.* Нейроиммунопатология. М.: Медицина. 2003. 438 с.
3. *Магаева С.В., Морозов С.Г.* Нейроиммунофизиология. – М.: Изд-во ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН. 2005. 160 с.
4. *Сомотруева М.А.* Иммунные нарушения при некоторых нервно-психических заболеваниях // Астраханский медицинский журнал. 2008. № 3. С.14-24.
5. *Сомотруева М.А., Теплый Д.Л., Тюренков И.Н., Лужнова С.А.* Изменения психоэмоционального состояния в условиях подавления иммуногенеза у мышей и крыс. Коррекция нарушений ГАМК-позитивными препаратами // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010. № 2. С. 115-220.
6. *Тюренков И.Н., Галимзянов Х.М., Теплый Д.Л., Сомотруева М.А., Лужнова С.А.* Экспериментальное изучение иммунокорригирующих свойств фенотропила в аспекте «доза-эффект» // Иммунология. 2009. № 5. с. 302-305.
7. *Хаитов Р.М., Гуцин И.С., Пинегин Б.В.* Методические указания по изучению иммунотропной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М. 2005. С. 501-514.
8. GLP: Principles of Good Laboratory Practice as specified by national. German

Chemicals Law, Annex 1, 20 June 2002) and international (OECD, Paris, 1998; ES Directive 2004/10/EC, 11. February 2004).

9. *Sali A.* Psychoneuroimmunology. Fact or fiction? // Aust. Fam. Physician.

1997.Vol. 26 (11). P. 1291-1294.

10. *Schubert C., Schüssler G.* Psychoneuroimmunology: an update // Z Psychosom. Med. Psychother. 2009. Vol. 55. № 1. P. 3-26.

Immunomodulation properties of a composition phenotropila and L-glutaminic acids

I.N. Turenkov, M.A. Samotrueva, N.N. Gragdanceva, E.B. Hlebcova, V.M. Berestovickaya, O.S. Vasileva

There were made experimental investigation of immunocorrective properties of composition «phenotropil + L-glutaminic acid» (RGPU-158) on the model of cyclophosphamid immunodepression and LPS-induced immune stress. It has been stated that RGPU-158 re-stores the cellular (the hypersensitivity reaction of slowed-up type index) and humoral (titer of antierythrocytic antibodies) immunity, and lymphoid proliferation in the immunocompetent organ.

Key words: phenotropil, L-glutaminic acid, composition, immune stress, immunodepression, immunocorrection.

Изучение влияния препаратов антиоксидантного действия на физиологические реакции животных, получающих противоопухолевую химиотерапию

П.И. Скопин, А.В. Зорькина, М.Т. Кулаев, А.А. Пешев

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск

Контактная информация: к.м.н., доцент Скопин Павел Игоревич skopinpi@mail.ru

В эксперименте на крысах с перевиваемой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1, которым моделировалась химиотерапия доксорубицином (1 мг/кг внутривенно N3), изучено стресс-протекторное действие 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина сукцината (25 мг/кг в/м N12) и 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина гидрохлорида (17 мг/кг в/м N12). Для оценки эмоционально-поведенческих реакций использованы методика «приподнятого крестообразного лабиринта» в сочетании с традиционной методикой оценки двигательной активности и эмоционального состояния экспериментальных животных в тесте «открытое поле». Выявлено развитие тревожно-фобического состояния у крыс контрольной группы с холангиоцеллюлярной карциномой и усугубление депрессивноподобных расстройств на фоне химиотерапии, несмотря на торможение роста опухоли. По сравнению с группой монотерапии доксорубицином, крысы, получавшие антиоксидантную коррекцию, значительно больше времени проводили на открытых участках лабиринта и активнее вели себя в «открытом поле».

Ключевые слова: противоопухолевая химиотерапия, мексидол, перевиваемая холангиоцеллюлярная карцинома РС-1, тревожность, депрессия.

Современная интенсивная противоопухолевая химиотерапия сопровождается многочисленными побочными эффектами и ухудшает качество жизни пациентов. Образующиеся на фоне противоопухолевой химиотерапии в организме больного свободные радикалы и инактивация ферментов антиоксидантной защиты усиливают интоксикацию, вызывают токсическое повреждение клеток внутренних органов и зачастую оказываются лимитирующим фактором для продолжения лечения [1-3]. Применение веществ с антиоксидантной активностью, по данным многих авторов, улучшает переносимость противоопухолевой лучевой химиотерапии и результаты лечения [4-6].

Отечественный лекарственный препарат этилметилгидроксипиридина сукцинат, обладающий антиоксидантным

и мембранопротекторным механизмом действия, проявляет уникальный спектр фармакологических свойств – ноотропную, противогипоксическую, нейропротекторную, анксиолитическую, антистрессорную, антиалкогольную, противопаркинсоническую и противосудорожную активность и др. [7]. Рядом работ доказана возможность применения производных 3-оксипиридина в комплексной терапии онкологических заболеваний [8-10]. Учитывая эффективность препарата при невротических и неврозоподобных расстройствах с проявлениями тревоги, страха, эмоционального напряжения, нами проведено экспериментальное исследование анксиолитической и стресс-протекторной эффективности 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина сукцината при онкологической патологии в условиях противоопухолевой химиотерапии.

Материалы и методы

Эксперимент был проведен на 42 самцах белых нелинейных крыс. Модель неоплазии создавалась путем подкожной перевивки животным массой 80-100 г опухолевого штамма холангиоцеллюлярного рака РС-1 (НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). Животные содержались в стандартных условиях в виварии ГОУВПО «Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва», со свободным доступом к стандартному брикетированному корму и питьевой воде.

Для моделирования химиотерапии животным на 14, 21 и 28 сутки после перевивки опухоли вводился доксорубин в/брюшинно в дозе 1 мг/кг, 3 инъекции (до суммарной дозы 3 мг/кг). Мексидол и эмоксипин вводили через день с 14 по 34 сутки после перевивки опухоли в/м в дозе 25 мг/кг. Интактную группу составили 10 животных, животным контрольной группы (n=8) вводился соответствующий объем физиологического раствора в/м.

Целостность физиологической реакции крыс в ответ на введение исследуемых производных 3-оксипиридина оценивалась в физиологических тестах с учетом ориентировочно-исследовательского эмоционального, стереотипного и двигательного компонентов по поведенческому атласу для грызунов [11] на 35 день после перевивки опухоли.

Свободную двигательную активность животных изучали в тесте «открытого поля» (ОП), предложенном Hall C.S. (1936) [12] для регистрации поведения животных в ответ на «новые, потенциально опасные стимулы». Продолжительность опыта для каждой отдельной крысы составляла 3 мин. Регистрировался ряд элементарных двигательных

актов и поз, совокупность которых характеризует целостное поведение в «открытом поле» [13].

Для оценки эмоционально-поведенческих реакций на стресс, развивающийся у экспериментальных животных в результате роста опухоли и противоопухолевой химиотерапии, и оценки стресс-протекторных эффектов 3-оксипиридина сукцината использован тест «Приподнятый крестообразный лабиринт – ПКЛ». Животное помещалось в центр лабиринта. Фиксировали время пребывания в закрытых и открытых «рукавах», количество заходов в закрытые и открытые «рукава», длительность нахождения в центре [14]. Продолжительность теста для каждой отдельной крысы составляла 3 мин.

Статистическую обработку проводили с использованием коэффициента достоверности Стьюдента (t). Изменения считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При использовании теста «открытого поля» в контрольной группе наблюдалось ограничение горизонтальной и вертикальной активности животных-опухоленосителей по сравнению с интактными. Горизонтальная двигательная активность на периферии снизилась на 80% ($p < 0,001$), вертикальная у стенки – на 76% ($p < 0,001$); у животных контрольной группы полностью отсутствовала вертикальная активность в центре поля, тогда как у интактных животных она составила $7,0 \pm 0,4$. Спонтанная двигательная активность (суммарное число пересеченных квадратов) уменьшилась на 78,8% ($p < 0,001$) (рис. 1). Число актов короткого груминга в контрольной группе было на 75% меньше, чем в интактной ($p < 0,001$), на 80,6% ($p < 0,001$) сократи-

лась активность по исследованию отверстий в стенках. Суммарная ориентировочно-исследовательская активность уменьшилась на 81,9% ($p<0,001$).

В результате противоопухолевой химиотерапии доксорубицином усилились характерные для депрессии черты поведения – снижение двигательной активности, исследовательской деятельности ($p<0,05$); вместе с тем, достоверно возрос уровень тревожности. На фоне химиотерапии доксорубицином у исследуемых животных еще больше угнеталась двигательная активность – горизонтальная на периферии снизилась на 66,7% ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой, вертикальная на периферии – на 81,6% ($p<0,01$), спонтанная двигательная активность по сравнению с контрольной группой уменьшилась на 52,7% ($p<0,01$). Уменьшилось число актов короткого груминга на 82% ($p<0,001$) по сравнению с животными контрольной группы, количество исследованных отверстий – на 80% ($p<0,05$), суммарная ориентировочно-исследовательская активность уменьшилась на 78,2% ($p<0,05$) к данным контрольной группы (табл. 1).

Применение мексидола на фоне химиотерапии холангиоцеллюлярного рака крыс PC-1 доксорубицином приводило к снижению уровня тревожности у исследуемых животных. Наблюдалась активация горизонтальной активности в 4,4 раза на периферии ($p<0,001$) и в центре в 2,3 раза ($p<0,05$), по сравнению с уровнем животных, получавших монотерапию доксорубицином, и превысив уровень контрольной группы.

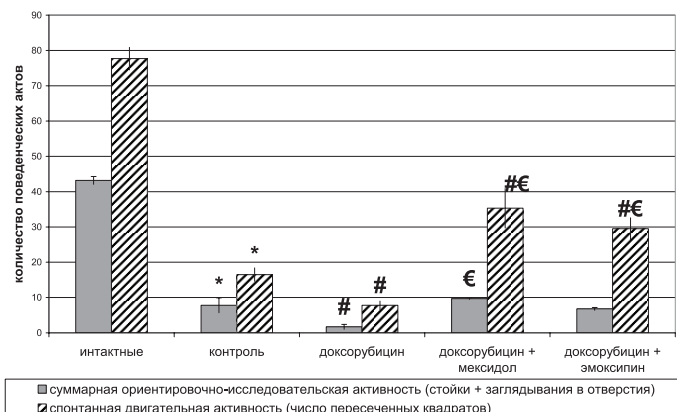


Рис. 1. Влияние мексидола и эмоксипина на фоне химиотерапии доксорубицином холангиоцеллюлярного рака крыс PC-1 на параметры поведения животных в тесте «открытое поле» (* – достоверность различий $p<0,05$ по сравнению с интактными животными, # – по сравнению с контрольной группой, € – по сравнению с группой, получающей монотерапию цитостатиком).

Усилилась и вертикальная двигательная активность – на 542% ($p<0,001$) увеличилось число стоек с упором в стенку. Число актов короткого груминга вернулось к показателям контрольной серии, как и активность по исследованию отверстий, суммарная ориентировочно-исследовательская активность увеличилась в 4,7 раза ($p<0,001$) по сравнению с группой животных, получавших монотерапию доксорубицином. Число актов дефекации уменьшилось по отношению к группе, получавшей только доксорубицин, на 60% ($p<0,05$).

Комбинация противоопухолевой химиотерапии доксорубицином с эмоксипином не столь эффективно снижала уровень тревожности животных с холангиоцеллюлярным раком PC-1, как с мексидолом. Статистически достоверные отличия зарегистрированы при оценке горизонтальной двигательной активности – активность на периферии увеличилась в 4,8 раза ($p<0,01$), и в центре поля – в 2,5 раза ($p<0,05$) (табл. 1). Суммарная ориентировочно-исследовательская активность выросла в 4 раза ($p<0,05$) по

Таблица 1

Влияние мексидола и эмоксипина на физиологические реакции крыс в тесте «открытого поля» на фоне химиотерапии доксорубицином в условиях модели холангиоцеллюлярного рака PC-1 ($M\pm m$)

		Интактные	Контроль	Доксорубицин	Доксорубицин + мексидол	Доксорубицин + эмоксипин
Горизонтальная двигательная активность	На периферии	65,67±2,26	13,00±1,47 $p<0,001$	4,33±1,15 $p'<0,001$	23,50±3,31 $p'<0,05$ $p''<0,001$	20,83±2,93 $p'<0,05$ $p''<0,01$
	В центре	10,33±3,05	3,5±0,68 $p>0,05$	3,50±0,25 $p'>0,05$	11,50±2,78 $p'<0,05$ $p''<0,05$	8,64±2,23 $p'<0,05$ $p''<0,05$
Вертикальная двигательная активность	Упор в стенку	19,00±0,40	4,50±1,01 $p<0,001$	0,83±0,44 $p'<0,01$	5,33±0,54 $p'>0,05$ $p''<0,001$	3,24±1,37 $p'>0,05$ $p''>0,05$
	Стойка в центре	7,00±0,40	0 $p<0,001$	0,17±0,18 $p'>0,05$	0,67±0,54 $p'>0,05$ $p''>0,05$	0,34±0,22 $p'>0,05$ $p''>0,05$
Груминг, кол-во	Короткий	7,33±0,54	1,83±0,18 $p<0,001$	0,33±0,23 $p'<0,001$	1,83±0,87 $p'>0,05$ $p''>0,05$	0,94±0,35 $p'>0,05$ $p''>0,05$
	Длинный	1,17±0,34	1,33±0,67 $p>0,05$	0,33±0,37 $p'>0,05$	1,50±0,47 $p'>0,05$ $p''>0,05$	1,23±0,37 $p'>0,05$ $p''>0,05$
Обследование отверстий		17,17±1,04	3,33±1,12 $p<0,001$	0,67±0,36 $p'<0,05$	3,67±0,67 $p'>0,05$ $p''<0,01$	3,18±0,48 $p'>0,05$ $p''<0,01$
Число актов дефекации		1,00±0,40	1,50±0,25 $p>0,05$	1,67±0,36 $p'>0,05$	0,67±0,23 $p'<0,05$ $p''<0,05$	1,17±0,29 $p'>0,05$ $p''>0,05$

Примечание: достоверность различия p – к показателям интактной группы, p' – к данным контрольной группы, p'' – к данным серии с введением доксорубицина в виде монотерапии.

сравнению с группой животных, получавших монотерапию доксорубицином.

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» животные контрольной группы больше времени находились в закрытых «рукавах» по сравнению с интактными, время пребывания в светлом месте у животных контрольной группы уменьшилось на 61,2% ($p<0,05$). Животные, которым вводился доксорубицин, полностью избегали открытых «рукавов» в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», что, вероятно, связано с усилением тревожности под влиянием противоопухолевой химиотерапии, которая, как известно, снижает скорость реакции и затрудняет целенаправленную

деятельность – время пребывания в светлом месте составило лишь 10,0±2,0 сек., что на 60,8% меньше, чем в контрольной группе (рис. 2).

Под влиянием мексидола у исследуемых животных на 34,8% ($p<0,05$) сократилось время пребывания в закрытых «рукавах» лабиринта, время пребывания в светлом месте увеличилось на 523% ($p<0,05$) по сравнению с животными, получавшими только доксорубицин, в 3,6 раза ($p<0,05$) возросло количество актов груминга.

Введение эмоксипина на фоне терапии доксорубицином увеличило в 4,2 раза ($p<0,05$) время пребывания в светлом месте животных с холангиоцеллю-

лярным раком РС-1. Количество заходов в открытые «рукава» увеличилось у этих животных в 3,7 раза ($p<0,05$), а число актов груминга – в 4 раза ($p<0,05$), по сравнению с животными, получавшими только доксорубин (табл. 2).

Таблица 2

Влияние мексидола и эмоксипина на эмоционально-поведенческие реакции крыс в тесте приподнятый крестообразный лабиринт на фоне химиотерапии доксорубином в условиях модели холангиоцеллюлярный рак РС-1 ($M\pm m$)

	Интактные	Контроль	Доксорубин	Доксорубин + мексидол	Доксорубин + эмоксипин
Время пребывания в закрытых «рукавах», с	104,5±11,7	150,3±6,9 $p<0,01$	66,8±1,5 $p'<0,05$	108,7±18,8 $p'>0,05$ $p''<0,05$	125,4±15,7 $p'>0,05$ $p''<0,05$
	18,2±8,7	1,3±1,0 $p>0,05$	0 $p'>0,05$	46,0±20,8 $p'>0,05$ $p''>0,05$	15,5±6,9 $p'<0,05$ $p''>0,05$
Время пребывания в центре, с	47,5±17,2	24,2±4,7 $p>0,05$	10,0±2,0 $p'<0,05$	16,3±4,5 $p'>0,05$ $p''>0,05$	27,2±8,3 $p'>0,05$ $p''<0,05$
Количество заходов в закрытые «рукава»	3,17±0,44	3,33±0,46 $p>0,05$	1,83±0,34 $p'<0,05$	2,67±0,46 $p'>0,05$ $p''>0,05$	4,67±0,69 $p'>0,05$ $p''>0,05$
Количество заходов в открытые «рукава»	1,33±0,54	0,33±0,23 $p>0,05$	0 $p'>0,05$	1,83±0,59 $p'<0,05$ $p''<0,05$	1,23±0,36 $p'<0,05$ $p''<0,05$
Груминг, кол-во	2,83±0,77	1,33±0,36 $p>0,05$	0,50±0,25 $p'>0,05$	2,33±0,36 $p'>0,05$ $p''<0,05$	2,02±0,51 $p'>0,05$ $p''<0,05$

Примечание: достоверность различия p – к показателям интактной группы, p' – к данным контрольной группы, p'' – к данным серии с введением доксорубина в виде монотерапии.

Выводы

Таким образом, мексидол в дозе 25 мг/кг и, в меньшей степени, эмоксипин в дозе 17 мг/кг, вводимые в/м с 14 по 33 сутки роста опухоли, на фоне химиотерапии доксорубином и этопозидом холангиоцеллюлярного рака крыс РС-1, препятствовали угнетению локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности исследуемых животных в «открытом поле» и уменьшали степень выраженности тревожно-фобических реакций в «Приподнятом крестообразном лабиринте».

Список литературы

1. *Chen Y., Jungsuwadee P., Vore M. et al.* Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues // *Mol. Interv.* 2007. № 7 (3). P. 147-56.
2. *Moss R.W.* Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? // *Integr. Cancer Ther.* 2006. №5. P. 63-82.
3. *Зорькина А.В., Скопин П.И.* Применение отрицательных аэроионов кислорода для модификации противоопухолевой терапии // *Вестник новых медицинских технологий.* 2009. Т. XVI. №4. С. 102-104.

4. *Prasad K.N.* Multiple dietary antioxidants enhance the efficacy of standard and experimental cancer therapies and decrease their toxicity // *Integr. Cancer Ther.* 2004. № 3. P. 310-22.

5. *Зорькина А.В., Скопин П.И.* Влияние комбинации дистанционного гамма-облучения и антиоксидантного препарата на показатели эндогенной интоксикации в условиях экспериментального опухолевого роста // *Сибирский онкологический журнал.* – 2009. – №3 (33). – С. 56-59.

6. *Simone C.B. 2nd, Simone N.L., Simone V., Simone C.B.* Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1 // *Altern. Ther. Health Med.* 2007. № 13. P. 22-28.

7. *Воронина Т.А.* Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // *Фарматека.* 2009. № 6. С. 28-31.

8. *Зорькина А.В., Скопин П.И., Усанова А.А., Маланьина Е.С.* Изучение комбинированного применения противоопухолевой химиотерапии и препаратов антиоксидантного действия // *Уральский медицинский журнал.* 2009. № 8 (62). С. 17-19.

9. *Зорькина А.В., Скопин П.И.,*

Кулаев М.Т., Маланьина Е.С. Морфологические характеристики опухоли в условиях комбинированного применения противоопухолевой химиотерапии и эмоксипина // *Морфологические ведомости.* 2010. № 1. С. 86-89.

10. *Скопин П.И.* Влияние мексидола на антиметастатическую активность противоопухолевых препаратов // *Аспирантский вестник Поволжья.* 2009. № 3-4. С. 104-106.

11. *Пошивалов В.П.* Этологический атлас для фармакологических исследований на лабораторных грызунах. М.: Деп. В ВИНТИ. 1978. С. 3164-78.

12. *Hall C.S.* Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity // *J. comp. physiol. Psychol.* 1936. vol. 22. P. 345-352.

13. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: «Высшая школа». 1991. С. 119-122.

14. *Родина В.И., Крупина Н.А., Крыжановский Г.Н., Окнина Н.Б.* Многопараметровый метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс // *Журн. высш. нерв. деят.* 1993. № 43 (5). С. 1006–1017.

Effects antioxidant drugs during cytostatic therapy on rats behaviour

P.I. Skopin, A.V. Zorkina, M.T. Kulaev, A.A. Peshev

The present study aimed to investigate the influence of combination of the synthetic antioxidant mexidol (3-oxy-6-methyl-2-ethyl-pyridin succinatum, 25 mg/kg i/m N12) or emoxipin (3-oxy-6-methyl-2-ethyl-pyridin hydrochloridum, 25 mg/kg i/m N12) and antitumor drug – doxorubicin (1 mg/kg intraperitoneum N3) on behavioral characterization in rats. Studies were performed on rats with transplantable cholangiocellular carcinoma RS-1. The estimating tests anxiety, locomotion and exploration activity – «elevated plus-maze» and «open field», were used for this investigation. We studied depressive-like state in the behaviour in rats with cholangiocellular carcinoma RS-1. Animals who received cytostatic therapy with doxorubicin showed anxiety-depressive status, despite they had anticancer effect of chemotherapy. Antioxidant correction in rats had more open arm entries in plus maze and had more active in «open field» test, compared with rats doxorubicin treated only.

Key words: cancer chemotherapy, Mexidol, transplantable cholangiocellular RS-1 carcinoma, anxiety, depression.

Особенности доклинических токсикологических исследований лекарственных средств, созданных на основе биотехнологии

Т.А. Гуськова, Р.М. Хаитов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Контактная информация: чл.-корр. РАМН Татьяна Анатольевна Гуськова
tagus@rambler.ru

Традиционные подходы к изучению токсичности биофармпрепаратов могут быть неприемлемы в связи с уникальностью и разнообразием структурных и биологических свойств последних, которые могут включать видовую специфику, иммуногенность и др. В этих случаях необходимо выявить области несоответствия и оценить степень их важности по отношению к общей оценке безопасности. Учитывая видовую специфику многих биофармпрепаратов, особое значение при изучении их токсичности имеет выбор животных подходящего вида.

Ключевые слова: биофармпрепараты, токсичность.

Рынок лекарственных средств, созданных на основе биотехнологии, в настоящее время бурно растет и развивается. Перед тем как передать новое фармакологическое средство любого происхождения на клиническое изучение, необходимо убедиться, что оно не нанесет вреда человеку. Доклиническое изучение токсичности новых лекарственных препаратов обеспечивает относительную безопасность проведения клинических исследований для волонтеров или пациентов. Однако традиционные подходы к доклиническому изучению токсичности лекарственных средств, созданных на основе биотехнологии, могут быть неприемлемы в связи с уникальностью и разнообразием структурных и биологических свойств этих препаратов [1]. Учитывая это, необходим новый подход к доклинической оценке безопасности этой группы препаратов, особенно моноклональных антител.

Программа оценки безопасности лекарственных средств, созданных на осно-

ве биотехнологии, должна предусматривать использование подходящих видов животных, поскольку данные, полученные на неподходящих видах животных, могут ввести в заблуждение исследователей и не должны приниматься в расчет [2]. При отсутствии подходящих видов животных следует изучить возможность использования трансгенных животных, у которых имеются рецепторы, сходные с соответствующими рецепторами человека. Кроме того, целесообразно использовать модели, включающие спонтанные и экспериментальные заболевания у животных. Они могут быть полезны для определения степени безопасности препарата (например, при оценке нежелательного стимулирования развития болезни). В некоторых случаях исследования на животных моделях болезней могут быть использованы как приемлемая альтернатива в токсикологических исследованиях на обычных животных.

Очень сложным является определение величины дозы для первого назна-

чения биотехнологического препарата человеку, поскольку особенностью ряда таких препаратов является невозможность определить максимальную дозу без наблюдаемого отрицательного эффекта из-за их малой токсичности на животных. В таких случаях должно быть представлено научное обоснование дозы, которую рекомендуют для клинических исследований, особенно I-фазы.

Многие препараты, полученные методами биотехнологии, предназначены для стимуляции или подавления иммунной системы. Воспалительные реакции в месте введения препарата могут указывать на стимулирующую реакцию. Экспрессия поверхностных антигенов на целевые клетки может меняться, указывая на их аутоиммунный потенциал. Чтобы прояснить эти вопросы, нужно воспользоваться иммунотоксикологическим подходом к проведению испытаний. Необходимо получить данные о токсичности по отношению к потенциальным органам-мишеням, включая кроветворную и иммунную систему с углубленным изучением последней. Необходимость изучения репродуктивной токсичности зависит от препарата и клинических показаний [3]. Если существует исчерпывающая общедоступная информация о влиянии на репродукцию отдельного класса соединений (например, интерфероны), где единственными чувствительным видом являются нечеловекообразные обезьяны, то можно не проводить рутинного изучения репродуктивной токсичности. В таком случае, следует представить научную базу для оценки возможного влияния таких препаратов на репродукцию и развитие потомства. Еще одной особенностью доклинической оценки биофармацевтических препаратов яв-

ляется отсутствие необходимости проводить изучение генотоксичности, если лекарственная форма не содержит органических вспомогательных веществ в сопряженных белковых продуктах. При доклинической оценке безопасности моноклональных антител необходимо иметь подтверждение их идентичности с помощью строгого определения иммунохимических и физико-химических характеристик. Особое внимание должно уделяться нормативным показателям чистоты препарата (идентификации незначительных примесей, например, РНК, белка и геномной ДНК, допустимым пределам влажности в случае лиофилизации, пирогенности). Что касается доклинической оценки безопасности моноклональных антител в опытах *in vivo*, то обязательным является проведение исследований на обезьянах, желательно на макаках длиннохвостых.

Такой подход к доклинической оценке безопасности нового лекарственного средства, созданного на основе биотехнологии, соответствует современным гармонизированным требованиям, принятым FDA и ICH, и защищает человека от нежелательных явлений, особенно при проведении I-фазы клинических исследований.

Список литературы

1. Гуськова Т.А. // Токсикология лекарственных средств. М.: МДВ. 2008. С.155-179.
2. ICH Guideline S4: Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non-rodent toxicity testing) (CPMP/ICH/300/95).
3. Addis A., Sharabi s., Bonati M. // Risk classification systems for drug use during pregnancy. Drug Safety. 2000. V. 3. С. 245-253.

Features nonclinical toxicologies of researches of medicinal agents created on the biotechnology basis

T.A. Guskova, R.M. Khaitov

That the traditional approaches to the toxicological studies of biopharmaceuticals are unsuitable because of their unique and diversified structural and biological properties, which can include the species-related properties, immunogenic, etc. In such situation the scope of variance shall be identified and its importance for general safety evaluation shall be considered. Bearing in mind the species-related characteristics of many biopharmaceuticals, the emphasis shall be made on the selection of suitable animal species for toxicological studies.

Key words: biopharmaceuticals, toxicity.

Методические рекомендации по изучению безопасности воспроизведенных лекарственных препаратов

И.В. Березовская¹, Т.А. Гуськова², А.Д. Дурнев³

¹ – ОАО «ВНЦ БАВ», Старая Купавна

² – ГНЦ Институт Иммунологии ФМБА России, Москва

³ – НИИ Фармакологии им. В.В.Закусова РАМН, Москва

Контактная информация: чл.-корр. РАМН Татьяна Анатольевна Гуськова
tagus@rambler.ru

Проведен анализ факторов, определяющих опасность воспроизведенных лекарственных средств (генериков), которая иллюстрирована примерами из литературных источников. Дана информация о нормативной документации, способствующей предупреждению возможных негативных эффектов воспроизведенных лекарств. Приведены разработанные методические рекомендации для доклинических токсикологических исследований воспроизведенных лекарственных препаратов, которые будут опубликованы в новом издании Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.

Ключевые слова: воспроизведенные лекарственные препараты, доклинические токсикологические исследования.

Опасность воспроизведенных лекарственных препаратов является актуальной проблемой, вызванной низким качеством субстанций и вспомогательных веществ, фальсификацией препаратов, обнаружением новых побочных эффектов в процессе мониторинга, низким качеством доклинических исследований.

1. Воспроизведенные лекарственные препараты.

1.1. Определение острой токсичности лекарственной формы воспроизведенного препарата и препарата сравнения, зарегистрированного в РФ.

1.2. Изучение субхронической токсичности в течение 14 дней воспроиз-

веденного препарата и препарата сравнения, зарегистрированного в РФ, на одном виде животных.

1.3. Информация о безопасности препарата из Федерального центра по мониторингу безопасности лекарственных средств.

2. Новая лекарственная форма лекарственного средства, зарегистрированного в РФ, с аналогичным путем введения.

2.1. Острая токсичность на одном виде животных при введении путем, предусмотренном инструкцией по клиническому применению.

2.2. Общетоксическое действие в субхроническом (14 дней) эксперименте на одном виде животных. Целесообразно проведение сравнительного исследования токсичности ранее зарегистрированной и внедряемой лекарственной формы.

2.3. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением испытываются в субхроническом эксперименте без нарушения целостности лекарственной формы на крупных животных.

3. Новая лекарственная форма лекарственного средства, зарегистрированного в РФ, с новым путем введения подлежит доклиническому исследованию в объеме, предусмотренном для оригинальных препаратов.

4. Новая фиксированная комбинация лекарственных средств, зарегистрированных в РФ, и применяемая в клинической практике.

4.1. Общетоксическое действие в течение 1 месяца на одном виде животных.

4.2. Необходимо представить аналитическую оценку специфической токсичности предлагаемой комбинации с

обоснованием целесообразности дополнительного экспериментального изучения того или иного вида специфической токсичности (мутагенность, иммуно-токсичность, репродуктивная токсичность).

5. Новая фиксированная комбинация лекарственных средств, зарегистрированных в РФ, не применяемая в клинической практике, подлежит доклиническому исследованию в объеме, предусмотренном для оригинальных препаратов.

Острую токсичность воспроизведенных лекарственных препаратов и препаратов сравнения изучают на одном виде животных – как правило, на нелинейных мышах, самцах, при пути введения, рекомендованном для клинического применения. Определяют среднюю смертельную дозу (ЛД₅₀ с доверительными границами), описывают симптомы интоксикации и результаты наблюдения в течение 14 дней. Основанием для заключения идентичности сравниваемых величин ЛД₅₀ является статистическая достоверность. Субхронический эксперимент в подразделах 1.2; 2.2; 4.1 проводится на нелинейных крысах, самцах, 2.3 – кроликах, самцах, с введением препаратов в одной дозе, вызывающей интоксикацию, и путем введения, рекомендованным для клинического применения. При информации о половых различиях в побочных эффектах препаратов необходимо использовать в эксперименте животных обоего пола. Программа субхронического и хронического эксперимента – в соответствии с методическими рекомендациями, опубликованными в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (М., 2005, под ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У.Хабриева).

The methodical recommendations for study of safety reproduced medicinal preparations

I.V. Berezovsraya, T.A. Guskova, A.D. Durnev

The analysis of the factors determining danger of reproduced medicinal (generics) means is carried out which is illustrated by examples from the references. The information on the normative documentation promoting the prevention of possible negative effects of reproduced medicines is given. The developed methodical recommendations for nonclinical toxicological researches of reproduced medicinal preparations are given which will be published in the new edition «Managements of nonclinical study of new pharmacological substances».

Key words: nonclinical toxicological researches, pharmacological substances.

Гармонизация подходов к оценке безопасности состава лекарственных растительных препаратов

О.И. Терёшкина¹, И.А. Самылина², И.П.Рудакова¹, И.В. Гравель²

¹ – НИИ фармации Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва

² – ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Проведены экспериментальные исследования по изучению уровня загрязненности токсичными контаминантами (токсикантами) лекарственных растений и сырья, уровня их перехода в лекарственные формы в процессе изготовления и разработки методов определения. Проведены информационно-аналитические исследования по оценке требований отечественной и ведущих зарубежных фармакопей, руководств по оценке качества лекарственного растительного сырья и нормативно-методических документов по оценке пищевых продуктов на растительной основе. На основании проведенных исследований разработаны проекты общих фармакопейных статей (ОФС) «Определение тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье» и «Определение остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье» для Государственной Фармакопеи Российской Федерации XII издания.

Ключевые слова: токсиканты, оценка безопасности, лекарственные растительные препараты, нормативные документы

В соответствии с современными представлениями, оценка безопасности лекарственного растительного препарата (ЛРП) должна учитывать все потенциальные факторы риска, специфичные для данной группы лекарственных средств. Современные ЛРП принципиально отличаются с точки зрения безопасности их состава. Причинами этих отличий могут являться и новые технологии получения экстракционных продуктов, в том числе с применением токсичных растворителей, потенциально опасные вспомогательные вещества в составе лекарственных форм и иные экологические условия. В соответствии с подходом к доклиническому

изучению лекарственных средств, разрабатываемых из природного сырья, уровень безопасности препарата природного происхождения прямо зависит от уровня его стандартизации [3]. Среди причин риска медицинского применения ЛРП Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) названы и проблемы качества, в том числе возможность загрязнения потенциально токсичными чужеродными веществами (остаточные органические растворители, токсичные металлы и неметаллы, пестициды, микотоксины, фумиганты, микробная загрязненность, радионуклиды). В документах ВОЗ подчеркнута важность разработки научно-обоснованных национальных требований, проведение исследований в области гармонизации по оценке безопасности ЛРП, повышение уровня требований к качеству ЛРП, оценки качества препарата с точки зрения оценки содержания чужеродных токсичных и потенциально опасных веществ (контаминантов и остаточных загрязнителей) [8]. В соответствии с европейским подходом, обязательными испытаниями лекарственного растительного сырья (ЛРС) и ЛРП с точки зрения безопасности также являются исследования профиля примесей различного происхождения, в том числе примесей, связанных с процессом производства (технологических), примесей потенциально опасных контаминантов [6, 7]. До настоящего времени в отечественной фармакопее отсутствуют статьи по определению мышьяка, пестицидов и тяжелых металлов в ЛРС.

Цель исследований – гармонизация подходов к оценке безопасности состава современного ЛРП с точки зрения оценки содержания контаминантов и остаточных загрязнителей.

Материалы и методы

Проведены исследования по изучению подходов к оценке безопасности ЛРС с точки зрения оценки контаминантов и остаточных загрязнителей - примесей токсичных и потенциально опасных веществ, и, в первую очередь, к оценке содержания тяжелых металлов, мышьяка и пестицидов. В документах ВОЗ подчеркнуто, что в подходах к решению указанной проблемы для лекарственных препаратов может быть много общего с подходами к оценке безопасности продовольственного сырья, продуктов питания и БАД к пище. Однако в связи с особенностями применения лекарственных средств у человека, проблема оценки примесей имеет особую актуальность и должна иметь особые пути решения, связанные с проведением национальных исследований по научному обоснованию нормирования токсикантов.

Основными этапами исследований являлись:

1) экспериментальные исследования по изучению уровня загрязненности токсикантами лекарственных растений и сырья, по изучению уровня их перехода в лекарственные формы в процессе изготовления и разработке методов определения токсикантов [1, 2];

2) информационно-аналитические исследования по изучению подходов к нормированию токсикантов [4, 5].

Результаты и их обсуждение

Особую актуальность при разработке гармонизированного подхода к оценке безопасности представляет собой проблема научного обоснования нормирования токсикантов – выбор объектов нормирования и пределов их допустимого содержания в продукте.

Для решения указанного вопроса на современном уровне были проведены информационно-аналитические исследования данных литературы, требований отечественной и ведущих зарубежных фармакопей, руководств по оценке качества лекарственного растительного сырья, а также, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, и нормативно-методических документов по оценке пищевых продуктов на растительной основе. Анализ информации свидетельствует о наличии существенных различий в подходах к нормированию токсикантов, в принципах оценки, количестве объектов нормирования, единицах нормирования, терминологии, а главное – в значении пределов допустимого содержания токсикантов. Так, в монографии Европейской фармакопеи приведены значения пределов содержания для 70 остаточных пестицидов (ОП), Фармакопеи США – для 34 ОП, значения пределов допустимого содержания совпадают для 33 ОП. Различаются и подходы к нормированию метаболитов пестицидов и других производных. Так, например, малатион нормируется по ЕФ в сумме с малаоксоном, перметрин – в сумме с изомерами, в ФСША при тех же значениях пределов для обоих пестицидов не указаны их производные. Отмечены принципиальные различия и в подходах к нормированию тяжелых металлов и мышьяка (табл.). Установлено, что общим в подходе к нормированию токсикантов является токсикологическое обоснование норм и установление значений уровня максимально допустимого содержания в соответствии с рекомендациями FAO/ВОЗ для продуктов питания (Food and Agricultural Organization/World Health Organization – организация по продуктам питания и сельскому хозяйству

ВОЗ), с учетом значения уровня допустимого суточного потребления химического вещества (ADI – acceptable daily intake of a chemical) и величины дозы суточного потребления (MDI – mean daily intake) лекарственного растительного сырья. Установлено, что обязательным является определение и нормирование в лекарственных средствах, продуктах питания и добавках к пище 4-х основных потенциально токсичных элементов: свинца, кадмия, ртути и мышьяка, и обязательное определение содержания пестицидов, имеющих длительное остаточное действие – органических соединений хлора. Если природа используемых пестицидов не известна, важно оценить количество наиболее токсичных хлорсодержащих пестицидов. Как показали проведенные исследования, хлорорганические пестициды обнаружены практически во всех изученных сборах и БАД, реализуемых через аптечную сеть в РФ. ДДТ обнаружен более чем в 20% образцов, его метаболит – ДДЕ найден практически во всех исследованных образцах. Установлена зависимость содержания пестицидов в ЛРП от вида используемого экстрагента и от вида экстракционного продукта. Анализ допустимых уровней содержания хлорсодержащих пестицидов показал, что наиболее строго регламентируется содержание тяжелых металлов и пестицидов в пищевых продуктах в России.

Выводы

На основании проведенных исследований разработан методологический подход к нормированию тяжелых металлов и остаточных пестицидов, гармонизированный с международными рекомендациями оценки указанных

Таблица

Сравнительный анализ подходов к нормированию тяжелых токсичных металлов и мышьяка в ЛРС и БАД на растительной основе

Нормативные документы	Принцип оценки /Метод определения /Пределы допустимого содержания
Проект ОФС для ГФ РФ XII «Определение содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье»	Принцип: индивидуальное определение металлов (свинец, кадмий, ртуть) Метод: атомно-адсорбционная спектроскопия (ААС) Пределы: свинец – 6,0 мг/кг, кадмий – 1,0 мг/кг, ртуть – 0,1 мг/кг
ГФ XII 24.2 «Тяжелые металлы» ОФС 42-0059-07	Принцип – суммарное полуколичественное определение металлов (свинец, ртуть, висмут, сурьма, олово, кадмий, серебро, медь, молибден, ванадий, рутений, платина, палладий + железо более 0,05% и мышьяк), оценка степени окрашивания в сравнении с эталонным раствором свинца Метод – определение с сульфидным или тиацетамидным реактивом в веществе или в зольном остатке Пределы не указаны (предположительно, не более 10 мкг/г)
ГФ СССР XI	В монографиях раздела «Лекарственное растительное сырье» показатель «Тяжелые металлы» отсутствует. Показатель включен в общие статьи на лекарственные формы «Экстракты» и «Настойки» (суммарное полуколичественное определение – металлы не перечислены – с сульфидным реактивом) Пределы – не более 0,01% (экстракты), не более 0,001% (настойки)
СанПин 2.3.2 1078-01 от 14.11.2001/22.03.02 Раздел 1.10 Биологически активные добавки к пище Пункт 1.10.7 БАД на растительной основе, в т.ч. цветочная пыльца – сухие (чай)	Принцип оценки – индивидуальное определение токсичных элементов (свинец, кадмий, ртуть и мышьяк) Метод определения – ААС Пределы: свинец – 6,0 мг/кг, кадмий – 1,0 мг/кг, ртуть – 0,1 мг/кг, мышьяк – 0,5 мг/кг
Европейская Фармакопея «Herbal drugs» 2.4.27 «Heavy metals in herbal drugs and fatty oils»	Принцип оценки – индивидуальное определение металлов Метод ААС (2.2.23) метод I (кадмий, медь, железо, свинец, никель и цинк) и метод II (мышьяк и ртуть) Пределы – в общей статье не указаны (в частной статье KELP, Fucus vel Ascophyllum: свинец – не более 5 ppm, кадмий – 4 ppm, ртуть – 0,1 ppm)
Фармакопея США 30, НФ 25 «Dietary supplements», <231> Heavy metals	Принцип оценки – суммарное полуколичественное определение металлов (свинец, ртуть, висмут, мышьяк, сурьма, цинк, кадмий, серебро, медь, молибден) Метод – определение с тиацетамидным реактивом «<231> Heavy metals» в сравнении с эталонным раствором свинца Пределы указаны в частных статьях (10 – 50% /10 – 50 мг/кг)
Фармакопея Японии «General rules for crude drugs» 1.07 Heavy Metals Limit Test 1.11 Arsenic Limit Test	Принцип оценки – суммарное полуколичественное определение металлов (металлы не указаны) Метод – определение с сульфидным реактивом в зольном остатке в сравнении с эталонным раствором свинца Пределы: 10-20 ppm (указаны в частных статьях на ЛРС), Мышьяк (нормы указаны в частных статьях на ЛРС)
Фармакопея Китая	Принцип оценки – индивидуальное определение металлов Метод ААС Пределы: свинец – не более 5 мг/кг, кадмий – 0,3 мг/кг, ртуть – 0,2 мг/кг

Нормативные документы	Принцип оценки /Метод определения /Пределы допустимого содержания
Государственная Фармакопея Республики Беларусь 2.8. «Методы анализа лекарственного растительного сырья и лекарственных средств из него» #2.8.20 Определение содержания токсических веществ методом атомно-абсорбционной спектроскопии	Принцип оценки – токсические вещества не указаны (предположительно, индивидуальная оценка токсических веществ) Метод – AAC (2.2.23) Пределы – не указаны (в этой статье описана подготовка проб из навески сырья 3-5 г) Определения мышьяка (ссылка на метод 2.4.2.)
Международная Фармакопея «4. Methods for material of plant origin» «2.2.3 Limit test for heavy metals»	Определение тяжелых металлов (и мышьяка) в общей фармакопейной статье не предусмотрено. В разделе «2.2.3 Limit test for heavy metals» Принцип оценки – суммарное полуколичественное определение «примесей металлов» (металлы не указаны) с сульфидным реактивом в сравнении с эталонным раствором свинца, нормы приведены в частных статьях. Для определения мышьяка предусмотрено отдельное исследование
1)WHO monographs on selected medical plants, Vol.1.1999, Vol.2 2002 2) «WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues, 2007 Annex 3. Determination of arsenic and toxic metals A. Limit tests A.1 Limit test for arsenic A.2 Limit test for cadmium and lead A.3 Limit test for total toxic metals as lead B. Determination of specific toxic metals B.1 – Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, B.2 – As, Hg	Показатель «Heavy metals» включен в частные статьи на ЛРС, пределы (свинец – не более 10 мг/кг, кадмий – не более 0,3 мг/кг), метод определения – ссылка на документ «Quality control methods for medical plants materials, 1998» Принцип оценки – индивидуальное определение металлов (кадмия и свинца) Метод – AAC/обратная вольтамперия Принцип оценки – индивидуальное определение металлов (кадмия и свинца) Limit test for total toxic metals as lead Принцип оценки – суммарное полуколичественное определение Метод (ссылка на Международную фармакопею, 4 изд.) – определение с сульфидным реактивом в зольном остатке в сравнении с эталонным раствором свинца (навеска образца и концентрация эталонного раствора, соответствующая рекомендуемым нормам, указана в частной статье) Нормы – указаны в частных статьях Determination of specific toxic metals Принцип оценки – индивидуальное определение металлов и неметаллов (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, As, Hg) Метод – AAC Пределы – в разделе 3.3 указано, что значения норм допустимого содержания токсичных металлов и неметаллов в ЛРС должно быть установлено на региональном или национальном уровне

токсикантов в ЛРС и ЛРП и отечественным подходом к их оценке в продовольственном сырье и пищевых продуктах, в основе которого:

1) принцип выбора токсикантов в качестве обязательных объектов нормирования для ЛРС и ЛРП в соответствии с отечественными показателями безопасности для БАД к пище на растительной основе;

2) принцип выбора значений пределов допустимого содержания токсикантов в ЛРС и ЛРП, не превышающих допустимых уровней токсикантов отечественных гигиенических нормативов;

3) принцип обязательного индивидуального нормирования трех потенциально опасных тяжелых металлов: свинца, кадмия и ртути, определяемых

методом атомно-абсорбционной спектроскопии;

4) принцип обязательного определения хлорсодержащих остаточных пестицидов в ЛРС методом хроматомасс-спектрометрии;

5) принцип ВОЗ по минимизации значения токсикологически обоснованного предела допустимого содержания токсикантов при максимальном включении в определяемый состав возможных метаболитов, изомеров и других производных.

На основании результатов проведенных исследований разработаны проекты ОФС «Определение тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье» и «Определение остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье».

С целью разработки общей фармакопейной статьи «Определение мышьяка в лекарственном растительном сырье» для XII издания Государственной фармакопеи России (ГФ РФ XII) экспериментальные исследования начаты с изучения проблемы загрязнения мышьяком сырья, заготавливаемого в России и реализуемого через аптечную сеть. Проведены информационно-аналитические исследования подходов к оценке примеси мышьяка в ЛРС. Для включения в ГФ РФ XII пересматривается и отечественный нормативный документ, посвященный определению содержания радионуклидов в ЛРС, в соответствии с современными требованиями отечественных и зарубежных документов, в том числе в соответствии с действующими нормами радиационной безопасности.

Список литературы

1. **Гравель И.В.** Сравнительная оценка содержания ДДТ и его метаболитов в настоях и отварах из лекарственного растительного сырья Алтайского края // Фармация. 2004. № 4. С.13-15.
2. **Гравель И.В.** Содержание гексахлорциклобензола и его изомеров в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях из него// Растит. ресурсы. 2004. Вып. 3. С. 59-64.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ – 2-е изд., перер. и доп. / Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина. 2005. С.741.
4. **Терёшкина О.И., Рудакова И.П., Гравель И.В., Самылина И.А.** Проблема нормирования тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье// Фармация. 2010. № 2.С.7-11.
5. **Терёшкина О.И., Рудакова И.П., Гуськова Т.А., Самылина И.А.** Методологический подход к нормированию остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах// Фармация. 2011. № 2 С. 3-7.
6. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. EMEA. 2006.
7. Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products, EMEA. 2006.
8. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. World Health Organization. 2007.

Harmonization of approaches to safety assessment of medicinal plant drugs

O.I. Tereshkina, I.A. Samylina, I.P. Rudakova, I.V. Gravel

Experimental studies on the pollution level toxic contaminants (toxicants) medicinal plants and raw materials, the level of their transition to the formulations in the manufacture and development of methods for determining. Held information and analytical studies to assess the requirements of domestic and leading international pharmacopoeias, guides to assess the quality of medicinal plants and regulatory guidance documents for assessing food plant-based. Based on the research projects developed common pharmacopoeia articles "Determination of heavy metals in medicinal plant raw material" and "Determination of pesticide residues in medicinal plant raw material" for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation twelfth edition.

Key words: toxicants, safety assessment, drug herbal medicines, regulations.

Сравнительный анализ отечественного и зарубежного подходов к нормированию мышьяка в лекарственном растительном сырье

О.И. Терёшкина¹, И.А. Самылина², И.П.Рудакова¹, И.В. Гравель²

¹ – НИИ фармации Первый МГМУ им. И. М.Сеченова, Москва

² – ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

С целью разработки проекта общей фармакопейной статьи «Определение мышьяка в лекарственном растительном сырье» проведены сравнительные информационно-аналитические исследования подходов к нормированию мышьяка (методы определения и пределы допустимого содержания) в лекарственном растительном сырье, лекарственных растительных препаратах, БАД на растительной основе, диетических добавках, включенных в действующие отечественные и зарубежные фармакопей и нормативно-методические документы.

Ключевые слова: мышьяк, определение, нормирование, лекарственные растительные препараты

Применение лекарственных растительных средств, даже при соблюдении правил сельскохозяйственной и производственной практики, увеличивает общее потребление человеком токсичных химических контаминантов, присутствующих в лекарственном растительном сырье (ЛРС), пищевых продуктах и биологически активных добавках к пище (БАД) на растительной основе. Причинами загрязнения данных видов продукции высокотоксичными примесями мышьяка могут являться: выбросы различных производств, вода, состав почвы, пестициды, содержащие мышьяк удобрения [10]. Токсикологический профиль соединений мышьяка хорошо изучен [5]. Мышьяк, как один из «пока-

зателей безопасности», включен в требования СанПиН к пищевым продуктам и БАД, к пище на растительной основе [4]. В фармакопейных статьях раздела «Лекарственное растительное сырье» Государственной Фармакопеи СССР XI издания (ГФ СССР XI) показатель «Мышьяк» отсутствует [3].

Цель исследований

В настоящее время, в связи с работой над проектом общей фармакопейной статьи (ОФС) для ГФ РФ XII, регламентирующей определение содержания мышьяка в ЛРС, представляется особенно важным разработка отечественного гармонизированного подхода

к оценке содержания примеси мышьяка в ЛРС.

Материалы и методы

Проведены сравнительные информационно-аналитические исследования подходов к нормированию мышьяка (методы определения и пределы допустимого содержания) в лекарственном растительном сырье, лекарственных растительных препаратах, БАД на растительной основе, диетических добавках.

Результаты и их обсуждения

В табл. 1 систематизирована информация о современных подходах к нор-

Таблица 1
Сравнение подходов к определению мышьяка в ЛРС

Нормативный документ	Подход к определению
ГФ СССР XI	визуальное сравнение со стандартным раствором степени окрашивания бумаги, пропитанной раствором дихлорида ртути (предел обнаружения – 0,5 мкг)
ГФ РФ XII раздел «Испытание на предельное содержание примесей» 24.2. ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ (ОФС 42-0059-07) ФСША<231> Heavy metals ВОЗ «Limit test for total toxic metals as lead»	оценка содержания суммы тяжелых металлов и мышьяка в сравнении со стандартным раствором свинца по степени окрашивания испытуемого и стандартного растворов с раствором натрия сульфида и тиаоцетамидным реактивом
ВОЗ Приложение «Determination of arsenic and toxic metals», тест «Limit test for total toxic metals as lead» Фармакопея Японии «Limit test for arsenic» Фармакопея США «Limit test for arsenic»	сравнительное колориметрическое определение примеси мышьяка в зольном остатке с N-N- диэтилдиметилдитиокарбаматом в пиридине в пересчете на As ₂ O ₃ или колориметрическое/ спектрофотометрическое определение с диэтилдитиокарбаматом серебра в пересчете на As в сравнении со стандартным раствором (максимальное поглощение в диапазоне 535-540 нм)
ВОЗ Приложение 3. Determination of arsenic and toxic metals», тест «Determination of specific toxic metals» (B.2 – As, Hg), Европейская фармакопея «Herbal drugs». 2.4.27 «Heavy metals in herbal drugs and fatty oils»	индивидуальное определение мышьяка методом атомно-абсорбционной спектроскопии

мированию мышьяка в ЛРС, включенная в действующие отечественные и зарубежные фармакопей и нормативно-

методические документы. Так, в ГФ СССР XI (раздел «Испытание на чистоту и допустимые пределы примесей»)

включено испытание на мышьяк в приборе с бумагой, пропитанной раствором дихлорида ртути (предел обнаружения – 0,5 мкг), описан принцип оценки – визуальное сравнение окрашивания бумаги испытуемым и эталонным растворами, степень окрашивания зависит от количества мышьяка [2]. В данном испытании предусмотрено определение мышьяка и в органических препаратах после кипячения до обугливания в присутствии серной кислоты (навеска испытуемого препарата должна быть указана в частной фармакопейной статье). В Государственной фармакопее Российской Федерации XII издания (ГФ РФ XII) [1], в разделе «Испытание на предельное содержание примесей» отдельного исследования на примеси мышьяка не предусмотрено. В статье 24.2. *Тяжелые Металлы* (ОФС 42-0059-07) ГФ РФ XII данного раздела указано, что окрашенные сульфиды (с раствором натрия сульфида или тиаоацетамидным реактивом) дает и мышьяк. Оценка содержания суммы токсичных элементов предусмотрена в сравнении с эталонным раствором свинца по степени окрашивания испытуемого и эталонного растворов [1].

Полуколичественная визуальная оценка мышьяка в сумме с тяжелыми металлами, в сравнении с эталонным раствором свинца предусмотрена и по Фармакопее США (<231> *Heavy metals*) [9]. В документе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), посвященном оценке содержания контаминантов и остаточных загрязнителей [10], тест «Limit test for total toxic metals as lead» включен как один из разделов Приложения «Determination of arsenic and toxic metals». В указанном тесте также предусмотрено определение мышьяка в сумме с токсичными металлами, в сравнении с эталонным раствором свинца, пределы

содержания приведены в частных статьях (показатель «Heavy metals») [11].

Наряду с суммарной оценкой токсичных элементов, в обоих указанных документах, так же как и в Фармакопее Японии [7], предусмотрено и индивидуальное полуколичественное определение мышьяка как примеси (Limit test for arsenic). Сравнительное колориметрическое определение примеси мышьяка в зольном остатке с N,N-диэтилдиметилдитиокарбаматом в пиридине в пересчете на As₂O₃ (2 мкг) включено в документ ВОЗ и Фармакопее Японии, колориметрическое или спектрофотометрическое (максимальное поглощение в диапазоне 535-540 нм) с диэтилдитиокарбаматом серебра в пересчете на As – в ФСША. Ранее в документе ВОЗ [8] определение примеси мышьяка было предусмотрено в специальном приборе с бумагой, пропитанной дибромидом ртути. В преамбуле статьи ФША отмечено, что содержание мышьяка не должно превышать пределов, указанных в индивидуальной монографии, навеска исследуемого вещества указана в монографии или может быть определена по приведенной в статье формуле. В Фармакопее Японии показатель «Мышьяк» (Arsenic) включен в отдельные статьи на ЛРС наряду с показателем «Тяжелые металлы», в описании указана навеска сырья и пределы допустимого содержания мышьяка. В монографиях на ЛРС (например, «Achyranthes Root» – корни соломоцвета, «Arisma Rhizome» – корневище частухи) и др. указано, что испытуемый раствор необходимо приготовить из 0,4 г измельченного сырья, и приведен предел допустимого содержания мышьяка – не более 5 ppm, в статьях на экстракты указана навеска 0,67 г и предел – не более 3 ppm. В пищевом сырье

и продуктах предусмотрено колориметрическое определение мышьяка (ГОСТ 26930-86), основанное на измерении интенсивности окраски комплексного соединения мышьяка с диэтилдитиокарбаматом серебра в хлороформе [4].

Индивидуальное определение мышьяка методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) предусмотрено в монографии 2.4.27 «Heavy metals in herbal drugs and fatty oils» раздела ЕФ [6] раздела «Herbal drugs» и в тесте определения специфических токсич-

ных металлов и неметаллов В.2 – As, Hg «Determination of specific toxic metals» Приложения 3. Determination of arsenic and toxic metals в документе ВОЗ [10]. Пояснений о пределах допустимого содержания мышьяка в статье ЕФ не указано, показатель «Мышьяк» в монографии на ЛРС не включен. В соответствии с рекомендациями документа ВОЗ, значение пределов допустимого содержания токсичных металлов и неметаллов в ЛРС должно быть установлено на региональном или национальном уровне.

Таблица 2

Примеры национальных пределов/допустимых уровней содержания мышьяка в лекарственном растительном сырье (ЛРС), лекарственных растительных препаратах (ЛРП) и других продуктах на растительной основе

Страна, продукт	Пределы допустимого содержания
Канада [10]	ЛРС – 5 ppm, ЛРП – 0,01 мг/сутки
Малазия, Сингапур [10]	ЛРП – 5 ppm
Таиланд [10]	ЛРС, ЛРП – 4 ppm
Япония [7]	ЛРС – 5 ppm Экстракты – 3 ppm
Международный стандарт [10]	Растительное сырье для диетических добавок – 5 ppm Диетические добавки – 0,01 мг/сутки
Страна, продукт	Пределы допустимого содержания
СанПин 2.3.2 1078-01 (с изм. и доп., 2009) 1.7.10. Биологически активные добавки (БАД) к пище. БАД на растительной основе, в т.ч. цветочная пыльца [4]	сухие (чай) – 0,5 мг/кг жидкие (эликсиры, бальзамы, настойки и др.) – 0,05 мг/кг

В табл. 2 представлены некоторые примеры национальных пределов допустимого содержания мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах, в том числе отечественные и зарубежные допустимые уровни мышьяка для БАД и диетических добавок на растительной основе. В готовых продуктах пределы допустимого содержания мышьяка представлены с учетом значения допустимого суточного потребления данного химического вещества (ADI) [10].

Выводы

1. Анализ полученных результатов показал принципиальные различия и общие тенденции в подходах к оценке примеси мышьяка в продуктах на основе ЛРС.
2. С учетом результатов проведенных исследований будет разработан гармонизированный подход к оценке содержания примеси мышьяка в ЛРС, введены научно-обоснованные пределы допустимого содержания примеси мышьяка ЛРС в проект ОФС для ГФ РФ XII.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации, 12 изд., статья 24.2. Тяжелые Металлы (ОФС 42-0059-07)
2. Государственная фармакопея СССР: Вып.1 Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. М.: Медицина. 1987. 336 с.
3. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье/МЗ СССР. 11-е изд., доп. М.: Медицина. 1989. 400 с.
4. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы с изменениями и дополнениями: Сборник. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2009. 267 с.
5. Тутельян В.А., Самылина И.А., Хотимченко С.А., Гравель И.В., Булаев В.М. Оценка безопасности лекарственного растительного сырья и БАДах и фитопрепаратах/Фармация. 2009. №1. С. 3-5.
6. European Pharmacopoeia. 6.0, 2008, «Herbal drugs».
7. Japanese Pharmacopoeia, Fifteen Edition. 2007.
8. Quality control methods for medical plant materials. Geneva, World Health Organization. 1998.
9. United State Pharmacopeia 30-NF-25, 2007 <561> Articles of botanical origin». «Dietary supplements».
10. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. World Health Organization. 2007.
11. WHO monographs on selected medical plants. Vol. 1. 1999. Vol. 2. 2002. Vol. 3. 2007.

Comparative analysis of native and approaches to the valuation of arsenic in medical plant raw material

O.I. Tereshkina, I.A. Samylina, I.P. Rudakova, I.V. Gravel

In order to develop a draft general pharmacopoeial article "Determination of arsenic in medicinal plant raw material," conducted a comparative study of information-analytical approaches to the valuation of arsenic (methods for determining and the limits of acceptable content) in medicinal plant raw materials, medicinal plant preparations, plant-based dietary supplements, dietary supplements included in the existing domestic and foreign pharmacopoeia and regulatory guidance documents.

Key words: arsenic, determination, valuation, medicinal herbal preparations.

Критерии доклинической оценки эффективности и безопасности лекарственных растительных средств

Е.Е. Лесиовская, Т.Н. Саватеева-Любимова

ФГУН «ИНСТИТУТ ТОКСИКОЛОГИИ» ФМБА РФ, Санкт-Петербург

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Разработаны методологические подходы к доклинической оценке эффективности и безопасности растительных препаратов и биологически активных добавок (БАД). Выявлены основные различия между растительными средствами, содержащими и не содержащими ядовитые и сильнодействующие вещества. Предложен новый вариант классификации средств природного происхождения на основании их острой токсичности. Определены основные препятствия на пути широкого внедрения растительных лекарственных средств.

Ключевые слова: лекарственные растительные средства, биологически активные добавки к пище, эффективность, безопасность, острая токсичность, лечебные и протекторные эффекты.

Отсутствие четких критериев и методов оценки лекарственных растительных средств привело к тому, что из одного вида сырья в настоящее время производят лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище. В результате нередко случаи необоснованного назначения и нерационального дозирования растительных средств, недобросовестной их рекламы. Все это вводит в заблуждение врача и пациента и, в конечном счете, дискредитирует метод фитотерапии.

На основании многолетних исследований извлечений из лекарственных растений (ЛР), нами были разработаны методологические подходы к доклинической оценке эффективности и безопасности препаратов и биологически активных добавок (БАД). Основные растительные источники ядовитых и сильнодействующих веществ по всем своим характеристикам не отличаются от средств, полученных путем синтеза. Для них характерны следующие особенности:

– строго определенный состав, чаще – одно действующее вещество;

– фармакокинетические параметры препаратов доступны для определения;

– стандартизация осуществима физико-химическими методами;

– относительно узкий спектр лечебных эффектов и применение по строго ограниченному показанию;

– более высокая эффективность при остро развивающихся и тяжело протекающих заболеваниях;

– действие их на организм развивается быстро: как правило, в течение нескольких часов, реже – дней;

– лечебный эффект легко измерим количественно и имеет известную продолжительность во времени;

– лечебный эффект развивается при использовании препаратов в относительно узком диапазоне доз от пороговых до субтоксических;

– применение препаратов даже при соблюдении лечебных доз сопровождается прогнозируемыми побочными эффектами, среди которых нередко осложнения, угрожающие жизни;

– длительность курса лечения обычно невелика и часто лимитирована раз-

витиём побочных эффектов.

Классифицировать их достаточно легко по основному лечебному эффекту. И применение их с лечебной целью – это фармакотерапия.

Для средств на основе растений, не содержащих ядовитые и сильнодействующие вещества, выпускали и продолжают производить лекарственные препараты. Для них характерны следующие особенности:

– в составе препаратов содержится, как правило, комплекс биологически активных веществ (БАВ), который не всегда полностью изучен;

– стандартизацию препаратов проводят по одной группе действующих веществ, что не гарантирует их качества;

– стандартизация физико-химическими методами затруднена или не осуществима (точнее, она производится, но только по одной группе действующих веществ);

– эффективность выше при более

полном извлечении БАВ из сырья;

– препаратам присущ относительно широкий спектр профилактических и лечебных эффектов;

– они более эффективны при профилактике, на начальных стадиях развития болезней и при вялотекущих хронических заболеваниях;

– лечебные эффекты проявляются в широком диапазоне доз, развиваются постепенно, и нередко имеют трудноопределимую продолжительность (хотя правило 2 месяцев действует);

– необходимо назначение длительными курсами со сменой применяемых препаратов 3-6 раз в течение года при многолетней (пожизненной) терапии;

– побочные эффекты возникают относительно редко, не лимитируют длительность курса терапии;

– угрожающих жизни осложнений при надлежащем применении, как правило, не возникает.

Таблица 1

Возможное разграничение безрецептурных лекарственных препаратов и БАД по эффектам и особенностям дозирования

Сравниваемые показатели	Биологически активная добавка (парафармацевтик)	Безрецептурный лекарственный препарат растительного происхождения
Этап, на котором наиболее эффективен	Маладаптация, здоровье	Предболезнь, болезнь
Место в комплексе лечебно-профилактических мероприятий	Оздоровление, компенсация алиментарного дефицита	Профилактика, лечение заболеваний
Основные эффекты	Защитные, например: актопротекторный, нейропротекторный, кардиопротекторный, ангиопротекторный, гастропротекторный, гепатопротекторный, нефропротекторный и т.д.	Лечебные, например: антидепрессивный, снотворный, антиангинальный, гипотензивный, антисекреторный, желчегонный, мочегонный и т.д.
Дозы	Минимальные, равные суточной потребности в эссенциальном компоненте пищи	Средние лечебные, желательно индивидуально подобранные

Изучение острой токсичности наиболее доступных лекарственных рас-

тений доказало, что извлечения из них не токсичны: в большинстве случаев, в

экспериментальных условиях не удается определить средние смертельные дозы – ЛД₅₀, так как не наблюдается гибели животных при введении максимально возможных доз (табл. 2).

Необходимо особо подчеркнуть, что на основании оценки острой токсичнос-

ти не представляется возможным разделение растительных лекарственных препаратов, отпускаемых без рецепта врача, и БАД парафармацевтиков. Но совершенно очевидно, что используемые для самолечения широкими массами людей средства не должны представлять опас-

Таблица 2

Распределение лекарственных растительных средств в соответствии с уровнем токсичности содержащихся в них действующих веществ

Характеристика токсичности лекарственного средства	ЛД ₅₀ для крыс при пероральном введении	Группа лекарственных растительных средств
Чрезвычайно токсично	Менее 5 мг/кг массы тела	1. Ядовитые новогаленовые препараты
Высокотоксично	5-50 мг/кг массы тела	2. Сильнодействующие новогаленовые и галеновые препараты
Умеренно токсично	50-500 мг/кг массы тела	3. Фитопрепараты, содержащие более или менее полный комплекс БАВ растений и не содержащие ядовитых и сильнодействующих веществ
Малотоксично	0,5 – 5 г/кг массы тела	4. Безрецептурные фитопрепараты и БАД парафармацевтики
Практически не токсично	5 – 15 и выше г/кг массы тела	5. Функциональное питание

ности для здоровья. Так, не стоит назначать детям, беременным и кормящим женщинам препараты, содержащие алкалоиды, даже такие «веками проверенные», как пустырник, мать-и-мачеха, чистотел. Алкалоиды пустырника накапливаются в тканях мозга и могут вызывать нарушения со стороны нервной системы ребенка. А производные пирролизидина, мать-и-мачехи и алкалоиды чистотела накапливаются в печени и могут вызвать повреждение гепатоцитов. При выявлении эмбриотоксического, мутагенного и аллергизирующего действия средство не может быть зарегистрировано как безрецептурный препарат или БАД.

Успешной доклинической оценке фитопрепаратов препятствуют: а) тре-

бование выбора одного лечебного эффекта у препарата на основе сложного комплекса действующих веществ; б) недостаточное число доступных большинству исследователей адекватных моделей патологических состояний, позволяющих оценивать поливалентность эффектов ЛР; в) не четкие критерии выбора препаратов сравнения; г) отсутствие линейной зависимости «доза-эффект» для извлечений из ЛР на моделях со сложным патогенезом; д) отсутствие токсикологической классификации средств на основе ЛР. Предложены пути преодоления этих препятствий и критерии доклинической оценки профилактических, лечебных и токсических свойств лекарственных средств на основе ЛР.

Criteria for preclinical assessment of the efficiency and safety of pharmaceutical vegetable substances

E.E. Lesiovskaya, T.N. Savateeva-Lyubimova

New methodological approaches for the assessment of efficiency and safety of vegetable substances and probiotics in preclinical studies have been developed. Basic differences between vegetable substances containing poisonous and strong active agents and the ones without these agents have been revealed. An alternative way of the classification of substances of natural origin based of their acute toxicity was proposed. The major obstacles for the wide use of vegetable medical products were determined.

Key words: pharmaceutical vegetable substances, probiotics, efficiency, safety, acute toxicity, medical and protective effects.

Принципы оценки иммунологической безопасности фармацевтических продуктов

А.С. Иванова, Т.Б. Мастернак, Е.Ю. Малкина, А.И. Мартынов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

В лекарственной токсикологии под иммунотоксическим действием понимают модифицирующее влияние фармакологических средств на иммуногенез, включая иммуносупрессию и гиперстимуляцию иммунитета, способное привести к снижению резистентности организма к инфекции, повышению риска онкологических заболеваний, развитию аутоиммунной патологии и аллергизации организма.

Известно, что иммунная система способна к быстрому реагированию на изменение гомеостаза и обладает значительными резервами к самовосстановлению. Интерпретация результатов, экстраполяция полученных экспериментальных данных на человека, оценка возможного риска при применении нового фармакологического средства, адекватная клиническим ситуациям, представляет наибольшую сложность в иммунологии, следовательно, и в рассматриваемой проблеме.

Целью настоящего сообщения является обсуждение сложившихся в настоящее время подходов к экспериментальному изучению потенциального риска для иммунной системы человека применения новых лекарственных средств.

Ключевые слова: аллергизация, антителообразующие клетки, иммунотоксичность, поликлональная активность.

Данное сообщение имеет своей целью обсудить сложившиеся в настоящее время подходы к экспериментальному изучению потенциального риска для иммунной системы человека применения новых лекарственных средств.

В лекарственной токсикологии под иммунотоксическим действием понимают модифицирующее влияние фармакологических средств на иммуногенез (иммуно-

супрессию и гиперстимуляцию иммунитета), способное привести к снижению резистентности организма к инфекции, повышению риска онкологических заболеваний, развитию аутоиммунной патологии и аллергизации организма [1].

В отличие от установленных протоколов доклинического изучения общетоксического действия, методологические и методические вопросы исследования

иммунотоксического действия до настоящего времени остаются предметом поиска и дискуссий во всем мире [2, 3].

Из-за сложности организации иммунной системы, значительных различий в иммунном ответе животных и человека на многие лекарственные препараты, на сегодняшний день не существует единого подхода, позволяющего адекватно оценить возможную иммунную дисфункцию, вызванную введением фармакологических препаратов. Требуется структурный подход, адаптированный к свойствам препарата и отдельным клиническим ситуациям. Методы тестирования разных аспектов иммунологической реактивности организма животных должны систематически анализироваться, пересматриваться для оценки их адекватности, воспроизводимости, надежности и обоснованности [4].

Широко используемый в настоящее время в лекарственной токсикологии подход к иммунотоксическим исследованиям предусматривает несколько этапов [5, 6, 7]. На первом этапе проводится анализ данных литературы о влиянии на иммунную систему аналогов или близких по действию или химической структуре препаратов, результатов исследований периферической крови, костного мозга, оценки фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитов различной локализации (периферической крови, перитонеального экссудата, купферовских клеток), гистологии иммунокомпетентных органов, полученных при изучении подострой токсичности тестируемого препарата. При этом окраска органов иммуногенеза азуром 2 и эозином вместо гематоксилина, традиционно используемого в токсикологии, позволяет оценить зональную принадлежность и степень дифференцировки иммунокомпетентных клеток [6].

Учитывая высокий компенсаторный потенциал иммунной системы и быстрый многофакторный характер ее реагирования, свидетельством значимых поломок иммунитета может быть нарушение интегральных эффекторных реакций [9]. С этой точки зрения, на первом этапе наибольшего внимания заслуживает оценка способности иммунной системы к выработке антител в ответ на инфекционные и неинфекционные корпускулярные антигены, так как в гуморальном иммунном ответе участвуют все основные клетки иммунной системы [6]. Этот процесс включает главные этапы иммунного реагирования: фагоцитоз, презентацию антигена, распознавание, активацию, пролиферацию, созревание, синтез специфических антител и др., а также сопровождается каскадом цитокиновых реакций. Оценка гуморального иммунного ответа на однократное введение тестируемого препарата в широком диапазоне доз позволяет выявить активную дозу и характер влияния на иммунную систему (активация или супрессия).

Оценку клеточного иммунитета традиционно проводят с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), при введении определенных антигенов (эритроциты барана, туберкулин, овоальбумин, тринитробензосульфоновая кислота (ТНБС) и др.). Эти исследования дают возможность изучать влияние на продукцию сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов, вовлекающих клетки мононуклеарных фагоцитов в иммунный ответ, и оценивать влияние на функциональную активность Т-системы иммунитета. При использовании в реакции гиперчувствительности замедленного типа ТНБС, образующего комплексы с белками организма, удастся модели-

ровать ситуацию, подобную развитию контактной аллергии ко многим химическим и лекарственным веществам. Усиление данной реакции под влиянием тестируемого препарата позволяет с большой степенью вероятности прогнозировать два аспекта опасности при применении потенциального лекарственного средства: риск изменения аллергостатуса или повышения чувствительности организма к традиционным аллергенам, а также возможность развития аутоиммунной патологии [10, 11, 12]. Требования к оценке алергизирующих свойств фармакологических препаратов изложены в специальных методических указаниях, анализ их не является задачей настоящего обсуждения [13].

Оценка возможной аутоенсибилизации представляется более сложной задачей ввиду отсутствия доступных экспериментальных моделей, адекватных клиническим ситуациям, и вследствие разнообразия и специфичности структур организма, которые могут явиться мишенью конкретной аутоагрессии. В рамках изучения иммунотоксичности, для получения первичной информации о возможности срыва толерантности, часто используется оценка прямого митогенного действия в культуре *in vitro*, выявление иммунных комплексов, определение поликлональной активации В-клеток (осуществляемое одновременно с оценкой антителообразующих клеток) [14].

В последние годы широко распространена методика определения массы и клеточности подколенного лимфоузла (так называемый «popliteal lymph node assay», PLNA). Данный тест рекомендуется для прогноза лекарственной аллергии и аутоиммунитета: тестирование 130 соединений с помощью PLNA показало положительную корреляцию с документированным аутоиммунным и ал-

лергическим потенциалом и отсутствие ложноотрицательных результатов [8].

Указанные исследования в сочетании с анализом гистологических исследований потенциальных органов – мишеней аутоагрессии (почки, щитовидная железа, миокард и др.) дают важную дополнительную информацию о возможности индукции аутоиммунных осложнений.

В случае выявления подавления активности иммунной системы (как гуморального, так и клеточного иммунитета), для уточнения последствий указанного эффекта проводится заражение животных патогенными вирусами и бактериями. Сравнительная с контрольными животными оценка выживаемости и продолжительности жизни дает прямой ответ на вопрос, приводит ли вызванное фармакологическим средством снижение гуморального или клеточного ответа, или функции фагоцитов к развитию вторичного иммунодефицитного состояния и срыву антиинфекционного иммунитета.

Проводимые экспериментальные исследования фармакологических средств на иммунотоксичность могут помочь установить противопоказания и ограничения при применении тестируемого лекарственного средства с учетом показаний к применению.

Список литературы

1. **Stanworth D. R.** Current concepts in hypersensitivity – In: Immunotoxicology and Immunopharmacology /Eds. Dean J. H. et al. New York: Raven Press. 1985. P. 91-99.
2. **Dietert R. R., Golemboski K. A.** Immunotoxicological mechanisms – In: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. 1996. Vol. 3. P. 295-302.
3. **Luster M.I., Dean J.H., Germolec D.R.** «Consensus workshop on methods to evaluate developmental immunotoxicity».

Environ Health Perspect. 2003. Apr. 111(4): 579-83.

4. **Neuman D. A.** Immunotoxicity testing and risk assessment: Summary of 1994 Workshop Immunotoxicology Technical Committee // *Fd. Chem. Toxic.* 1995. Vol. 33. N. 10. P. 887-894.

5. **Кудрина Г.П., Буров Ю.В., Алтынбаева Р.Д. и др.** Методические рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. М. 1991.

6. **Хаитов Р.М., Иванова А.С., Мастернак Т.Б. и др.** Методические указания по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М. 2005. С. 70-86.

7. **Weaver J.L., Chapdelain J.M., Descotes J.** Evaluation of a lymph node proliferation assay for its ability to detect pharmaceuticals with potential to cadrug reactions // *J. Immunotoxicol.* 2005. Jan. 1;2(1):11-20.

8. **Pieters R.** The popliteal lymph node assay: a tool for predicting drug allergy // *Toxicology.* 2001. Vol. 158. N. 1-2. P. 65-69.

9. **Хаитов Р.М.** Физиология иммунной системы. М. 2001. 233 с.

10. **Luster M. I., Portier C., Pait D. G., Rosenthal G. J., Germolec D. R.** Immunotoxicology and risk assessment – In: *Methods in Immunotoxicology*, Volume 1, New York et al.: Wiley-Liss. Inc. 1995. P. 51-68.

11. European Commission (1994) Risk Assessment of Existing Substances. Technical Guidance Document XI/91/1994-EN, Chapter 7. European Communities, Luxembourg.

12. **Descotes J., Verdier F.** Popliteal lymph node assay – In: *Methods in Immunotoxicology*, Volume 1 /Eds. Burleson J. R., Dean J. H., Munson A. E.), Wiley-Liss, Inc. 1995. P. 189-196.

13. **Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. и др.** Методические указания по оценке алергизирующих свойств фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М. 2005. С. 54-69.

14. **Мастернак Т.Б., Чижевская М.А., Иванова А.С., Манько В.М.** Влияние иммуномодулирующих препаратов на индуцированную ФГА пролиферацию спленоцитов мышей // *Иммунология.* 1997. № 4. С. 27-31.

The principles for the evaluation of pharmacologic products immune safety

A.S. Ivanova, T.B. Masternak, E.Yu. Malkina, A.I. Martynov

In drug toxicology the term “immune toxic action” means possible pharmacologic products’ effects on the immunogenesis, including immune suppression and immune hyper-stimulation that can result in anti-infection organism resistance decrease and in the elevation of risk for auto-immune pathology development and organism allergisation.

Study results interpretation, the extrapolation of data obtained in animals for humans, new drug product potential risk analysis that will give the adequate picture for clinical practice presents the complex problem in the immunology.

The scope of this article is to discuss modern approaches for new drug products potential immunologic risk experimental evaluation.

Key words: allergization, antibody-produced cells, immunotoxicity, polyclonal activity.

Некоторые вопросы оценки токсичности генно-инженерных лекарственных препаратов

Н.П. Неугодова¹, Г.В. Долгова¹, А.В. Гавриков²

¹ – Научный центр экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения и социального обеспечения Российской Федерации, Москва

² – ЗАО «Мосагроген», Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Лекарственные препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК, должны контролироваться по показателю «Аномальная токсичность», но не в испытаниях на животных (*in vivo*), а с помощью методик, использующих клеточные культуры или одноклеточные микроорганизмы и основанных на фундаментальных исследованиях биологии и цитологии.

Ключевые слова: генно-инженерные лекарственные препараты, аномальная токсичность.

В настоящее время можно говорить о революции или, по крайней мере, о переломной эпохе в создании биологических лекарственных средств. Около 10% от объема фармацевтического рынка приходится на препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Объем мирового рынка лекарственных средств на основе белков, созданных генно-инженерным путём, ежегодно увеличивается на 15%.

За период с 1995 по 2003 гг. 61 биотехнологический лекарственный препарат терапевтического назначения получил лицензию, одобренную Европейским Агентством по медицинскому контролю (European Medicine Evaluation Agency). Из них 15 препаратов были созданы для борьбы с заболеваниями, ранее не имевшими эффективных средств лечения; 22 лекарства – обладали незначительным преимуществом перед существующими; 24 препарата – оказались дженериками, многие из которых не обладали новыми свойствами, но и не отличались дешевизной. Доля генно-инженерных средств постоянно увеличивается и, по оценке ряда специалистов, к 2015 году может достичь

50%. Сегодня уже более 150 препаратов в мире широко применяются для лечения больных: инсулины и глюлизин, человеческий гормон роста, интерфероны, колониестимулирующий фактор, антигемофильный фактор VIII, антитромботические средства. В процессе разработки находятся более 400 препаратов.

Разнообразие условий получения рекомбинантных белков, используемых экспрессионных систем и их первоначального источника, технологий культивирования и входного сырья различной природы способствуют возникновению потенциального риска, возможной токсичности рекомбинантного препарата. Рассматривая понятие токсичности шире, следует говорить об оценке безопасности препарата для людей.

Биологическое лекарственное средство, по определению Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA – European Medicines Agency), – это иммунобиологическое лекарственное средство, произведенное путем биотехнологических процессов с применением:

- технологии рекомбинантной ДНК;
- контролируемой экспрессии генов,

кодирующих выработку биологически активных белков;

- метода гибрида и моноклональных антител, а также генотерапевтические и соматотерапевтические лекарственные средства.

Для получения клеток с измененной наследственностью применяют спонтанный и направленный мутагенез. Это главная причина генетической гетерогенности клеток одного и того же генотипа, поэтому в клеточных биотехнологиях необходим постоянный мониторинг спектра соматической вариабельности и лабораторный контроль за появлением мутантов с отрицательными и положительными признаками.

Разнообразие условий получения рекомбинантных белков, используемых экспрессионных систем и их первоначального источника, технологий культивирования и входного сырья различной природы способствуют возникновению потенциального риска возможной токсичности рекомбинантного препарата. Рассматривая понятие токсичности шире, следует говорить об оценке безопасности препарата для людей. Причины неблагоприятного эффекта, возникающего при применении рекомбинантного препарата, можно разделить на две группы: – связанные с недостаточной безопасностью самого рекомбинантного белка, или аномальной токсичностью, вызванной примесями различной природы, которые связаны с получением продукта по технологии рекомбинантных ДНК.

Более 10% серьезных побочных эффектов новых лекарств невозможно выявить, несмотря на тщательно проводимые исследования на безвредность. Так, на сайте Росздравнадзора постоянно размещаются письма-обращения к специалистам по поводу развития реакций серьезной гиперчувствительности,

включая анафилактические реакции и ангионевротический отек, наблюдаемые при применении биотехнологических препаратов. Степень риска того, что опасные свойства новых, модифицированных с помощью генной инженерии лекарств, останутся незамеченными, высока. Принципы оценки безопасности БТ препаратов требуют изучения следующих параметров:

- а) непосредственное влияние на здоровье (токсичность);
- б) стимуляция аллергических реакций (аллергенность);
- в) наличие специфических компонентов, известных своими токсическими свойствами;
- г) стабильность встроенного гена.

На стадии доклинического изучения острой и хронической токсичности должны быть разработаны специфичные и чувствительные методы оценки безопасности для постмаркетингового контроля генно-модифицированных препаратов. Методы контроля могут применяться *in vivo* с использованием, в случае необходимости, трансгенных животных, и *in vitro* – клеточные культуры. Обязательным условием для обеспечения безопасности пациентов при применении биотехнологических препаратов является испытание на безопасность серийной продукции.

Биоаналоги редко сопоставимы с оригиналом по своей эффективности и безопасности, так как невозможно создать два абсолютно идентичных банка клеток, служащих для получения активной молекулы, и в точности повторить длительный наукоемкий процесс производства. Так, например, обычный процесс синтеза и последующей изоляции действующего вещества эритропоэтина занимает 9 мес. [1]. Любое отклонение от процесса производства, в особен-

ности нарушение условий культивирования клеток и упрощение процесса очистки, влечет за собой отклонения в структуре конечного продукта и соотношении изоформ, является причиной наличия дополнительных бактериальных эндотоксинов и, как следствие, причиной повышенной иммуногенности – одной из основных проблем, связанных с разработкой биоаналогов.

В законодательство Европейского союза в 2003 г. введены понятия биологического лекарственного средства, воспроизведенного лекарственного средства (биоаналог), при этом особо оговорено, что понятие биоаналог не соответствует понятию дженерик. В 2006 г. ЕМЕА были утверждены новые требования к регистрации биоаналогов, включающие доклинические и клинические сравнительные исследования, а также введен дополнительный мониторинг для нежелательных явлений в течение первого года применения их в клинике.

В Российской Федерации отсутствует понятие «биологического лекарственного средства», «воспроизведенного биологического лекарственного средства». Биоаналоги регистрируются по тем же правилам, что и дженерики. Дополнительные исследования по их эф-

фективности, безопасности в настоящее время не требуется. Таким образом, отечественный фармрынок не имеет нормативно-правовой базы для более тщательного отбора и контроля за этими препаратами, что может привести к побочным реакциям у больных. Для повышения гарантий безопасности биотехнологических препаратов для серийно выпускаемых биоаналогов должен быть обязательным тест на «Аномальную токсичность» или «Безопасность», разработанный на доклиническом этапе исследований с выполнением *in vivo* или *in vitro*.

Выводы

В настоящее время отечественный фармацевтический рынок не имеет нормативно-правовой базы для более тщательного отбора и контроля генно-инженерных лекарственных средств, что может привести к проявлению побочных реакций у больных. Для повышения гарантий безопасности серийно выпускаемой продукции в нормативную документацию должен быть включен тест на «Аномальную токсичность» или «Безопасность», разработанный на доклиническом этапе исследований с выполнением *in vivo* или *in vitro*.

Some problems of toxicity evaluation for the biotechnological products

N.P. Neugodova, G.V. Dolgova, A.V. Gavrikov

The drugs obtained with recombinant DNA technology should be controlled to «abnormal toxicity» test, but not in laboratory animals test (*in vivo*), and with methods based on fundamental biology and cytology researches. That is in cell-cultures tests or in microorganisms (bacteria) tests.

Key words: recombinant DNA technology drugs, abnormal toxicity.

Проблемы разработки и оценки безопасности нанофитопрепаратов

С.В. Луценко¹, М.В. Дмитриева², Н.Б. Фельдман²

¹ – НИИ Фармации Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

² – Кафедра биотехнологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Получен нанофитопрепарат флаволигнана силибинина на основе фосфатидилхолина и холестерина и изучена его гепатопротекторная, противоопухолевая и антиангиогенная активность. Нанофитопрепарат обладает значительно более высокой активностью по сравнению со свободным флаволигнаном, что связано с увеличением растворимости и биодоступности препарата и его избирательным накоплением в печени и опухолевой ткани. Нанофитопрепарат силибинина может применяться при терапии патологий печени и различных опухолей.

Ключевые слова: флаволигнаны, силибинин, нанофитопрепарат, терапия.

В исследовании молекулярных механизмов биологической активности растительных флаволигнанов в последние годы достигнут значительный прорыв, позволяющий с оптимизмом рассматривать новые стратегии борьбы с онкологическими и другими заболеваниями. Изучение путей и возможностей терапии патологий печени и подавления опухолевого процесса с помощью флаволигнанов, представляет актуальную научно-практическую задачу, решение которой может внести существенный вклад в современную молекулярную медицину и клиническую онкологию [1]. Помимо гепатопротекторных и противоопухолевых свойств растительных флаволигнанов, важной составляющей частью их биологической активности является недавно открытая способность к подавлению ангиогенеза [2-6].

Важным инструментом повышения терапевтической эффективности является применение флаволигнанов в составе липосомных или полимерных наночастиц, полученных с использованием методов современной биотехнологии и

нанобиотехнологии [7]. В связи с этим, разработка, изучение биологической активности и биобезопасности наносомных форм флаволигнанов является одной из актуальных задач современной медицины, имеющих важное теоретическое и прикладное значение.

Нами был получен нанофитопрепарат флаволигнана силибинина на основе фосфатидилхолина и холестерина, и изучена его гепатопротекторная активность *in vivo* в отношении токсического гепатита, вызванного четыреххлористым углеродом у крыс при внутривенном и внутрижелудочном введении препарата. Показано, что нанофитопрепарат обладает выраженным репаративным действием в отношении клеток печени, снижая активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и содержание общего билирубина в сыворотке крови опытных животных в 2-3 раза эффективнее, чем препарат свободного силибинина. Продemonстрировано, что у экспериментальных животных с модельным острым токсическим гепатитом гепатопротек-

торное действие внутривенно введенного нанофитопрепарата в отношении клеток печени выражено значительно сильнее, чем при его пероральном введении, что делает возможным снижение терапевтической дозы при парентеральном применении.

Исследование противоопухолевого действия нанофитопрепарата проводилось на мышах с привитыми солидными опухолями мышинной меланомы B16. Активность препарата сравнивали с активностью свободного силибинина. В ходе исследования было продемонстрировано, что нанофитопрепарат обладает значительно более выраженной противоопухолевой активностью по сравнению со свободным силибинином, приводя к существенному торможению роста опухоли (до 65%) и увеличению средней продолжительности жизни леченых животных (57%).

Таким образом, нанофитопрепарат на основе силибинина обладает значительно более высокой гепатозащитной и противоопухолевой активностью по сравнению со свободным флаволигнаном, что связано с увеличением растворимости и биодоступности препарата и его избирательным накоплением в печени и опухолевой ткани. Силибинин в форме фосфолипидных наночастиц может применяться при терапии патологий печени и опухолей различного генеза.

Для исследования влияния нанофитопрепарата на процесс ангиогенеза использовали *in vitro* анализ развития капилляров в матрикеле, имитирующем препарат внеклеточного матрикса. Данный метод достаточно полно отражает процесс неоваскуляризации, происходящий *in vivo*, и основан на наблюдении и подсчете количества капиллярных трубок, образующихся в матрикеле под воздействием исследуемых препаратов.

Результаты исследования показали, что применение нанофитопрепарата дозозависимо препятствует образованию капилляроподобных структур из эндотелиальных клеток HUVEC. Наши предварительные данные свидетельствуют о том, что необходимы дальнейшие исследования, направленные на определение возможности использования нанофитопрепарата на основе силибинина для лечения патологий, связанных с нарушением ангиогенеза.

Применение нанофитопрепаратов нового поколения может позволить разработать новые эффективные терапевтические стратегии и значительно расширить арсенал средств лечения различных патологий печени и онкологических заболеваний.

Список литературы

1. *Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Луценко Е.В., Быков В.А.* Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал. М. 2006. 236 с.
2. *Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Луценко Е.В., Быков В.А.* Нанобиотехнология и медицина. М. 2010. 280 с.
3. *Jiang C., Agarwal R. and Lu J.* Anti-Angiogenic Potential of a Cancer Chemopreventive Flavonoid Antioxidant, Silymarin: Inhibition of Key Attributes of Vascular Endothelial Cells and Angiogenic Cytokine Secretion by Cancer Epithelial Cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. vol. 276. P. 371-378.
4. *Lahiri-Chatterjee M., Katiyar S.K., Mohan R.R. and Agarwal R.* A Flavonoid Antioxidant, Silymarin, Affords Exceptionally High Protection Against Tumor Promotion in Sencar Mouse Skin Tumorigenesis Model // *Cancer Res.* 1999. vol. 59. P. 622-632.

5. *Pares A., Planas R., Torres M. et al.* Effects of Silymarin in Alcoholic Patients with Cirrhosis of the Liver: Results of a Controlled, Double-Blind, Randomized and Multicenter Trial // *J. Hepatol.* 1998. vol. 28. P. 615-621.

6. *Pepping J.* Milk Thistle: Silybum Marianum // *Am. J. Health Syst. Pharm.* 1999. vol.56. P. 1195-1197.

7. *Saller R., Meier R. and Brignoli R.* The Use of Silymarin in the Treatment of Liver Diseases // *Drugs.* 2001. vol. 61. P. 2035-2063.

Problems of development and estimation of safety of nanophytopreparations

S.V. Lutsenko, M.V. Dmitrieva, N.B. Feldman

The nanophytopreparation of flavonolignan silybinin was produced on a basis of phosphatidylcholine and cholesterol and its hepatoprotective, antitumor and antiangiogenic activities were studied. The nanophytopreparation showed much higher activity in comparison with free flavonolignan that is connected with increase in solubility and bioavailability of a preparation and its selective accumulation in a liver and a tumoral tissues. The nanophytopreparation of silybinin can be applied at therapy of pathologies of a liver and various tumors.

Key words: flavonolignanes, silybinin, nanophytopreparation, therapy.

Использование модели гиперлипидемии и атеросклероза у крыс в токсикологическом эксперименте

Л.В. Крепкова

ВНИИ лекарственных и ароматических растений Россельхозакадемии, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Для повышения надежности результатов доклинического изучения гиполлипидемических лекарственных средств предложено использовать модель гиперлипидемии и атеросклероза у крыс, которую вызывали с помощью атерогенной диеты с добавлением мерказолила, солей кальция и витамина D2. Экспериментальная модель атеросклероза у крыс характеризовалась развитием гиперлипидемии, увеличением вязкости крови, атеросклеротическими изменениями в стенке сосудов и внутренних органах. Использование модели патологии позволяет расширить знания о механизмах лечебного действия изучаемых лекарственных средств.

Ключевые слова: модель гиперлипидемии и атеросклероза, крысы, токсикологические исследования.

В настоящее время доклинические исследования лекарственных препаратов и их готовых лекарственных форм проводят на здо-

ровых половозрелых животных. Основной причиной этого является сложность воспроизведения в эксперименте на животных ряда патологических состояний, адекватных заболеваниям человека. Между тем, хорошо известны возрастные различия в фармакокинетике лекарственных средств и, соответственно, эффективности лечения. По мере старения, в организме человека происходит возрастное увеличение количества жировой ткани, развивается гиперлипидемия и артериальная гипертензия, сочетание которых повышает вероятность поражения сосудов сердца, головного мозга и смерти. Поэтому, для снижения риска применения лекарственных препаратов в клинике у этой категории пациентов, необходимо проводить доклинические исследования с учетом особенностей их действия на людей пожилого и старческого возраста.

Цель исследования — изучить возможность применения модели экспериментально воспроизведенной гиперлипидемии и атеросклероза у крыс при токсикологическом изучении гиполлипидемических лекарственных средств.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 210 самцах белых нелинейных крыс (исходная масса тела — 160-180 г), которых разделили на 2 группы: I-интактный контроль (50 крыс), II-крысы с воспроизведенной гиперлипидемией и атеросклерозом (160 крыс).

Указанную патологию получали с помощью атерогенной диеты (гиперхолестериновая диета с добавлением витамина D2 и Ca⁺⁺ на фоне угнетения функции щитовидной железы мерказолилом), которую скормливали крысам

в течение 9 мес. (наша модификация диеты по Wilgram-Базазяну). В течение опыта изучали интегральные, гематологические, биохимические показатели, проводили исследование функционального состояния сердечно-сосудистой и выделительной систем. После эвтаназии животных определяли коэффициенты массы внутренних органов и проводили патоморфологические исследования с использованием визуальной оценки выраженности атеросклеротического процесса в аорте и ряда гистохимических методов для патогистологической характеристики изменений в аорте, коронарных артериях, сердце, печени и почках.

Результаты и их обсуждение

Скармливание диеты в течение 1 мес. вызывало статистически достоверное увеличение массы тела крыс. Дальнейшее назначение диеты приводило к замедлению прибавки массы тела крыс (2 мес.) и прогрессивному её снижению к концу эксперимента, по сравнению с интактным контролем. Животные, получавшие атерогенную диету в течение 2-3 мес., имели неопрятный внешний вид, взъерошенную шерсть. Дальнейшее скармливание диеты приводило к ухудшению их общего состояния: крысы приобретали сгорбленную позу, шерсть становилась редкой, появились очаги облысения, в области шеи и спины образовались трещины и эрозии, отмечалась общая кахексия животных, хвосты приобретали белесый цвет, были узловатыми на ощупь. Первая гибель животных II группы (1,25%) зарегистрирована через 4 мес. эксперимента от тромбозов. К концу эксперимента она составила 45,5% от общего числа животных в группе. Гибель крыс, как правило, связана с

возникновением массивных тромбозов в дуге аорты и её брюшном отделе и миокардиодистрофии. Содержание животных на атерогенной диете приводило к развитию анемии (снижение количества эритроцитов, уровня гемоглобина), постепенно нарастающей лейкопении и тромбоцитозу, а также нарушению процессов свертывания крови. Через 1 мес. скармливания диеты крысам отмечали статистически значимое увеличение содержания общих липидов, триглицеридов и общего холестерина в сыворотке крови и ткани печени, которые к 7 и 9 мес. эксперимента более чем в 3 раза (сыворотка крови) и 4 раза (ткань печени) превышали соответствующие показатели у интактных животных. Анализ результатов активности некоторых ферментов сыворотки крови крыс, содержащихся на атерогенной диете, показал статистически значимое увеличение активности аланин- и аспартатаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, общей лактатдегидрогеназы. У крыс II группы отмечены функциональные нарушения сердечно-сосудистой и выделительной систем: уменьшение числа сердечных сокращений, удлинение интервалов P-Q и S-T, снижение диуреза на фоне водной нагрузки. 9-месячное содержание животных на атерогенной диете приводило к увеличению коэффициентов массы сердца, печени, надпочечников и снижению массы селезенки и щитовидной железы. При макроскопическом исследовании аорт интактных крыс выявлен умеренный липоидоз интимы с зональными отеками. У крыс, получавших атерогенную диету, изменения были более выраженными: липоидоз, отек с возвышающимися поражениями типа бляшек, которые занимали обширные участки в восходящей части дуги аорты и, особенно, в её грудном и

брюшном отделах, увеличение размеров сердца, особенно левого желудочка, сморщивание почек с образованием втянутых рубцов на поверхности. По мере удлинения сроков диеты и прогрессирования атеросклероза в аорте, наблюдали очаговую деструкцию интимы с участками деэндотелизации, накопление липидных гранул и капель в эндотелиальных и гладкомышечных клетках интимы и меди, формирование бляшек и атером. Таким образом, длительное скармливание атерогенной диеты крысам приводило к развитию гиперлипидемии и атеросклероза.

Выводы

Предложенная модель гиперлипидемии и атеросклероза воспроизводит патологические процессы, происходящие в организме пожилых людей, и удачно подходит для экспериментальных токсикологических исследований лекарственных средств, предназначенных для лечения людей пожилого возраста.

Список литературы

1. **Базазян Г.Г.** Диетический фактор, атеросклероз и система свертывания крови. М. 1982.
2. **Крепкова Л.В.** Сравнительное токсикологическое изучение гиполлипидемических препаратов растительного происхождения на интактных животных и на модели атеросклероза у крыс. Автореф. дис. канд.биол.наук. Купавна. 1988.
3. **Рыфф И.М., Крепкова Л.В., Арзамасцев Е.В. и др.** Патоморфологические критерии антиатеросклеротического действия некоторых сапонинов растительного происхождения в эксперименте. Бюлл. exper.биол. 1988. № 9. С. 365-368.

Use of the hyperlipidemic and atherosclerosis models of rats in toxicological studies

L.V. Krepkova

For increasing reliability of preclinical investigation results of hypolipidemic drugs there was used a model hiperlipidemic and atherosclerosis for rats, caused by atherogenic diet in combination with mercasolil, calcium, vitamin D2. Experimental model of atherosclerosis in rats was characterized with development of hyperlipidemia, increased blood viscosit, atherosclerotic changes of the blood vessel walls and of internal organs. Use of the pathological models widen our knowledge on the mechanism of drugs action.

Key words: model hiperlipidemic and atherosclerosis for rats, toxicological studies

Экспериментальное изучение безопасности гипорамина – нового фитопрепарата противовирусного действия

В.В. Бортникова

ВНИИ лекарственных и ароматических растений Россельхозакадемии, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Гипорамин представляет собой сухой очищенный экстракт, получаемый из листьев облепихи крушиновидной (*Hipporhaerhamnoides* L.) семейства Лоховых (*Elaeagnaceae*), основными действующими веществами которого являются гидролизуемые танины. При однократном введении гипорамина внутривентриально и в желудок различным видам лабораторных животных, препарат является малотоксичным веществом. Изучение токсичности при длительном введении субстанции и готовых лекарственных форм препарата (сублингвальные и покрытые кишечнорастворимой оболочкой таблетки по 0,02 г, 0,5% мазь для местного применения, вагинальные и ректальные суппозитории по 0,05 г (для взрослых) и 0,03 г (для детей)) не выявило повреждающего действия гипорамина на организм половозрелых и развивающихся лабораторных животных. Препарат не проявляет алергизирующие, эмбриотоксические, тератогенные, мутагенные, иммунотоксические и канцерогенные свойства.

Ключевые слова: гипорамин, субстанция, лекарственные формы, острая и хроническая токсичность.

Гипорамин – сухой очищенный экстракт, получаемый из листьев облепихи крушиновидной, действующими веществами которого являются гидролизуемые танины.

Гипорамин обладает широким спектром противовирусного действия. В основе его механизма действия лежит ингибирующий эффект на вирусную нейраминидазу.

Целью исследования явилось доклиническое токсикологическое изучение гипорамина.

Материалы и методы

Исследование «острой» токсичности субстанции гипорамина проведено на половозрелых белых мышах, крысах и морских свинках (самцы и самки), а

также на 3-недельных крысах при внутривентриальном и внутривентриальном способах введения. Полученные данные обрабатывали методом проб-анализа по Литчфилду и Уилкоксоу. Хроническая токсичность гипорамина изучена при введении субстанции препарата в желудок половозрелым белым крысам в течение 3 мес. и 3-недельным крысам в течение 2 мес. Сублингвальные таблетки гипорамина по 0,02 г исследованы на собаках, мазь 1% и вагинальные суппозитории по 0,05 г изучены на кроликах при 3-мес. введении. Оценка безопасности применения детских лекарственных форм гипорамина дана в хронических экспериментах, проведенных на неполовозрелых животных – щенках (таблетки по 0,02 г, покрытые кишечнорастворимой оболочкой) и крольчатах (ректальные суппозитории по 0,03 г) при введении в течение 3 и 2 мес. При изучении общетоксического действия гипорамина использовали общепринятые интегральные, гематологические, биохимические и патогистологические методы исследования. Исследование потенциальных алергизирующих, местнораздражающих, иммунотоксических, мутагенных, канцерогенных, эмбриотоксических и тератогенных свойств препарата проведено в соответствии с современными требованиями ФГК МЗ РФ.

Результаты и их обсуждение

При однократном внутривентриальном введении гипорамина установлены следующие среднесмертельные дозы: 103-106 мг/кг для крысят и мышей, соответственно; 128-170 мг/кг – для морских свинок и крыс. ЛД₅₀ при введении препарата в желудок крысам, мышам и крысам возрастают более чем

в 50 раз по сравнению с внутривентриальным введением и составляют 7751-9900 мг/кг, что может свидетельствовать о неполном всасывании изучаемого вещества или его инактивации в желудочно-кишечном тракте. Не установлено половых различий животных к действию препарата. Таким образом, субстанция гипорамина относится к малотоксичным веществам.

Введение субстанции гипорамина в желудок крысам в течение 3 мес. в дозах 10, 100 и 500 мг/кг и сублингвальных таблеток по 0,02 г собакам в дозе 15 мг/кг (7-кратная суточная терапевтическая доза), показало хорошую переносимость препарата животными.

Изучение мягких лекарственных форм гипорамина (1% мазь и вагинальные суппозитории по 0,05 г) в 3-мес. эксперименте на самках кроликов показало отсутствие токсического и местнораздражающего действия изученных лекарственных форм препарата.

2-мес. введение в желудок крысам субстанции гипорамина в дозах 10 и 100 мг/кг (соответственно 4- и 40-кратные терапевтические дозы для ребенка 3 лет) и таблеток по 0,02 г, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, щенкам в дозах 20 и 50 мг/кг, ректальных суппозиторий по 0,03 г в дозе 20 мг/кг крольчатам – не изменяло основные интегральные и гематологические показатели, не вызывало нежелательных изменений функционального состояния их внутренних органов и систем организма, что подтверждено патогистологическими исследованиями.

У гипорамина не выявлено алергизирующих, мутагенных, иммунотоксических, эмбриотоксических, тератогенных и канцерогенных свойств.

Выводы

Таким образом, результаты доклинического изучения безопасности противовирусного препарата гипорамина свидетельствуют о его низкой токсичности при введении половозрелым и развивающимся животным и отсутствии у него нежелательных отдаленных эффектов.

Список литературы

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению но-

вых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина. 2005.

2. *Шипулина Л.Д.* Исследование антивирусной активности и других биологических свойств гипорамина – нового противовирусного препарата. // Сб. трудов ВИЛАР, М., 2000, с. 228-239.

3. *Шипулина Л.Д., Фатеева Т.В., Крепкова Л.В., Бортникова В.В., Толкачев О.Н.* Противовирусный препарат из облепихи: данные экспериментальных и доклинических исследований. // Ж.. Практическая фитотерапия. 2005. № 4. С. 7-16.

Experimental study safety of hiporamin – new antiviral fitopreparation

V.V. Bortnikova

Hiporamin represents a dry purified extract produced from leaves of sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) family (Elaeagnaceae), containing hydrolyzable tannins. A preclinical study of the phytopreparation Hiporamin safety was carried out. The single administration of Hiporamin intraperitoneally and per os to laboratory animals showed that it is low – toxic. The chronic toxicity study of the drug substance and its pharmaceutical forms: sublingual tablet with by intestine soluble cover 0,02 g, 0,5 % ointment for local application, 0,05 g vaginal and rectal suppositories (for adults) and 0,03 g (for children) did not reveal harm effects of Hiporamin on the organism of the adult and of the immature laboratory animals. The preparation has no allergenic, irritating, immunotoxic, mutagenic, cancerogenic, embryotoxic and teratogenic effects.

Key words: hiporamin, substance, pharmaceutical forms, acute toxicity, chronic toxicity.

Сравнение общетоксического действия препаратов родиолы розовой биотехнологического и природного происхождения

С.В. Козин¹, Ф.П. Крендаль^{1,2}, Л.В. Левина¹, В.Н. Чубарев²

¹ – Лаборатория экстремальных состояний НИЦ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

² – Кафедра фармакологии фармацевтического факультета Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Было проведено лабораторное изучение токсического действия (острая и хроническая токсичность) препарата из биомассы культуры ткани *Rhodiola roseae*, согласно официальным требованиям к подобным исследованиям, и сравнение его с препаратом из природного корня *Rhodiola roseae*. Оба препарата показали низкую токсичность и высокую безопасность даже при длительном регулярном применении. Биотехнологический препарат даже превосходил натуральный по показателю острой токсичности (DL50).

Ключевые слова: родиола розовая, биомасса культуры ткани, лабораторное изучение, токсичность острая, токсичность хроническая.

В настоящее время значительно возрос интерес к фитоадаптогенам, в частности препаратам родиолы розовой. Одно из самых серьезных препятствий к их широкому внедрению в медицинскую практику – недостаточность сырьевой базы. Наиболее перспективным методом решения этой проблемы является культивирование изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в условиях *in vitro*.

В нашей лаборатории были проведены доклинические испытания спиртовой настойки биомассы культуры ткани родиолы розовой (препарат РР-1) и сравнение её с официальным экстрактом природного корня родиолы розовой [1].

Непременной особенностью всех фитоадаптогенов является их чрезвычайно высокая безопасность даже при длительном систематическом применении. Важнейшими характеристиками безопасно-

сти лекарственного препарата являются показатели его острой и хронической токсичности.

Материалы и методы

При изучении общетоксического действия препарата РР-1 мы руководствовались требованиями, изложенными в официальном Руководстве [2]. Для исключения неспецифического влияния этанола препарат деалкоголизировали – выпаривали до карамелеобразного осадка на роторном испарителе и разводили до нужного объема дистиллированной водой. Само исследование было проведено в 3 этапа:

1. Исследование острой токсичности (DL50) на белых нелинейных мышах (18-23 г) и самцах крыс (220-250 г) при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении. Учёт результатов осуществляли в течение 3-х су-

ток. Расчёт DL50 проводили по методу Литчфилда-Уилкоксона.

2. Определение максимально переносимой дозы (МПД) препарата РР-1 в субхроническом эксперименте было проведено на мышах-гибридах первого поколения линии СВА×С57 В1/6 и белых нелинейных крысах (все животные были обоих полов) при 6-недельном энтеральном введении с последующим 2-недельным наблюдением. МПД определялась как максимальная доза, не приводящая к гибели животных, и задерживающая прирост массы тела не более чем на 10% по сравнению с контролем.

3. Исследование хронической токсичности препарата РР-1 проводили на белых нелинейных самцах крыс при 6-мес. внутрижелудочном введении. Экспериментальная оценка хронической токсичности препарата РР-1 в течение 6 мес. включала большой комплекс как интегральных показателей, так и показателей, характеризующих функции жизненно важных органов, а также гематологические, биохимические, энзимологические и гистоморфологические исследования [2].

Результаты и их обсуждение

В проведённых нами экспериментах показатель DL50 препарата РР-1 для мышей и крыс составил: при внутрижелудочном пути введения соответственно 332,5 (259,5 ÷ 425,5) мл/кг и 341,2 (270,1 ÷ 412,4) мл/кг, а при внутрибрюшинном – 83,5 (76,5 ÷ 90,5) мл/кг и 87,5 (83,4 ÷ 91,5) мл/кг. Препарат в токсических дозах вызывал общую заторможенность, атаксию, урежение дыхания. Гибель животных наступала при явлениях клонических судорог с последующим переходом в тетанус. Признаки интоксикации начинали проявляться

спустя 1-1,5 ч после внутрижелудочного введения препарата. В ряде случаев летальные исходы были зарегистрированы на следующий день.

По различным литературным данным, DL50 экстракта натурального корня родиолы при пероральном введении составляет около 50 мл/кг, а при подкожном – около 30 мл/кг для мышей и крыс [1]. Таким образом, острая токсичность препарата РР-1 ниже, чем у официального экстракта примерно в 4-6 раз. При прямой экстраполяции экспериментальных данных на человека массой 70 кг DL50 составит около 3,5 л для экстракта родиолы и около 23,5 л для препарата РР-1. Сомнительна возможность одновременного приёма такого количества препарата, приготовленного на 40% этаноле.

В субхроническом эксперименте нами была определена МПД препарата РР-1 для мышей и для крыс при энтеральном введении. Она составила 85 мл/кг (0,25 DL50). Эти данные были использованы при исследовании хронической токсичности препарата РР-1. В своих экспериментах мы испытывали дозы, которые в 2000 и 10000 раз превышали средние эффективные суточные дозы препарата для человека, составляющие соответственно 17 и 85 мл/кг. Эти дозы эквивалентны 1/5 и 1 МПД.

В результате нами не было обнаружено достоверного влияния препарата РР-1 ни на один из многочисленных изученных показателей даже при столь длительном (6-мес.) введении и в таких высоких дозах.

Многочисленные литературные данные и наши собственные исследования свидетельствуют о том, что препараты из натурального корня родиолы также практически не проявляют токсического

действия при длительном систематическом применении [1].

Выводы

1. Препараты родиолы розовой – как природного, так и биотехнологического происхождения – показали себя чрезвычайно низкотоксичными и высокобезопасными по показателям острой и хронической токсичности.

2. Острая токсичность (DL50) препарата РР-1 в 4-6 раз ниже, чем у официального экстракта родиолы.

Список литературы

1. Крендаль Ф.П., Козин С.В., Левина Л.В. Сравнительная характеристика препаратов из группы фитоадаптогенов-женьшеня, элеутерококка и родиолы розовой. М.: ПРО-ФИЛЬ. 2007. 392 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. М.: ОАО Издательство «Медицина». 2005. 832 с.

Comparison of general toxic effect of drugs *Rhodiola roseae* of biotechnology and natural origin

S.V. Kosin, F.P. Krendal, L.V. Levina, V.N. Chubarev

Laboratory study was conducted toxicity (acute and chronic toxicity) of the drug from the tissue culture biomass of *Rhodiola roseae* according to the legal requirements for such studies and compare it with the preparation of the natural root of *Rhodiola roseae*. Both drugs have shown low toxicity and high safety even in long-term regular use. Biotechnological preparation even superior in terms of natural acute toxicity (DL50).

Key words: *Rhodiola roseae*, biological substance of the tissue culture, laboratory study, acute toxicity, chronic toxicity.

Оценка безопасности биотехнологического женьшеня в эксперименте

Р.Н. Аляутдин¹, Ф.П. Крендаль^{1,2}, С.В. Козин², Л.В. Левина²,
Н.Г. Преферанская¹, В.Н. Чубарев¹

¹ – Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

² – Лаборатория экстремальных состояний НИЦ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Было проведено изучение безопасности применения препарата из биомассы культуры ткани женьшеня на лабораторных животных в остром и хроническом опыте. В качестве тестов использовались стандартные методы лекарственной токсикологии: функциональные, гематологические, биохимические, гистологические, иммунные, интегральные и др. В результате была доказана высокая безопасность и низкая токсичность изучаемого препарата.

Ключевые слова: женьшень, биомасса культуры ткани, лабораторные животные, безопасность, DL50, хроническая токсичность, иммуностропное действие.

Поиск новых безопасных адаптивных средств, повышающих общую неспецифическую резистентность организма к различным неблагоприятным факторам (стресс, повышенная радиация, гипоксия и др.), является актуальной задачей современной фармакологии. Известно успешное применение с этой целью адаптогенов растительного происхождения – женьшеня, родиолы розовой и других [1]. Вместе с тем, природные запасы женьшеня весьма ограничены, он занесен в Красную книгу, а взрыв атомной электростанции в Японии и утечка радиации поставили под вопрос возможность заготовок культивируемого женьшеня в традиционном для его выращивания ареале – Дальневосточном регионе. В этой связи, введение женьшеня в культуру ткани с помощью биотехнологических методов позволяет получить сырье в короткие сроки и в необходимом для фармацевтической индустрии количестве, без опасения неблаго-

приятного влияния окружающей среды, в том числе риска радиационного заражения получаемой в ферментере биомассы корня. Таким образом, препараты из биомассы культуры ткани женьшеня могут представлять интерес в качестве источника лекарственного сырья, что ставит вопрос о необходимости определения безопасности биотехнологического препарата.

Цель – провести комплексное изучение безопасности настойки биомассы культуры ткани женьшеня (НБКТЖ) с помощью стандартных токсикологических, биохимических, гематологических, иммунологических и гистоморфологических методов в остром и хроническом эксперименте на животных.

Материалы и методы

Перед началом эксперимента, с целью исключения влияния спирта, со-

державшегося в настойках, их выпаривали на ротаторном испарителе до сухого остатка, который затем разводили дистиллированной водой до необходимого объема.

Регулирующие стандарты на момент проведения эксперимента соответствовали ГОСТу Правил лабораторной практики и основывались на гуманном отношении к лабораторным позвоночным животным, используемым для экспериментальных и научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986). Острую токсичность (LD50) НБКТЖ и препарата сравнения – официальной настойки женьшеня (НЖ) изучали и при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении на нелинейных мышах-самцах массой 18-25 г и крысах-самцах массой 180-250 г. Определение хронической токсичности препарата из биомассы культуры ткани женьшеня проводили на линейных крысах-самцах, массой 180-250 г в течение 6 мес. при ежедневном пероральном введении в дозах 0,6 мл/кг и 6,0 мл/кг. При этом, доза 6,0 мл/кг превышала среднюю терапевтическую (0,6 мл/кг) в 100 раз. Для исследования безопасности НБКТЖ:

1. Проводилось сравнительное изучение LD50 и НБКТЖ.

2. Биохимическими, гистоморфологическими, гематологическими методами определялась хроническая токсичность препарата НБКТЖ на организм в целом и на отдельные функциональные показатели важнейших систем организма (ЦНС, сердечно-сосудистую и др.).

3. Изучалось влияние НБКТЖ на иммунную систему.

4. Изучалось местнораздражающее действие НБКТЖ.

5. Результаты обрабатывались с помощью стандартных статистических методов.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных экспериментов установлена чрезвычайно низкая LD50 НБКТЖ при пероральном введении, составившая для мышей 200 мл/кг и для крыс – 750 мл/кг. Острая токсичность НЖ была ниже, чем у НБКТЖ, и в экспериментах на крысах при пероральном введении превышала 750 мл/кг.

Изучение хронической токсичности НБКТЖ в терапевтической дозе 0,6 мл/кг в течение 6 мес. по показателям, характеризующим состояние ЦНС, дыхательной и сердечно-сосудистой системы, крови, печени, почек, иммунной системы, не выявило статистически значимых отклонений от нормы по токсикологическим, биохимическим, гематологическим, иммунологическим и гистоморфологическим параметрам.

Функциональные показатели – частота сердечных сокращений, частота дыхания, масса тела, суммация подпороговых импульсов, экскреторная функция печени (бромсульфалеиновая проба) – были в пределах нормы, в дозах 0,6 и 6,0 мл/кг. В дозе, превышающей терапевтическую в 100 раз (6,0 мл/кг), отмечалось повышение ректальной температуры с $35,62 \pm 0,28$ в контроле до $36,12 \pm 0,15$ в опыте. Однако указанное отклонение не имеет существенного значения для оценки токсического действия НБКТЖ, так как абсолютное значение его весьма незначительно ($0,5^\circ\text{C}$), а относительные колебания лежат в пределах физиологической нормы.

По гематологическим показателям – уровню гемоглобина, количеству

эритроцитов, лейкоцитов, СОЭ и лейкоцитарной формуле – в дозах 0,6 и 6,0 мл/кг мы не выявили никаких достоверных отличий в опытной группе от контрольной при $P=0,05$.

По биохимическим показателям – уровню мочевины, креатинина, мочевой кислоты, ЛДГ, ЩФ и др. – в терапевтической дозе 0,6 мл/кг не выявлено никаких отклонений от контроля. Заслуживает внимания факт повышения в дозе 6,0 л/кг уровня аланиновой аминотрансферазы с $48,11 \pm 3,24$ ммоль/(чхл) в контроле до $58,90 \pm 7,49$ в опыте. Данные биохимические сдвиги коррелировали с гистоморфологическими изменениями клеточных элементов печени крыс, которые указывали на ее незначительную жировую дистрофию от сверхвысоких доз НБКТЖ при хроническом введении. В других внутренних органах в дозе 6 мл/кг никаких изменений, свидетельствовавших о токсическом действии НБКТЖ, не обнаружено. Несмотря на указанные небольшие биохимические и гистоморфологические отклонения в печени, отмечалась ее полная функциональная сохранность, на что указывало то, что уровень холестерина, билирубина и бромсульфалеиновая проба были в пределах нормы. Показатели щелочной фосфатазы и лейцинаминопептидазы не отличались от таковых в контроле, что свидетельствует об отсутствии холестаза. Показатели лактатдегидрогеназы и аспарагиновой аминотрансферазы также были в пределах нормы. Уровень глюкозы при 6-мес. введении НБКТЖ достоверно снижался с $7,47 \pm 0,52$ ммоль/л в дозах 0,6 мл/кг и 6,0 мл/кг соответственно до $6,22 \pm 0,46$ ммоль/л ($P=0,01$) и $6,63 \pm 0,41$ ($P=0,02$). Обнаруженное нами гипогликемическое действие

НБКТЖ хорошо согласуется с данными других авторов [2], отмечавших у препаратов женьшеня наличие способности снижать сахар крови. Можно предположить, что гипогликемия вызвана общей стимуляцией обмена веществ и улучшением утилизации глюкозы тканями, в том числе и печенью.

Выводы

Комплексное исследование безопасности настойки из биомассы культуры ткани женьшеня токсикологическими, биохимическими, гистоморфологическими методами в терапевтических дозах (0,6 мл/кг) не выявило какого-либо отрицательного влияния на организм в целом, а также на отдельные функциональные показатели ЦНС, иммунной, сердечно-сосудистой и других важнейших систем организма при 6-мес. определении хронической токсичности.

Изучение настойки из биомассы культуры ткани женьшеня в остром и хроническом эксперименте указывает на широкий предел безопасности препарата.

Список литературы

1. Крендаль Ф.П., Козин С.В., Левина Л.В., под ред. С.В. Грачева. Сравнительная характеристика препаратов из группы фитоадаптогенов-женьшеня, элеутерококка и родиолы розовой. М.: ПРОФИЛЬ. 2007. 392 с.
2. Молоковский Д.С. О некоторых механизмах повышения резистентности организма при применении препаратов женьшеня и других фитоадаптогенов // Дисс. канд.биол.наук. Л. 1990. 192 с.

The safety of evaluation of biotechnology ginseng in the experiment

R.N. Alyautdin, F.P. Krendal, S.V. Kosin, L.V. Levina,
N.G.Preferanskaya, V.N. Chubarev

The study of the drug from biological substance of the tissue culture of ginseng of safety in laboratory animals in acute and chronic experiments was conducted. Standart methods of drug toxicology was used: functional, hematological, biochemical, histological, immune, integrated etc. In result the high safety and low toxicity of the investigational product has been proved.

Key words: Panax ginseng, biological substance of the tissue culture, laboratory animals, safety, DL50, chronic toxicity, immune effect.

Стресс-протекторная фитотерапия

Р.Н. Аляутдин, М.Д. Гусейнов, И.Н. Зильфикаров, Б.К. Романов

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

Стандартными стресс-протекторными средствами являются анксиолитики, обладающие нежелательными эффектами, ограничивающими их применение. Поэтому представляет интерес поиск эффективных, безопасных и высококомплаентных фитотерапевтических стресс-протекторных препаратов.

Цель исследования – изучение анксиолитической и седативной активности сухих экстрактов пиона, пассифлоры, полыни эстрагон и валерианы лекарственной. Исследование выполнено на 850 белых беспородных крысах-самцах. Модели острого стресса – методика нервно-мышечного напряжения по Селье (иммобилизационный стресс), методика эмоционально-болевого стресса под действием электрического тока, метод «четырёх пластин». Сравнительная оценка выявила, что валериана лекарственная и пассифлора обладают дозозависимыми профилактическим и лечебным эффектами при любом пути введения.

Ключевые слова: стресс, фитотерапия, стресс-протекторы.

Жизнь в условиях психоэмоциональных нагрузок, постоянного переутомления и хронического стресса приводит к появлению различных симптомов, вынуждающих обращаться за врачебной помощью 10-20% людей (по данным разных авторов).

Канадский ученый Ганс Селье назвал стрессом неспецифический ответ организма на любое изменение, требующее перестройки и адаптации. Иными словами,

стресс – это многокомпонентный ответ организма на любое стрессорное событие. В период стресса наблюдаются адаптационные изменения на физиологическом, психическом и поведенческом уровнях [5].

На сегодняшний день не вызывает сомнений роль стресса в развитии многих социально-значимых заболеваний, ухудшающих качество жизни и сокращающих продолжительность жизни. Ганс Селье описал триаду изменений, харак-

терную для любого выраженного стресса: гипертрофия коры надпочечников, инволюция тимуса, образование язв в желудочно-кишечном тракте. Стресс является признанным фактором риска развития неврозов, неврозоподобных пограничных и психопатических состояний.

Профилактика стресса и стресс-индуцированных процессов является важной задачей современного общества. В настоящее время для профилактики и лечения стресса используются психотропные препараты различных фармакологических групп: адаптогены, седативные средства, анксиолитики (транквилизаторы) и даже антидепрессанты и нейролептики [2].

Стандартными средствами фармакотерапии неврозов являются анксиолитики и седативные препараты. В настоящее время наиболее часто применяются синтетические транквилизаторы – производные бензодиазепинов, которые обладают рядом нежелательных побочных явлений, ограничивающих их применение, особенно в условиях непрекращающейся трудовой деятельности, связанной с необходимостью концентрации внимания при операторской деятельности и вождении транспорта.

Тяжелыми побочными эффектами при применении бензодиазепинов являются: развитие лекарственной зависимости, угнетение дыхательного центра, миорелаксация с нарушениями равновесия и падениями, привыкание, синдром отмены и т.д. Учитывая столь широкий перечень нежелательных явлений, ограничивающих их применение, представляется актуальным поиск альтернативных препаратов растительного происхождения с отсутствием вышеперечисленных побочных эффектов [1].

Одним из перспективных направлений поиска эффективных, но безопасных

стресс-протекторных средств является экспериментальное изучение препаратов растительного происхождения, которые включают в свой состав комплекс биологически активных веществ и проявляют широкий спектр фармакологической активности [3].

Ассортимент растительных препаратов довольно разнообразен. К препаратам растительного происхождения, которые обладают седативными свойствами и могут использоваться для лечения и профилактики последствий стресса, можно отнести валериану, пустырник, боярышник, хмель, пион, пассифлору, мелису, вереск, душицу, зверобой, полынь эстрагон. Эти растительные средства эффективны при нарушениях сна, повышенной раздражительности и тревожности. Немаловажно, что отмечена высокая комплаентность больных, которым назначали фитотерапевтические препараты. По данным ВОЗ, до 80% населения планеты предпочитают лечиться лекарственными средствами природного растительного происхождения. Метод фитотерапии зарегистрирован в РФ и разрешен к применению даже в педиатрии, он практически не имеет противопоказаний, обладает широким спектром профилактических и лечебных видов действия и может применяться как самостоятельно (при неосложненных формах заболеваний), так и в составе комплексной терапии ряда заболеваний ЦНС.

Исходя из этого, представляет интерес поиск лекарственных растений с психотропной активностью, обладающих низкой токсичностью и не уступающих по выраженности фармакологического эффекта современным синтетическим препаратам.

Целью нашего исследования явилось изучение анксиолитической и седатив-

ной активности сухих экстрактов пиона, пассифлоры, полыни, эстрагон и валерианы.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 850 белых беспородных половозрелых крысах-самцах (85 групп по 10 животных в каждой группе), в возрасте 1,5-4 мес., весом 170-230 г. Использовались две модели острого стресса – методика нервно-мышечного напряжения по Селье (иммобилизационный стресс) и методика эмоционально-болевого стресса под действием электрического тока [4].

Плацебо-контролируемая активность препаратов оценивалась в дозах 8,58; 17,16; и 34,32 мг/кг, что с учетом использования видовых коэффициентов пересчета соответствует 100, 200 и 400 мг/70 кг веса человека. Использовались два пути введения – внутрь и внутримышечно, с приготовлением разведений сухих экстрактов в воде для инъекций, в дозах 1,7; 3,4; и 6,8 мг. Препараты вводились как профилактически – за 30 мин. до начала острого стресса, с последующим изучением эффекта через 2 ч после завершения стресса, так и для лечения – непосредственно после завершения стрессорного воздействия с исследованием терапевтического эффекта спустя 3-5 ч.

Предварительную оценку безопасности препаратов проводили субхронически – при ежедневном введении в течение 1 мес. Оценивались коэффициенты массы надпочечников и тимуса, а также частота развития стрессорных язв желудка.

Достоверность различий частот в группах определяли при помощи критерия хи-квадрат. Для таблиц два на два использовалось точное решение Фишера.

Результаты и их обсуждение

Сравнительная оценка выявила, что достоверное различие с контролем и плацебо имели валериана лекарственная и пассифлора, обладающие дозозависимыми профилактическим и лечебным эффектами при любом пути введения. Ни один из исследуемых сухих экстрактов не оказывал значимых нежелательных эффектов. Для сухих экстрактов этих двух растений было проведено изучение наличия бензодизеипинового механизма действия.

Наличие анксиолитического действия оценивали методом четырех пластин, основанным на подавлении ориентировочно-исследовательского поведения грызунов электролевым раздражителем. Крысу помещали на одну из четырех пластин, составляющих пол камеры, и после ознакомления с обстановкой (15 – 30 сек.), при переходе животного с пластины на пластину, оно получало болевое раздражение, подаваемое через пол, в результате чего повышался уровень тревожности и уменьшалось число переходов. Эффект анксиолитиков заключается в уменьшении страха получения болевого наказания и в увеличении числа переходов по пластинам.

В дозе 15 мг/кг антагонист бензодиазепиновых рецепторов флумазенил вызывал специфический дозозависимый сдвиг в сторону нормы условно-рефлекторного поведения крыс, получавших экстракт валерианы, и не изменял эффект пассифлоры.

Следующим этапом исследований было разделение экстракта валерианы лекарственной на фракции и изучение фармакологической активности каждой из этих фракций на наличие стресс-протекторной активности.

Были получены три фракции: фенольная, кислотная и липофильная. Анксиолитическое действие каждой из фракций оценивалось методом четырех пластин. Эксперимент проводился в два этапа. На первом этапе определяли наиболее активную фракцию. На втором этапе определяли, в какой дозировке данная фракция наиболее активна. Этот эксперимент был выполнен на 35 белых молодых крысах-самцах весом 182 ± 11 грамм (5 групп по 7 крыс в каждой группе):

1. Плацебо-контроль – введение физ. раствора внутрь по зонду;

2. Пустырника экстракт сухой – 17,16 мг/кг внутрь по зонду;

3. Валерианы экстракта кислотная фракция – 17,16 мг/кг внутрь по зонду;

4. Валерианы экстракта липофильная фракция – 17,16 мг/кг внутрь по зонду;

5. Валерианы экстракта фенольная фракция – 17,16 мг/кг внутрь по зонду.

6. Наибольшую активность на первом этапе эксперимента проявила липофильная фракция. На втором этапе изучали, в какой дозе липофильная фракция обладает максимальной фармакологической активностью. Использовались следующие дозы препарата:

1. Плацебо-контроль – введение физ. раствора внутрь по зонду;

2. Валерианы экстракта липофильная фракция – 8,58 мг/кг внутрь по зонду;

3. Валерианы экстракта липофильная фракция – 17,16 мг/кг внутрь по зонду;

4. Валерианы экстракта липофильная фракция – 34,32 мг/кг внутрь по зонду;

5. Валерианы экстракта липофильная фракция – 68,64 мг/кг внутрь по зонду.

Выводы

Выявлено, что наибольшей фармакологической активностью обладает липофильная фракция валерианы в дозах 17,16 мг/кг и 34,32 мг/кг, что с учетом использования видовых коэффициентов пересчета соответствует 200 и 400 мг/70 кг веса человека.

Сделано предположение, что липофильная фракция экстракта валерианы лекарственной может быть использована в клинических исследованиях стресс-протекторного действия.

Список литературы

1. **Аведисова А. С.** К вопросу о зависимости к бензодиазепинам // Психиатр. и психофармакол. 1999. № 1. С. 24–25.

2. **Аляутдин Р.Н.** Фармакология – 4-е издание, перераб. и доп. М.: ГЭОТАР. МЕДИА. 2008г. 832 с.

3. Государственный реестр лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению. М.: 2002.

4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У.Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО Издательство «Медицина». 2005г. 832 с.

5. **Селье Г.** Стресс без дистресса. М. 1979.

Stress-protector herbal medicine

R.N. Alyautdin, M.D. Guseynov, I.N. Zilfikarov, B.K. Romanov

Standard stress-protector means are benzodiazepines, possessing the undesirable effects limiting their application. Search effective, safe and compliens phytotherapeutic stress-protector of preparations therefore is of interest. Research objective – studying anxiolytical and sedative activity of dry extracts of a peony, a passionflower, a wormwood a tarragon and valeriana medicinal. Research is executed on 850 white not purebred rats-males. Models of sharp stress – a technique of nervously-muscular pressure on Sele (immobilisation), a technique of emotionally-painful stress under the influence of an electric current, a method of "four plates». The comparative estimation has revealed that valeriana medicinal and a passionflower possess dose-relativ preventive and medical effects at any way of introduction.

Key words: stress, herbal medicine, stress-protector.

Современные критерии оценки безопасности состава лекарственных препаратов

О.И. Терёшкина

НИИ фармации Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва

Контактная информация: Терёшкина Ольга Ивановна oiter@rambler.ru

На основании результатов сравнительных информационно-аналитических исследований данных литературы, современных требований и рекомендаций отечественной и ведущих зарубежных фармакопей, нормативно-методических документов по вопросу оценки безопасности вспомогательных веществ и примесных соединений разработаны гармонизированные критерии оценки безопасности состава лекарственных препаратов.

Ключевые слова: вспомогательные вещества, примеси, безопасность, состав лекарственного препарата.

В соответствии с действующим определением, безопасность лекарственных средств – характеристика, основанная на сравнительном анализе их эффективности и оценки риска причинения вреда здоровью [4]. Оценка потенциального риска для лекарственных препаратов должна базироваться на сумме научных знаний обо всех возможных аспектах опасности [5]. В связи с современным представлением о безопасности вспомогательных веществ и новым подходом

к оценке безопасности примесей, нельзя не учитывать потенциальный риск вспомогательных веществ и примесных соединений при оценке безопасности состава лекарственного препарата. В подходах к оценке безопасности вспомогательных веществ и примесей в составе лекарственных препаратов может быть много общего с пищевыми и косметическими продуктами, однако, в связи с особенностями применения лекарственных средств у человека, решение проблемы

должно иметь собственное методологическое обоснование.

Цель исследований – разработка подхода к оценке безопасности состава лекарственного препарата с учетом оценки безопасности вспомогательных веществ и примесей.

Материалы и методы

Проведены сравнительные информационно-аналитические исследования данных литературы, современных требований и рекомендаций отечественной и ведущих зарубежных фармакопей, нормативно-методических документов по вопросу оценки безопасности вспомогательных веществ и примесных соединений [2, 3].

Результаты и обсуждение

В связи с современным представлением о вспомогательном веществе как о веществе с собственным биологическим потенциалом, его безопасность должна базироваться не только на оценке функциональной пользы, но и потенциального риска. В результате проведенных исследований установлены основные современные критерии, с учетом которых необходимо оценивать безопасность каждого вспомогательного вещества. Так, для правильности проведения оценки безопасности необходима точность в идентификации вспомогательных веществ по непатентованному и химическому названию, номеру CAS, молекулярной массе, структурным и эмпирическим формулам, возможным синонимам. В определении регуляторного статуса вспомогательного вещества следует учитывать факт его включения в фармакопею, для пероральных лекар-

ственных форм – разрешение применения в качестве пищевой добавки в составе продуктов питания (статус GRAS), для наружных лекарственных форм – в качестве компонента косметической продукции. Современное представление о тесной взаимосвязи качества субстанции вспомогательного вещества и безопасности его применения подтверждает необходимость обязательного соответствия вспомогательного вещества фармакопейным требованиям. Важной характеристикой его безопасности является профиль токсикологически значимых примесей, в том числе остаточных органических растворителей, чем обусловлена необходимость предоставления полной информации о технологии получения вспомогательного вещества и оценки спецификаций. Для красителей обязательным условием является соответствие спецификациям ФАО/ВОЗ и дополнительные требования к чистоте, для вспомогательного вещества животного происхождения – оценка вирусной и прионовой безопасности. Важным критерием является и количественное содержание вспомогательного вещества. Для определенных вспомогательных веществ, их количество не должно превышать пределов допустимого содержания, указанных в фармакопее в зависимости от вида лекарственной формы (например, таблетки, инъекции). Содержание ряда вспомогательных веществ в суточной дозе применяемых внутрь препаратов не должно превышать значений допустимого суточного потребления, определенных ФАО/ВОЗ для пищевых добавок, установленных на основании проведения полноценных токсикологических исследований с учетом фактора безопасности применения у человека в течение жизни. Важными критериями оценки безопасности явля-

ются также путь и длительность введения, в связи со значимостью которых изменилась и трактовка определения «новое вспомогательное вещество», и, вследствие этого, категория вспомогательных веществ, для которых необходимо проведение токсикологических исследований в полном объеме. Целевая популяция пациентов – возрастная группа, и показания к применению – следующие современные критерии оценки безопасности вспомогательных веществ, особенно для лекформ, используемых в педиатрии, принимая во внимание возможную чувствительность данной возрастной группы. Так, недопустимо применение красителей, обусловленное только эстетической целью, в препаратах, предназначенных для использования в педиатрии. Критерий «серьезность показаний» – для вспомогательных веществ, для которых установлены канцерогенные, мутагенные или репротоксические свойства (категория CMR). Данная категория вспомогательных веществ должна быть запрещена к применению и заменена другими. В редких случаях, когда такое замещение невозможно, использование категории CMR может быть рассмотрено после тщательной оценки пользы и потенциального риска для целевой популяции пациентов. Для вспомогательных веществ с установленными репротоксическими свойствами при оценке пользы и риска рекомендуется принимать во внимание возраст, репродуктивный статус и специфическую чувствительность популяции пациентов. Для негеноотоксичных канцерогенов (при исследовании на грызунах) рекомендуется учитывать релевантность механизма туморогенеза и коэффициента безопасности для человека. Важным критерием безопасности применения является и критерий совме-

стимости как аспект возможного физического и химического взаимодействия с образованием токсикологически значимых продуктов. Систематизированная информация о потенциальной несовместимости вспомогательных веществ включена в справочные издания о вспомогательных веществах. Среди вспомогательных веществ выделяются группы, к которым предъявляются особые требования в отношении безопасности, введение которых требует специального обоснования – например, антиоксиданты и антимикробные консерванты. Указанные вещества опасны для живых клеток, поэтому представляют определенный риск для человека. Использование данных веществ нежелательно, особенно в детских лекарственных формах, введение в состав лекарственного препарата и содержание в препарате должно быть обосновано в каждом отдельном случае, введение возможно только в минимально эффективных количествах. Для принятия решения о достаточности сведений о безопасности нового вспомогательного вещества необходимо также наличие информации о биодоступности и биотрансформации. В случае невозможности получения такой информации (например, комплексной природы вспомогательного вещества или биотрансформации до физиологических продуктов) должно быть представлено весомое аргументированное обоснование. Ранее действовавший алгоритм оценки безопасности был основан на идее отсутствия у вспомогательного вещества фармакологической активности. В соответствии с современными представлениями, вспомогательное вещество может либо не проявлять фармакологическую активность, либо проявлять ограниченную и направленную фармакологическую активность. В

связи с этим, необходима информация о результатах исследования фармакологической безопасности (действие на главные органы и системы): потенциальной фармакологической активности вспомогательного вещества на стандартной батарее тестов по оценке фармакологической безопасности (ICH guidance S7A). Вывод о потенциальной безопасности вспомогательного вещества в составе лекарственной формы конкретного препарата можно делать только с учетом анализа информации по указанным выше критериям в совокупности, при ее недостаточности – необходимо проведение дополнительных исследований.

В соответствии с современными представлениями, в понятии «токсикологический профиль» лекарственного препарата важное место занимает токсикологический профиль его примесей: их природы, свойств, пределов допустимого содержания. В ряде случаев наличие токсикологически значимых примесей продукта может играть решающую роль не только в вопросе качества, но и безопасности медицинского применения лекарственного препарата. Подход к изучению примесей в лекарственных препаратах отечественной токсикологии в краткой форме изложен в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (Москва, 2005 г.) [1]. В соответствии с указаниями Руководства, предусмотрено токсикологическое изучение фармакологического вещества или лекарственной формы препарата с указанными по проекту нормативного документа нормами примесей. Отмечено, что если характеристика фармакологических веществ меняется, например, в результате модификации способа получения субстанции или лекарственной формы, следует оценивать влияние

этого изменения в связи с данными, полученными при токсикологическом изучении исходного фармакологического вещества. В действующих документах отсутствуют рекомендации по токсикологическому изучению профиля примесных соединений: их идентификации, влияния на токсикологический профиль фармакологического вещества, установления пределов допустимого содержания. В основе разработанного гармонизированного подхода к оценке безопасности примесных соединений – их токсикологическая значимость, установленная на основании доклинических исследований примесей. Наряду с химическим аспектом оценки примесей, включающим определение понятий, классификацию, методологию их качественного и количественного определения, предусмотрен и аспект безопасности, включающий квалификацию примесей потенциально возможных или присутствующих в образцах, на которых проводятся доклинические и клинические исследования безопасности. Главный принцип оценки – уровень любых примесей нового фармакологического вещества, изучаемого в токсикологических доклинических и клинических исследованиях, – должен быть квалифицирован посредством приемлемых с точки зрения безопасности критериев. В зависимости от результатов исследований, определяется предел допустимого содержания примесей в субстанции или в суточной дозе лекарственного препарата. Сложность решения проблемы для лекарственных препаратов усугубляется необходимостью комплексной оценки примесей действующего вещества, вспомогательных веществ, продуктов деструкции, а также примесей, экстрагируемых из первичной упаковки. Одной из важных задач при доклиническом ис-

следовании оригинальных препаратов является и изучение токсикологического профиля метаболитов. Для воспроизведенных продуктов токсикологический профиль примесей обусловлен технологией получения субстанции действующего вещества и составом вспомогательных веществ лекарственных форм. Профиль примесей зависит от природы действующих и вспомогательных веществ. Так, для препарата природного происхождения профиль потенциальных токсикологически значимых примесей может включать в себя недеklarированные примеси (сильнодействующие вещества не природного происхождения), для лекарственных растительных препаратов, кроме того – примеси токсикологически значимых контаминатов (тяжелые металлы, остаточные пестициды, органические растворители, радионуклиды, микотоксины), для препаратов животного происхождения – примеси прионов и вирусов. Объем токсикологических исследований примесей должен включать в себя изучение острой и хронической токсичности, а также генотоксического потенциала и, при необходимости, исследования других видов специфической токсичности. На основании результатов токсикологического изучения примесей и оценки их влияния на токсикологический профиль продукта, можно делать вывод и о пределах их допустимого содержания в лекарственном препарате с учетом дозы, пути введения, рекомендуемого курса, в соответствии с режимом дозирования препарата по проекту инструкции.

Выводы

1. На основании проведенных исследований разработаны гармонизированные критерии оценки безопасности

вспомогательных веществ в составе лекарственных препаратов.

2. Вывод о потенциальной безопасности вспомогательного вещества в составе лекарственной формы конкретного препарата можно делать только с учетом анализа информации по указанным критериям и на основании оценки результатов токсикологических исследований.

3. Пределы допустимого содержания примесей в субстанциях и лекарственном препарате должны быть установлены на основании результатов квалификации профиля примесей и рекомендуемого объема токсикологических исследований примесей.

4. В процессе оценки безопасности состава препарата необходимо оценивать профиль примесей и соответствие их количества рекомендуемым пределам допустимого содержания с учетом дозы, пути введения и рекомендуемого курса применения препарата.

Список литературы

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессор Р.У.Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина». 2005. 832 с.
2. **Терёшкина О.И., Гуськова Т.А.** Международный опыт оценки примесных соединений в лекарственных препаратах // Токсикологический вестник. 2010. № 5. С. 32-35.
3. **Терёшкина О.И.** Особенности доклинической оценки безопасности вспомогательных веществ в составе лекарственных препаратов // Токсикологический вестник. 2010. № 5. С. 23-26.
4. Федеральный закон «Об обращении

нии лекарственных средств» № 61. от 12.04.2010 г.

5. Q9 Управление рисками качества. Гармонизированное трехстороннее руководство ICH. 2005. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002873.pdf

Modern criteria of medical products composition safety estimation

O.I. Tereshkina

Based on the results of comparative information and analytical studies of the literature, current requirements and recommendations of national and leading foreign pharmacopoeias, regulatory and procedural documents on the safety assessment of excipients and impurity compounds developed the harmonized criteria for assessing the safety of medicines.

Key words: excipients, impurities, safety, composition of the drug.



Влияние альгината кальция на Th1 и Th2 иммунный ответ

М.Г. Данилец¹, Ю.П. Бельский¹, Н.В. Бельская¹, Е.С. Трофимова¹,
Е.Г. Учасова¹, А.А. Лигачева¹, А.Н. Иванова¹, В.В. Ковалев²,
Ю.С. Хотимченко²

¹ – Научно-исследовательский институт фармакологии СО РАМН, Томск

² – Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток

Контактная информация: М.Г. Данилец 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3; Ю.С. Хотимченко 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

В присутствии альгината кальция ЛПС-индуцированная выработка макрофагами мыши IL-12 не изменялась, а IL-10 подавлялась; увеличивалась продукция оксида азота нестимулированных клеток, при этом активность аргиназы не менялась. Курсовое введение альгината кальция приводило к стимуляции Th1 иммунных реакций.

Ключевые слова: цитокины, Th1 и Th2 иммунный ответ, макрофаг.

Макрофагальные клетки являются связующим звеном между иннатным и адаптивным иммунитетом. В раннюю фазу развития иммунного ответа макрофаги активируются и направляют поляризацию Т-хелперов по Th1 или Th2 пути [20]. Классически активированные макрофаги (M1) обладают повышенной способностью презентировать антиген, продуцировать IL-12, IL-23, IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, вырабатывать токсические медиаторы (оксид азота, радикальные формы кислорода). Такие M1 клетки являются мощными противоопухолевыми и противомикробными агентами. Напротив, иные сигналы, такие как IL-4, IL-13, глюкокортикоиды, IL-10, комплекс иммуноглобулин/TLR лиганды, вызывают развитие макрофагов M2 с противо-

положными, противовоспалительными функциями, которые не проявляют противоопухолевой активности, но обладают способностью поглощать фрагменты разрушенных клеток и тканей, усиливать ангиогенез (продуцируя VEGF), восстанавливать межклеточный матрикс, промотировать опухолевую прогрессию и метастазирование [17, 18]. Краеугольным событием, определяющим судьбу поляризации, является увеличение выработки антигенпрезентирующими клетками главного Th1-направляющего цитокина – IL-12 [22]. Другой цитокин макрофагов (IL-10) с противовоспалительными свойствами подавляет секрецию IL-12, чем опосредованно сдвигает дифференцировку лимфоцитов в Th2 [11]. Одним из важнейших различий

М1 и М2, их маркерной чертой, являются разные пути метаболизма аргинина: классически активированные макрофаги окисляют его с помощью индуцибельной NO-синтазы с образованием оксида азота и цитруллина; альтернативно активированные гидролизуют аргинин с помощью аргиназы, продуктами которой являются мочевины и орнитин [19].

Выводы

В связи с изложенным выше, нам представлялось актуальным исследовать влияние альгината кальция (АК) на макрофаги, а также оценить его действие на протекание Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа.

Материалы и методы

В экспериментах использовано 70 конвенциональных мышей линии BALB/c обоих полов, полученных из отдела биологических моделей НИИ фармакологии СО РАМН. Животные содержались в виварии при условиях, соответствующих приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»: кратность воздухообмена составляла 10-12 крат/ч, температура 22±2°C, влажность 65±10%, световой режим 12:12 ч. Животные были размещены в клетках VELAZ типа Т2 или Т3 (по 4-5 или по 6-8 особей соответственно) со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстилки, имели постоянный доступ к пище (комбикорм полнорационный для содержания мелких грызунов «Чара», ЗАО «Фирма Ассортимент») и воде (кипяченая питьевая вода, подкисленная соляной кислотой до pH 4-4,5).

Исследованный образец альгината кальция имел следующие характери-

стики: содержание уроновых кислот – 77,3%, кальция – 82,5%, карбоксильные группы были представлены в виде кальциевой соли, характеристическая вязкость – 1270 мл/г, молекулярная масса – 403 кДа.

Развитие иммунного ответа Th1 типа вызывали иммунизацией мышей эритроцитами барана. Суспензию эритроцитов барана (ЭБ) вводили внутривентрально по 5×10^6 – при определении числа антигенообразующих клеток (АОК) и титра антител, по 1×10^8 при проведении реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Контрольным животным вводили по 0,2 мл физиологического раствора хлорида натрия (ФР).

Число АОК в селезенках иммунизированных мышей определяли, как описано [5].

Титр антител в сыворотке крови определяли в реакции агглютинации [5]. Для этого животных забивали через 5 дней после иммунизации, забивали кровь из сердца и получали ее сыворотку, которую раститровывали в 96-луночном планшете с шагом $\frac{1}{2}$, добавляли ЭБ, инкубировали при 37°C 2 ч. и учитывали реакцию. За титр принимали то последнее разведение исследуемой сыворотки, при котором еще наблюдалась агглютинация.

Реакцию ГЗТ оценивали следующим образом [5]. На 5-е сутки после иммунизации животным проводили вторую (разрешающую) инъекцию ЭБ в подушечку задней лапы – «опытная лапа» (10^8 ЭБ в 0,02 мл ФР). В контрлатеральную лапу вводили 0,02 мл стерильного ФР («контрольная лапа»). Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч. по разнице массы опытной и контрольной лап и выражали в мг.

Развитие иммунного ответа Th2 типа вызывали иммунизацией мышей овальбумином. Инъекции овальбумина

(100 мкг, «Sigma») с гидроокисью алюминия (5 мг, «Sigma») делали 1 и 3 раза под кожу бедра с интервалом в 2 недели.

Для изучения влияния альгината кальция на продукцию IL-10 и IL-12 перитонеальными макрофагами животных забивали, брюшную полость промывали ледяным ФР, клетки осаждали, ресуспендировали в культуральной среде.

Продукцию NO оценивали по содержанию нитритов в супернатантах при помощи реактива Грейса.

Активность аргиназы в макрофагах определяли по ее продукту – мочеине, по модифицированной нами методике [19].

Содержание IL-10 и IL-12 определяли твердофазным иммуноферментным методом при помощи тест-систем («R&D Systems», США), согласно прилагаемым протоколам.

Для оценки влияния АК in vivo его вводили в дозе 10 мг/кг массы тела ежедневно в ФР (pH доводили до 7,4 – 7,6), контрольные животные получали то же

количество ФР. При изучении влияния на общую анафилаксию длительность введения составляла 21 день (при двукратной иммунизации, начиная с первой иммунизации). При оценке числа АОК, титра гемагглютининов и реакции ГЗТ альгинат кальция вводили на протяжении 10 дней, начиная за 10 дней до забоя животных и до введения в лапу ЭБ (для индукции ГЗТ).

Статистическую обработку проводили при помощи t-критерия Стьюдента. Различия показателей считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, альгинат кальция, как и МДП, не изменял уровень ЛПС-индуцированной выработки макрофагами IL-12. При этом альгинат кальция подавлял ЛПС-индуцированную продукцию IL-10 ($p < 0,05$), МДП не влиял на данный показатель.

Таблица 1
Влияние альгината кальция на ЛПС-индуцированную продукцию IL-10 и IL-12 перитонеальными макрофагами мыши (X±m)

Исследуемое вещество	Концентрация цитокина (пг/мл)	
	IL-10	IL-12
- (контроль 1)	0,72 ± 0,07	-
- (контроль 2)	2,28 ± 0,19*	4,4 ± 5,1
МДП	2,84 ± 0,21*	8,3 ± 4,1
Альгинат кальция	1,61 ± 0,14*#	6,3 ± 3,1

Примечания: контроль 1 – концентрация цитокина в культуре без ЛПС и исследуемых веществ; контроль 2 – концентрация цитокина в культуре ЛПС-индуцированных макрофагов; концентрация ЛПС 1 мкг/мл, МДП 10 мкг/мл и альгината кальция 20 мкг/мл; * – достоверные различия с контролем 1, $p < 0,05$; # – достоверные различия с контролем 2, $p < 0,05$.

Альгинат кальция, как и МДП, оказывал стимулирующее действие на моно-

нуклеары человека, усиливая секрецию ими TNF-α (табл. 2).

Таблица 2

Влияние альгината кальция на ЛПС-индуцированную продукцию TNF- α мононуклеарами человека (X*m)

Исследуемое вещество	Концентрация TNF- α (пг/мл)
- (контроль 1)	33,8 $\pm$ 0,8
- (контроль 2)	47,3 $\pm$ 4,1
МДП	115,5 $\pm$ 6,9*#
Альгинат кальция	78,3 $\pm$ 8,6*#

Примечания: контроль 1 – концентрация цитокина в культуре без ЛПС и исследуемых веществ; контроль 2 – концентрация цитокина в культуре ЛПС-индуцированных макрофагов; концентрация ЛПС 1 мкг/мл, МДП 10 мкг/мл и альгината кальция 20 мкг/мл; * – достоверные различия с контролем 1, p<0,05; # – достоверные различия с контролем 2, p<0,05.

Результаты исследования влияния АК на продукцию оксида азота и активность аргиназы макрофагов мыши представлены в табл. 3.

Таблица 3

Влияние альгината кальция на продукцию оксида азота (концентрация нитритов) и активность аргиназы (концентрация мочевины) перитонеальных макрофагов мыши (X*m)

Исследуемое вещество		Концентрация нитритов, мкМ	Концентрация мочевины, мкМ
Без ЛПС			
Альгинат кальция	контроль	3,5 $\pm$ 0,4	33,2 $\pm$ 0,9
	опыт	5,8 $\pm$ 0,5*	34,7 $\pm$ 0,5
МДП	контроль	2,7 $\pm$ 0,2	13,9 $\pm$ 1,7
	опыт	4,7 $\pm$ 0,5*	21,4 $\pm$ 2,5*
В присутствии ЛПС			
Альгинат кальция	контроль	32,8 $\pm$ 2,2	33,1 $\pm$ 1,1
	опыт	28,8 $\pm$ 0,9	33,7 $\pm$ 1,4
МДП	контроль	8,5 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 1,0
	опыт	12,2 $\pm$ 1,3*	19,1 $\pm$ 0,9*

Примечания: контроль – концентрация нитритов или мочевины в культуре без исследуемых веществ; концентрация ЛПС 1 мкг/мл, альгината кальция и МДП 10 мкг/мл; * – достоверные различия с соответствующим контролем, p<0,05.

Альгинат кальция не влиял на активность аргиназы как ЛПС-стимулированных, так и нестимулированных клеток. При этом альгинат кальция усиливал продукцию оксида азота не-

стимулированных клеток и не влиял на ЛПС-стимулированный уровень его выработки. МДП повышал продукцию NO макрофагами и активность аргиназы как в присутствии ЛПС, так и без него.

При изучении действия альгината кальция на иммунный ответ в части экспериментов использовался – как препарат сравнения – ликопид. Как видно из табл. 4, курсовое введение альгината

кальция и ликопида на фоне иммунизации ЭБ приводило к повышению количества антителообразующих клеток и титру продуцируемых гемагглютининов, а также стимулировало реакцию ГЗТ.

Таблица 4

Влияние альгината кальция на гуморальное и клеточное звено Th1 типа иммунного ответа, индуцированного эритроцитами барана (X*m)

Исследуемое вещество	Группа	Число АОК (103/селезенку)	Титр гемагглютининов (log2)	Величина реакции ГЗТ (мг)
Ликопид	контроль	36,7 $\pm$ 6,0	5,5 $\pm$ 0,5	9,85 $\pm$ 1,73
	опыт	72,9 $\pm$ 9,7*	8,5 $\pm$ 0,5*	17,32 $\pm$ 3,01*
Альгинат кальция	контроль	36,7 $\pm$ 6,0	5,5 $\pm$ 0,5	16,7 $\pm$ 5,3
	опыт	64,0 $\pm$ 16,9*	7,0 $\pm$ 0,4*	36,4 $\pm$ 4,0*

Примечания: суточная доза ликопида 2 мг/кг, альгината кальция 10 мг/кг; * – достоверные различия с контролем.

Курсовое введение ликопида и АК не вызывало изменения в содержании IgE в сыворотке крови иммунизированных овалбумином животных. При этом альгинат кальция значительно ослаблял тя-

жесть реакции общей анафилаксии, снижая почти вдвое смертность животных в результате анафилактического шока (табл. 5).

Таблица 5

Влияние альгината кальция на Th2 тип иммунного ответа, индуцированный овалбумином (X*m)

Группа	Содержание IgE в сыворотке крови (мкг/мл)	Летальность в результате системной анафилаксии (%)
Контроль	4,90 $\pm$ 0,64	100 90
Ликопид	4,36 $\pm$ 1,11	100 90
Альгинат кальция	4,62 $\pm$ 0,94	80 44

Примечание: суточная доза ликопида 2 мг/кг, альгината кальция 10 мг/кг.

Проведенные исследования показали, что альгинат кальция in vitro стимулирует продукцию макрофагами мыши оксида азота (табл. 3), который является медиатором их бактерицидной и цитолитической активности; подавляет се-

крецию макрофагами IL-10 (табл. 1) и усиливает выработку мононуклеарами человека TNF- α (табл. 2).

Эти результаты согласуются с данными других авторов [12, 15, 24]. Так, было показано, что олигомеры альгината сти-

мулируют продукцию TNF- α , G- и GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, при этом наблюдалась четкая зависимость между структурой и степенью активации продукции этих цитокинов [12, 24]. Другие авторы, изучавшие действие некоторых олигомеров альгината на макрофаги, также обнаружили повышение продукции TNF- α , которая явилась следствием взаимодействия альгината с паттерн-распознающими рецепторами TLR2 и TLR4 [8]. О наличии у альгината способности усиливать провоспалительные характеристики макрофага говорят и данные [24], которые показали, что альгинат натрия активирует макрофаги линии RAW264.7, вызывая активацию NF- κ B, который, как хорошо установлено, является основным транскрипционным фактором, обеспечивающим воспалительные реакции [6].

Классически или альтернативно активированные макрофаги интегрируются в соответствующий им тип иммунного ответа – Th1 или Th2 [17, 18]. В связи с этим, мы изучили действие альгината кальция *in vivo*, используя модели Th1 и Th2 типов иммунного ответа. По данным литературы и ранее полученным нами результатам [1, 25], схема иммунизации ЭБ, примененная в настоящей работе, приводит к развитию Th1 типа иммунного ответа. Курсовое введение альгината кальция на фоне иммунизации ЭБ стимулировало реакцию ГЗТ, повышало количество антителообразующих клеток, титр продуцируемых ими гемагглютининов, что позволило заключить о проявлении у АК способности стимулировать Th1 тип иммунного ответа.

Как известно, иммунизация мышей линии BALb/c овальбумином приводит к развитию у них Th2 типа иммунного ответа [16]. Ранее мы показали, что ре-

жим иммунизации, используемый нами в представленной работе, приводит к развитию Th2-зависимой анафилактики [2]. Курсовое введение альгината кальция почти вдвое уменьшало количество летальных исходов при развитии анафилактического шока у животных. Можно было ожидать, что в основе такого ослабления анафилактики лежит ингибирование продукции иммуноглобулинов класса E, содержание которых в сыворотке крови, как известно, является прогностическим и диагностическим критерием анафилактики [10]. Однако у однократно иммунизированных ОВА мышей, получавших курс инъекций альгината кальция, содержание IgE в крови не изменялось. Тем не менее, интегральная реакция системной анафилактики под действием АК подавлялась.

Выводы

1. Альгинат кальция при действии на макрофаги мыши *in vitro* не влияет на уровень продукции ими IL-12 и экспрессию аргиназы, подавляет выработку IL-10 и стимулирует синтез оксида азота.
2. Курсовое введение альгината кальция мышам, иммунизированным эритроцитами барана, приводит к стимуляции Th1 иммунных реакций (ГЗТ и антителообразование).
3. Курсовое введение альгината кальция подавляет Th2 иммунный ответ, индуцированный овальбумином (не влияя на количество IgE в сыворотке крови, ослабляет тяжесть системной анафилактики).

Список литературы

1. Бельская Н.В., Бельский Ю.П., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Патру-

шев В.К., Шерстобоев Е.Ю., Агафонов В.И. Иммуносупрессорная активность костномозговых клеток мышей при Th1-зависимом типе иммунного ответа. // Иммунология. Т. 26. 2005. № 5. С. 292-295.

2. Бельская Н.В., Данилец М.Г., Бельский Ю.П., Трофимова Е.С., Учасова Е.Г., Борсук О.С., Агафонов В.И. Моделирование системной анафилактики на мышах линии BALb/c. // Биомедицина. 2010. № 1. С. 37-50.

3. Савченко О.В., Кропотов А.В., Хотимченко Ю.С. Защитное действие альгината кальция при свинцовой интоксикации лабораторных животных. // Биол. Моря Т. 20. 1994. № 2. С. 163-167.

4. Савченко О.В., Хотимченко Ю.С. Энтеросорбция свинца детоксикацией у детей. // Педиатрия. 2002. № 1. С. 76-80.

5. Хаитов Р.М., Гуцин И.С., Пинегин Б.В., Зебреев А.И. Экспериментальное изучение иммуотропной активности фармакологических препаратов (методические рекомендации). // Вестник Фармакологического Комитета. 1999. № 1. С. 31-36.

6. Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor- κ B a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. // N. Engl. J. Medicine. 1997. Vol. 336. № 15. P. 1066-1071.

7. Blumenkrantz S., Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. // Anal. Biochem. 1973. Vol. 54. P. 484-489.

8. Flo T.H., Ryan L., Latz E., Takeuchi O., Monks B.G., Lien E., Halaas Q., Akira S., Skjåk-Bræk G., Golenbock D.T., Espevik T. Involvement of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in Cell Activation by Mannuronic Acid Polymers. // J. Biological Chemistry. 2002. Vol. 277. № 38. P. 35489-35495.

9. Fujihara M., Komiyama K., Umezawa I., Nagumo T. Antitumor activity and action-mechanisms of sodium alginate isolated from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. // Chemotherapy (Tokyo). 1984. Vol. 32. P. 1004-1009.

10. Gehlhar K., Schlaak M., Becker W-M., Bufer A. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. // Clinical & Experimental Allergy. 1999. Vol. 29. № 4. P. 497-506.

11. Hsieh C.S., Macatonia S.E., O'Garra A., Murphy R.M. T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*. // J. Exp. Med. 1995. Vol. 181. P. 713-721.

12. Iwamoto M., Kurachi M., Nakashima T., Kim D., Yamaguchi K., Oda T., Iwamoto Y. Structure – activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. // FEBS Letters. 2005. Vol. 576. № 2. P. 4423-4429.

13. Khotimchenko Y.S., Khotimchenko M.Y. Healing and preventive effects of calcium alginate on carbon tetrachloride induced liver injury in rats. // Marine Drugs. 2004. Vol. 2. P. 108-122.

14. Kravtchenko T.P., Pilnik A.A. Simplified method for the determination of the intrinsic viscosity of pectin solutions by classical viscosimetry. // IRL Press, Oxford. 1990. P. 281-285.

15. Kurachi M., Nakashima T., Miyajima C., Iwamoto Y., Muramatsu T., Yamaguchi K., Oda T. Comparison of the activities of various alginates to induce TNF- α secretion in RAW264.7 cells. // J. Infection and Chemotherapy. 2005. Vol. 11. № 4. P. 199-203.

16. Laitinen T. Molecular genetics provides novel insights to the treatment of

asthma. // Duodecim. 2004. Vol. 120. № 20. P. 2373-2374.

17. **Mantovani A.** Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas. // Blood. 2006. Vol. 108. № 2. P. 408-409.

18. **Mosser D.M.** The many faces of macrophage activation. // J. of Leukocyte Biology. 2003. Vol. 73. P. 209-212.

19. **Munder M., Eichmann K., Modolell M.** Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. // J. Immunol. 1998. Vol. 160. № 11. P. 5347-5354.

20. **Netea M.G., Van der Meer J.W.M., Sutmoller R.P., Adema G.J., Kullberg B.-J.** From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/Thelper bias. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005. Vol. 49. № 10. P. 3991-3996.

21. **Otterlei M., Ostgaard K., Skjak-Braek G.** Induction of cytokine production

from human monocytes stimulated with alginate. // J. Immunother. 1991. Vol. 10. P. 286-291.

22. **Paul W.E.** Th1 fate determination in CD4+ T cells: notice is served of the importance of IL-12! // J. Immunol. 2008. Vol. 181. P. 4435-4436.

23. **Son E.H., Moon E.Y., Rhee D.K., Pyo S.** Stimulation of various functions in murine peritoneal macrophages by high mannuronic acid-containing alginate (HMA) exposure in vivo. // Int. Immunopharmacol. 2001. Vol. 1. P. 147-154.

24. **Yang D., Jones K.S.** Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. // J. Biomed Mater Res. 2009. Vol. 90. № 2 P. 411-419.

25. **Yokozeki B.H., Ghoreishi M., Takagawa S., Takayama K., Satoh T., Katayama I., Takeda K., Akira S., Nishioka K.** Signal transducer and activator of transcription 6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. // J. Exp. Med. 2000. Vol. 191. № 6. P. 995-1004.

Influence of calcium alginate on Th1 and Th2 immune responses

**M.G. Danilets, Y.P. Belsky, N.V. Belska, E.S. Trofimova, E.G. Uchasova,
A.A. Ligatcheva, A.N. Ivanova, V.V. Kovalev, Y.S. Khotimchenko**

Data of the experimental study of effect calcium alginate with a molecular weight 403 kDa on murine macrophages and Th1/Th2 immune responses has been shown here. It had been demonstrated that calcium alginate affects no on IL-12 production by murine macrophages and its arginase activity, but suppresses of IL-10 and stimulates of NO production by ones. Injections of calcium alginate in animals resulted in activation of Th1 response, induced by sheep red blood cells, but decrease of weight of Th2 anaphylaxis induced by ovalbumine.

Key words: cytokine; Th1/Th2 immune responses; macrophage.

Биорелевантные среды растворения – современный инструмент для моделирования процессов растворения и всасывания ЛС

Е.А. Волкова¹, И.Е. Шохин^{1,2}, Г.В. Раменская^{1,2}, А.Ю. Савченко²

¹ – ГОУ ВПО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М.Сеченова Минздравсоцразвития России

² – ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздравсоцразвития России

Контактная информация: Алла Юрьевна Савченко alursav@mail.ru

Статья посвящена биорелевантным средам, применяемым при проведении испытания «Растворение». Приведены состав и методики приготовления современных биорелевантных сред, моделирующих кишечный сок натощак и после еды – FeSSIF, FaSSIF. Описаны особенности растворения ЛС различных классов биофармацевтической классификационной системы (БКС) в данных средах. Показаны возможные области применения биорелевантных сред.

Ключевые слова: тест «Растворение», биорелевантные среды, биофармацевтическая классификационная система (БКС), FeSSIF, FaSSIF, биовейвер, абсорбция.

На протяжении последних 30 лет испытание «Растворение» стало одним из важнейших инструментов в области контроля качества лекарственных средств [23]. В настоящее время новым направлением применения данного теста стало его использование с целью оценки взаимозаменяемости воспроизведенных лекарственных средств (ЛС) (процедура «биовейвер») [25]. В то же время, для некоторых ЛС применение классических фармакопейных буферных растворов не отражает их поведения в условиях *in vivo* с достаточной степенью достоверности [12]. Для решения данной проблемы были разработаны так называемые биорелевантные среды растворения (biorelevant media), позволяющие моделировать поведение ЛС, их растворение и абсорбцию в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ).

Биорелевантные среды растворения

Биорелевантные среды – это среды растворения, максимально приближен-

ные к внутренним жидкостям человеческого организма (кишечный, желудочный сок) по химическому составу и по физико-химическим свойствам (рН, осмолярность, буферная ёмкость, поверхностное натяжение).

Использование данных сред позволяет максимально приблизить результаты испытаний *in vitro* к показателям *in vivo* и расширить спектр исследований, включающих в себя растворение препаратов.

При проведении теста «Растворение», в отличие от традиционных буферных растворов, с помощью биорелевантных сред возможно смоделировать влияние приёма пищи на скорость и полноту растворения препаратов. Более того, применение данных сред для препаратов, относящихся ко 2 и 4 классам биофармацевтической классификационной системы (БКС), наглядно продемонстрировало сходство корреляции профилей растворения *in vitro* и фармакокинетических кривых *in vivo*, а также позволило пред-

сказать поведение липофильных, мало-растворимых веществ и абсорбцию ЛВ, относящихся к 3 классу БКС [21, 22].

Впервые о биорелевантных средах упоминается на 11 ежегодном собрании ассоциации учёных-фармацевтов в Сизтле, США в 1996 году [5]. Вышедшая на

основании данного выступления в 1998 г. публикация впервые предлагает состав «физиологических сред» для моделирования кишечного сока натощак и после еды (fasted state simulation in-testinal fluid, FaSSIF and fed state simulation intestinal fluid, FeSSIF) (табл. 1).

Таблица 1

Первый состав биорелевантных сред

FaSSIF		FeSSIF	
Натрия таурохолат	3 мМоль/л	Натрия таурохолат	15мМоль/л
Лецитин	0,75 мМоль/л	Лецитин	3,75 мМоль/л
КН ₂ РO ₄	3,9 г	Кислота уксусная	8,65 г
KCl	7,7 г	KCl	15,2 г
NaOH q.s.	pH 6,5	NaOH q.s.	pH 5,0
Вода деминерализованная q.s.	1 л	Вода деминерализованная q.s.	1 л
Осмоляльность	270±10 мОсмоль	Осмоляльность	635±10 мОсмоль
pH	6,5	pH	5,0

В данном исследовании изучались профили растворения ацетоаминофена (1 класс БКС), метопролола (1 класс БКС), даназола (2 класс БКС), мефенаминовой кислоты (2 класс БКС) и кетоназола (2 класс БКС) в различных средах: вода, FaSSIF, FeSSIF, средах, имитирующих желудочный и кишечный сок, приготовленных согласно Фармакопее США (USP 23-NF 18) [18] (Simulated Intestinal Fluid sine pancreatin SIFsp, Simulated Gastric Fluid with/without pepsin SGF/SGFsp), и молоко. Во всех случаях использовался аппарат «Лопастная мешалка», рекомендованный USP. Согласно результатам эксперимента, использование сложных комплексных биорелевантных сред при проведении теста «Растворение» для препаратов 1 класса БКС является неоправданным, поскольку препараты обладают высокой растворимостью и проницаемостью; профили их раство-

рения одинаковы при использовании как FaSSIF, FeSSIF, так и более простых сред – SGFsp. Однако для препаратов 2 класса БКС существенную роль в их растворении и абсорбции играет ионизация и кислотно-основные свойства. Для веществ нейтрального и слабокислого характера принципиально их поведение в кишечнике натощак, т.е. использование FaSSIF в исследованиях является принципиальным. Для веществ слабоосновного характера важно поведение как в желудке, так и в кишечнике натощак, т.е. исследования должны проводиться в средах SGFsp и FaSSIF.

В вышедшей ранее статье [3] предлагался слегка измененный состав биорелевантных сред. Однако принципиальных различий составы (табл. 2), предложенные Дженнифер Дрессман (Dressman Jennifer, Institute of Pharmaceutical Technology, Johann Wolfgang Goethe University), не имеют.

Таблица 2

Состав биорелевантных сред, разработанный Dressman

FaSSIF		FeSSIF	
Натрия таурохолат	5 мМоль/л	Натрия таурохолат	15мМоль/л
Лецитин	1,5 мМоль/л	Лецитин	4 мМоль/л
КН ₂ РO ₄	0,029 моль/л	Кислота уксусная	0,144 моль/л
KCl	0,22 моль/л	KCl	0,19 моль/л
NaOH q.s.	pH 6,8	NaOH q.s.	pH 5,0
Вода деминерализованная q.s.	1 л	Вода деминерализованная q.s.	1 л
Осмоляльность	280-310 мОсмоль	Осмоляльность	485-535 мОсмоль
Буферная ёмкость	10±2 Ммоль/л	Буферная ёмкость	76±2 Ммоль/л
pH	6,5	pH	5,0
FaSSGF			
HCl		0,01-0,05 моль/л	
Натрия лаурилсульфат		2,5 г	
NaCl		2 г	
Вода деминерализованная q.s.		1 л	

В вышедших в 2000-2002 гг. работах [4, 10, 12, 14, 15] было наглядно продемонстрировано преимущество использования биорелевантных сред для предсказания поведения *in vivo* малорастворимых веществ слабоосновного характера, а также липофильных веществ. Экспериментальные данные, полученные в данных исследованиях, стали основой для последующих разработок в области прогнозирования растворения и абсорбции различных классов БКС препаратов для внутреннего применения.

Наибольшая заинтересованность европейской научной общественности биорелевантными средами приходится на период, начиная с 2004 г., после того как в мае выходят две примечательные статьи. Материал одной из них посвящен сравнительному анализу фосфатного буфера, используемого для проведения теста «Растворение» и рекомендованного USP 26-NF 21 [19] состава искус-

ственного кишечного сока (SIF) [17]. Как выяснилось, одно лишь изменение ионных пропорций (Na⁺ и K⁺) не влияет на профили растворения препаратов. Вышедшая короткая обзорная статья, посвященная изысканиям группы учёных под предводительством Дженнифер Дрессман в области биорелевантных сред, наглядно продемонстрировала принципиальную разницу составов сред растворения, позволяющую максимально приблизить результаты исследований *in vitro* к прогнозируемому проведению препаратов *in vivo* [13].

Ключевым моментом в понимании особенностей кинетики растворения является осознание роли предложенных в составе среды лецитина и соли желчной кислоты – натрия таурохолата. Присутствующие в кишечном соке человека желчные кислоты эмульгируют ряд соединений, повышая их проницаемость для стенки кишечника за счет образования

мицеллярного раствора липидов в водной среде. Таким образом, в тонком кишечнике достигается максимальная абсорбция липофильных веществ, которая не будет отражена *in vitro* при использовании одних лишь фармакопейных буферных растворов. Эти данные были подтверждены рядом исследований, причем вышедшая в 2010 г. статья показала, что сама структура желчных кислот оказывает минимальное влияние, что обеспечивает гибкость в выборе самой соли как для объяснения механизма действия, так и для изготовления биорелевантных сред [2, 16].

Вышедшие за последние 6 лет публикации, посвященные использованию биорелевантных сред для изучения кинетики растворения препаратов всех классов БКС, наглядно демонстрируют значимость данной разработки. Особо

следует отметить влияние использования биорелевантных сред на поведения веществ, обладающих полиморфизмом [1, 11]. Как выяснилось, уровень растворения таких препаратов на примере карбамазепина выше в FaSSIF, чем в фармакопейном буферном растворе. Это навело ученых на мысль о некоем взаимодействии между препаратом и желчными компонентами среды растворения, которое будет происходить в условиях *in vivo*.

На данный момент предложен модифицированный состав биорелевантных сред, с учетом данных 10-летнего опыта их использования [7, 8]. Эта версия (табл. 3) максимально приближена по свойствам к желудочному и кишечному соку человека и наиболее полно отражает взаимодействия ЛВ и содержимого ЖКТ в условиях *in vivo*.

Таблица 3

Модифицированный состав биорелевантных сред

FaSSIF-V2		FeSSIF-V2	
Состав, мМоль/л		Состав, мМоль/л	
Натрия таурохолата	3	Натрия таурохолата	10
Лецитина	0,2	Лецитина	2
Кислоты малеиновой	19,12	Кислоты малеиновой	55,05
NaOH	34,8	NaOH	81,65
NaCl	68,62	NaCl	125,5
		Глицерилмоноолеата	5
		Натрия олеата	0,8
Свойства		Свойства	
pH	6,5	pH	5,8
Осмоляльность, мОсМоль/кг	180±10	Осмоляльность, мОсМоль/кг	390±10
Буферная ёмкость, мМоль/л	10	Буферная ёмкость, мМоль/л	25
Поверхностное натяжение, мН/м	54,3	Поверхностное натяжение, мН/м	40,5 ±0,2

Методики приготовления биорелевантных сред

У описанных биорелевантных сред имеется 2 недостатка. Первый заключа-

ется в сроке хранения приготовленных растворов, он составляет не более 48 ч. Более того, ряд авторов рекомендует изготавливать среды непосредственно перед исследованиями, что, в свою

очередь, несколько усложняет сам экспериментальный процесс. Также существенную роль на распространение использования биорелевантных сред в общемировой практике играет и экономический аспект. Стоимость натрия таурохолата колеблется в диапазоне от 100 до 300 \$ за кг. Высокая цена компонентов значительно усложняет применение биорелевантных сред в ряде

научно-исследовательских институтов.

Существует несколько вариантов решения поставленных задач. Решение первого недостатка заключается в применении концентратов FaSSIF и FeSSIF [9]. Изначально готовят буферные растворы, так называемые чистые FaSSIF и FeSSIF (blank FaSSIF and FeSSIF), не содержащие лецитина и натрия таурохолата (табл. 4).

Таблица 4

Буферные растворы для приготовления концентратов биорелевантных сред

Blank FaSSIF		Blank FeSSIF	
NaOH	1,74 г	NaOH	20,2 г
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	19,77 г	Ледяной уксусной кислоты	43,25 г
NaCl	30,9 г	NaCl	59,37 г
Воды очищенной q.s. ad	5 л	Воды очищенной q.s. ad	5 л
pH	6,5	pH	5,0

Для приготовления концентратов также необходим раствор натрия гидроксида для коррекции pH (табл. 5).

Таблица 5

Раствор натрия гидроксида для коррекции pH

NaOH	40,00 г
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	3,954 г
NaCl	6,186 г
Воды очищенной q.s. ad	1 л

Таблица 6

Концентраты для приготовления биорелевантных сред

Концентрат FaSSIF		Концентрат FeSSIF	
Натрия таурохолата	6,6 г	Натрия таурохолата	16,5 г
Лецитина	2,36 г	Лецитина	5,91 г
Blank FaSSIF	500 г	Blank FeSSIF	500 г

Состав концентратов для приготовления биорелевантных сред приведен в табл. 6. Полученные растворы взбалтывают в течение 4 ч. при комнатной темпе-

ратуре до получения прозрачного раствора. Затем доводят буфером до 1 л (FaSSIF) или до 2 л (FeSSIF). Приготовленные концентраты могут храниться при темпе-

ратуре 4-8°C в течение 3 недель. Соотношения концентратов и буферных растворов для приготовления соответствующих сред приведены в табл. 7 и 8.

Таблица 7

Приготовление FaSSIF из концентратов

Концентрат FaSSIF		
300 г концентрата + 1050 г буфера	300 г концентрата + 1000 г буфера	175 г концентрата + 1050 г буфера
	pH корректируют р-ром натрия гидроксида (табл. 5)	pH корректируют р-ром натрия гидроксида (табл. 5)
	Буфер до 1400 г	Буфер до 1400 г
FaSSIF pH 6,5	FaSSIF pH 6,8	FaSSIF pH 7,2

Таблица 8

Приготовление FeSSIF из концентратов

Концентрат FeSSIF	
700г концентрата + 700г буфера	350 г концентрата + 1000 г буфера
	pH корректируют р-ром натрия гидроксида (табл. 5)
	Буфера до 1400 г
FeSSIF pH 6,5	FeSSIF pH 6,8

Для снижения стоимости биорелевантных сред возможна замена натрия таурохолата на другие ПАВ: производные 24-PBS (24-фосфорножелчные кислоты), а также использование комбинации 0,25% Твин 80 и 0,25% триэтанолamina (как аналог FeSSIF) и 0,05% Твин 80 (как аналог FaSSIF) [6, 24]. Использование синтетических ПАВ позволяет не только увеличить срок хранения биорелевантных сред, но и снижает цену 1 л с 70 до 1 \$ США. Также в продаже имеются порошкообразные смеси для приготовления FaSSIF и FeSSIF, что позволяет значительно упростить процесс их приготовления, а также снизить стоимость сред. Физиохимические параметры таких растворов эквивалентны биорелевантным средам. Использование данных стандартизованных порошков позволяет минимизировать непостоян-

ство состава сред при их регулярном изготовлении вручную [20].

Заключение

На данный момент трудно переоценить значимость научных исследований в области биорелевантных сред. Их использование позволяет более точно прогнозировать влияние состава вспомогательных веществ и эффектов пищи на растворимость и биодоступность препаратов для внутреннего применения. Научные наблюдения показали, что посредством биорелевантных сред возможно максимально приближенное к реальному моделирование фармакокинетических профилей растворения, нежели чем при использовании фармакопейных буферных растворов. Использование таких сред имеет огромное

влияние на фармакокинетические исследования, нацеленные на оптимизацию дозирования и рецептуры препаратов. В заключении хочется добавить, что биорелевантные жидкости могут найти свое применение в тестах, изучающих кинетику растворения (в т.ч. и процедуре «биоверификации»), для оценки взаимозаменяемости воспроизведенных лекарственных средств.

Список литературы

1. *Aaltonen J., Rades T.* Commentary: Towards Physico-Relevant Dissolution Testing: The Importance of Solid-State Analysis in Dissolution, Dissolution Technologies. 2009. 16(2). P. 47-54.
2. *Boni J. E., Brickl R. S., Dressman J. B., Pfefferle M. L.* Instant FaSSIF and FeSSIF–Biorelevance Meets Practicality. Dissolution Technologies. 2009. 16(3). P. 41-46.
3. *Dressman, J. B., Amidon G. L., Reppas C., Shah V. P.* Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. Pharm. Res. 1998. 15 (1). P. 11–22.
4. *Dressman J. B., Reppas C.* In vitro–in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. Eur. J. Pharm. Sci. 2000. 11 (Suppl 2). P. 73–80.
5. *Galia, E.; Nicolaidis, E.; Hörter, D.; Löbenberg, R.; Reppas, C.; Dressman, J. B.* Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. Pharm. Res. 1998. 15 (5). P. 698–705.
6. *Jogia H.; Mehta T.; and Patel M.* Evaluation of Dissolution Media Containing a Novel Synthetic Surfactant by In Vitro Testing of BCS Class II Drugs, Dissolution Technologies. 2009. 16(3). P. 14-19.

7. *Jantratid E.; Dressman J. B.* Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. Dissolution Technologies. 2009. 16(3). P. 21-25.

8. *Jantratid, E.; Janssen, N.; Reppas, C.; Dressman, J. B.* Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. Pharm. Res. 2008. 25 (7). P. 1663–1676.

9. *Klein S.* Predicting Food Effects on Drug Release from Extended-Release Oral Dosage Forms Containing a Narrow Therapeutic Dissolution Technologies. 2009. 16(3). P. 28-40.

10. *Kostewicz, E. S.; Brauns, U.; Becker, R.; Dressman, J. B.* Forecasting the oral absorption behavior of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media. Pharm. Res. 2002. 19 (3). P. 345–349.

11. *Lehto P., Aaltonen J., Tenho M., Rantanen J., Hirvonen J., Tanninen V.P., Peltonen L.* Solvent-mediated solid phase transformations of carbamazepine: Effects of simulated intestinal fluid and fasted state simulated intestinal fluid. J Pharm Sci. 2009. Mar; 98(3). P. 985-96.

12. *Löbenberg R., Shah V., Krämer J., Amidon G. L., Dressman J. B.* Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide. Pharm. Res. 2000. 17 (4). P. 439-444.

13. *Marques M.* Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States. Dissolution Technol. 2004. 11(2). 16 p.

14. *Nicolaidis E., Hempelstall J.M., Reppas C.* Biorelevant Dissolution Tests with the Flow-Through Apparatus. Dissolution Technologies. 2000. 7(1). P. 8–11.

15. *Nicolaidis E., Symillides M., Dressman J. B., Reppas C.* Biorelevant dissolution testing to predict the plasma

profile of lipophilic drugs after oral administration. *Pharm. Res.* 2001. 18 (3). P. 380–388.

16. Söderlind E, Karlsson E, Carlsson A, Kong R, Lenz A, Lindborg S, Sheng JJ. Simulating Fasted Human Intestinal Fluids: Understanding the Roles of Lecithin and Bile Acids. *Mol Pharm.* 2010. 7 (5). P. 1498–1507.

17. Stippler E., Kopp S., Dressman J. B. Comparison of US Pharmacopeia Simulated Intestinal Fluid TS (without pancreatin) and Phosphate Standard Buffer pH 6.8, TS of the International Pharmacopoeia with Respect to Their Use in In Vitro Dissolution Testing. *Dissolution Technologies.* 2004. 11(2). P. 6-10.

18. *United States Pharmacopoeia and National Formulary USP 23–NF 18*; The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 1995.

19. *United States Pharmacopoeia and National Formulary USP 26–NF 21*; The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2003.

20. Vogt L., Schwebel H., Klopfer B. Characterization of biorelevant media (FaSSIF and FeSSIF) produced from a

standardized instantly dissolving powder. *AAPS.* 2009.

21. Wang Q., Fotaki N.; Yun Mao. Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development. *Dissolution Technologies.* 2009. 16 (3). P. 6-12.

22. Wei H., Lobenberg R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006. 29 (1). P. 45-52.

23. WHO Technical Report Series 937, annex 8 «*Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms*». WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations (2006).

24. Zoeller T., Klein S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. *Dissolution Technologies.* 2007. 14 (4). P. 8-14.

25. Раменская Г.В., Шохин И.Е. Современные подходы к оценке генерических лекарственных средств при их регистрации (обзор). // *Химико-фармацевтический журнал*, 2009. том 43. № 9. С. 30-34.

Biorelevant dissolution media – modern tool for modelling of drugs dissolution and absorption

E.A. Volkova, I.E. Shohin, G.V. Ramenskaya, A.U. Savchenko

This work is devoted to biorelevant media used for dissolution test. The formulations and preparation methods of fasted state simulation intestinal fluid, FaSSIF and fed state simulation intestinal fluid, FeSSIF, are defined. In addition, the dissolution characteristics of APIs from different BCS classes in biorelevant media are described. Possible applications of biorelevant media in science are also shown.

Key words: dissolution test, biorelevant media, biopharmaceutical classification system (BCS), FaSSIF, FeSSIF, biowaiver, absorption.

Фармакоэпидемиологическое исследование воспроизведенных комбинированных противотуберкулезных препаратов и приверженности к ним врачей-фтизиатров в широкой клинической практике

Л.В. Мохирева¹, Е.Н. Хосева¹, О.О. Каркач², А.В. Мохирев¹, П.И. Джура³, Т.Е. Морозова²

¹ – ОАО «Химико-фармацевтический комбинат «АКРИХИН»

² – Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

³ – ГУЗ «Волгоградский областной клинический противотуберкулезный диспансер», Волгоград

Контактная информация: Хосева Елена Николаевна e.khoseva@akrikhin.ru

Приводятся результаты фармакоэпидемиологического исследования по оценке эффективности, безопасности и переносимости комбинированных противотуберкулезных препаратов (КПТП) и приверженности к ним врачей-фтизиатров. Проведено анкетирование более 700 врачей-фтизиатров в 39 городах России. Наиболее часто во всех режимах химиотерапии для лечения туберкулеза применяются воспроизведенные КПТП отечественного производства. Комбинированные противотуберкулезные препараты оцениваются врачами как эффективные, с хорошей переносимостью и достаточным уровнем безопасности.

Ключевые слова: воспроизведенные КПТП, эффективность, безопасность, переносимость.

Проблема клинического излечения впервые выявленных больных туберкулезом легких является приоритетной для отечественной фтизиатрии [5, 13]. В целях повышения эффективности химиотерапии впервые выявленных больных туберкулезом, Международный Союз по борьбе с туберкулезом и легочными заболеваниями (IUATLD) и эксперты ВОЗ рекомендуют применение комбинированных противотуберкулезных препаратов (КПТП) с фиксированными дозами.

В последние годы в России были впервые созданы комбинированные препараты для лечения больных туберкулезом легких с включением фторхинолонов: ломекомб (ломефлоксацин, изониазид, пипразинамид, этамбутол и пиридоксин гидрохлорид) и протиокомб (протионамид, ломефлоксацин, пипразинамид,

этамбутол и пиридоксин гидрохлорид). Высокая эффективность и безопасность данных препаратов для лечения больных туберкулезом подтверждена многоцентровыми клиническими исследованиями [1-4, 6, 7, 10, 11].

К комбинированным противотуберкулезным препаратам относят двух-, трех-, четырех- и пятикомпонентные лекарственные формы с фиксированными дозами отдельных веществ (табл. 1).

Комбинированные противотуберкулезные препараты могут быть использованы в режимах химиотерапии как в интенсивную, так и в поддерживающую фазу, в соответствии с Приказом МЗ РФ №109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (табл. 2) [9].

Таблица 1
Состав и дозы (мг) комбинированных противотуберкулезных препаратов

КПТП	Состав, дозы (мг)
2-компонентные	Изониазид (300), пиридоксина гидрохлорид (60)
	Изониазид (150), рифампицин (300)
	Изониазид (0,033), натрия пара-аминосалицилат (1,145)
	Циклосерин (250), пиридоксина гидрохлорид (25)
	Изониазид (150), пиразинамид (500)
	Изониазид (150), этамбутол (400)
	Теризидон (300), пиридоксина гидрохлорид (10)
	Рифампицин (100), изониазид (150)
	Рифампицин (150), изониазид (75)
	Рифампицин (150), изониазид (100)
3-компонентные	Изониазид (100), рифампицин (150), пиридоксина гидрохлорид (10)
	Изониазид (150), рифампицин (225), пиразинамид (750)
	Рифампицин (150), изониазид (150), пиразинамид (350)
	Рифампицин (150), изониазид (100), витамин В6 (10)
	Рифампицин (150), изониазид (150), пиразинамид (400)
	Изониазид (150), пиразинамид (500), витамин В6 (15)
	Изониазид (150), этамбутол (400), витамин В6 (30)
4-компонентные	Изониазид (75), рифампицин (150), пиразинамид (400), этамбутола гидрохлорид (275)
	Рифампицин (150 или 225), изониазид (75 или 150), пиразинамид (400 или 750), этамбутол (275 или 400)
	Ломефлоксацин (200), пиразинамид (400), протионамид (188), этамбутола гидрохлорид (360)
5-компонентные	Рифампицин (120), изониазид (60), пиразинамид (300), этамбутол (225), витамин В6 (10)
	Изониазид (135), ломефлоксацин (200), пиразинамид (370), этамбутол (325), витамин В6 (10)
	Ломефлоксацин (200), протионамид (188), пиразинамид (370), этамбутол (325), витамин В6 (10)
	Ломефлоксацина гидрохлорид (200), пиразинамид (370), протионамид (150), этамбутола гидрохлорид (325), пиридоксина гидрохлорид (10)

Таблица 2
Стандартные режимы химиотерапии (Приказ МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г.)

Режим	Интенсивная фаза терапии	Фаза продолжения терапии
I	2 мес. HRZE или HRZS	4 мес. HR или H3R3; 6 мес. HE
II а	2 мес. HRZES + 1 мес. HRZE	5 мес. HRE или 5 мес. H3R3E3
II б	3 мес. HRZE[Cap]Fq[Pt]	В соответствии с режимами I, II а или IV в зависимости от данных лекарственной чувствительности МБТ
III	2 мес. HRZE	4 мес. HR или H3R3; 6 мес. HE
IV	Минимум 5 препаратов, к которым сохранена чувствительность МБТ: 6 мес. ZEPtK/CapFq[Cs][Pas]	Минимум 3 препарата, к которым сохранена чувствительность МБТ: 12 мес. EPtFq[Cs][Pas]

Примечание: Н – изониазид, R – рифампицин, Z – пиразинамид, E – этамбутол, S – стрептомицин, K – канамицин, Cap – капреомидин, Fq – фторхинолон, Pt – протионамид, Cs – циклосерин, Pas – пара-аминосалициловая кислота (ПАСК); в квадратных скобках указаны препараты, назначение которых основывается на данных лекарственной чувствительности МБТ, выявляемой в процессе химиотерапии; H3R3 и H3R3E3 – прием препаратов три раза в неделю интермиттирующим методом.

Целью нашего исследования была оценка эффективности, безопасности и переносимости воспроизведенных комбинированных противотуберкулезных препаратов и приверженности к ним врачей-фтизиатров в широкой клинической практике.

Материалы и методы

Проведено фармакоэпидемиологическое исследование на основе анкетирования врачей-фтизиатров в 39 городах семи федеральных округов РФ: Северо-Западного (Санкт-Петербург, Псков, Мурманск, Калининград); Центрального (Липецк, Воронеж, Москва, Смоленск, Тула, Рязань, Владимир, Пушкин); Приволжского (Пенза, Саранск, Саратов, Самара, Ульяновск, Марий-Эл, Чебоксары); Южного (Краснодар, Астрахань, Геленджик, Сочи, Волгоград, Ростов-на-Дону, Егорьевск); Уральского (Екатеринбург, Ханты-Мансийск, Оренбург, Нижневартовск, Белорецк); Сибирского (Омск, Томск, Новосибирск, Кемерово, Краснокамск) и Дальневосточного (Благовещенск, Якутск, Владивосток).

Исследование проводилось в течение 2007-2009 гг. Было опрошено около 900 врачей-фтизиатров из 45 противотуберкулезных лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ). В разработку была принята 731 анкета, соответствующая наиболее полному и качественному заполнению.

Для этого исследования сотрудниками ОАО «АКРИХИН» и Центрального научно-исследовательского института туберкулеза была разработана анкета, содержащая 14 вопросов о комбинированных противотуберкулезных препаратах.

Оценивались такие позиции, как: отношение врачей к КПТП; наличие КПТП в анкетизируемом ЛПУ; приме-

нение этих препаратов в клинической практике и различных режимах химиотерапии; преимущества и недостатки КПТП по сравнению с отдельным приемом противотуберкулезных препаратов; эффективность, безопасность и переносимость КПТП по мнению врача-фтизиатра.

Из полученных анкет была сформирована компьютерная база данных, статистическая обработка которых выполнена с применением пакета программ Microsoft Excel 2003. Результаты статистической обработки представлены в виде абсолютных значений и процентного соотношения величин.

Результаты и их обсуждение

Отношение врачей-фтизиатров к КПТП

Результаты выборочного анкетирования показали, что в 80,6% фтизиатрических ЛПУ имеются в наличии комбинированные противотуберкулезные препараты. 95,6% респондентов знают о том, что для лечения туберкулеза применяются КПТП, и 93,8% врачей-фтизиатров используют эти препараты в своей клинической практике: назначают часто – 31,6% врачей, по мере поступления в ЛПУ – 27,2%, редко – 35,0%. Всего 6,2% врачей-фтизиатров не назначают КПТП даже при наличии в аптеке ЛПУ, что вполне соотносится с данными об отсутствии знаний о КПТП.

Две трети опрошенных врачей (61,8%) положительно относятся к использованию этой группы препаратов для лечения туберкулеза, 13,6% относятся отрицательно, 24,6% затруднились с ответом.

Более половины опрошенных респондентов (61,5%) считают, что КПТП имеют преимущества в лечении туберкулеза по сравнению с отдельным

приемом противотуберкулезных препаратов. При этом 25,3% оценивают эффективность лечения комбинированными препаратами как более высокую, по сравнению с раздельным приемом препаратов, 54,7% – как одинаковую, и 12,8% – более низкую, 7,2% опрошенных затруднились с ответом.

Приоритеты в выборе препаратов

По данным анкетирования, около половины опрошенных (49,5%) врачей считают, что КППП с фиксированными дозами предпочтительно назначать в интенсивную фазу химиотерапии туберкулеза, 61,0% респондентов применяют их в фазу продолжения лечения.

При оценке приверженности врачей-фтизиатров к назначению различных КППП было установлено, что наибольшее предпочтение отдается двухкомпонентным (39,9%) и четырехкомпонентным (32,9%) препаратам. Трехкомпонентные КППП применяются в клинической практике в 20,1% случаев, пятикомпонентные – лишь в 7,1% (рис. 1).

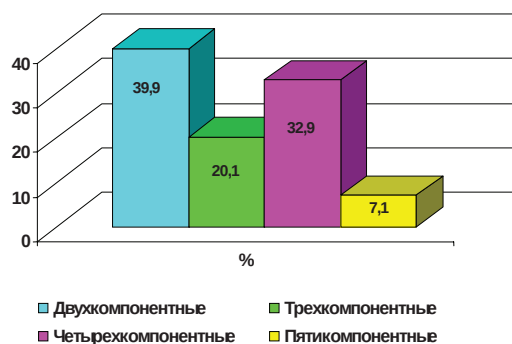


Рис. 1. Частота назначения комбинированных противотуберкулезных препаратов, n=919

Различается выбор КППП врачами-фтизиатрами и в разных режимах хи-

миотерапии. Детальный анализ анкет показал, что в I режиме химиотерапии туберкулеза наиболее часто врачи назначают изоконб (26,6%), форкокс (17,3%), рифаконб (11,9%), фтизопирам (8,9%) и фтизоэтам (8,1%), реже – майрин, рукокс, комбитуб, тубавит, протиоконб, изоэремфат и ломеконб (рис. 2). При этом доля препаратов отечественного производства, выпускаемых ОАО «АКРИХИН», составила 45,2%.

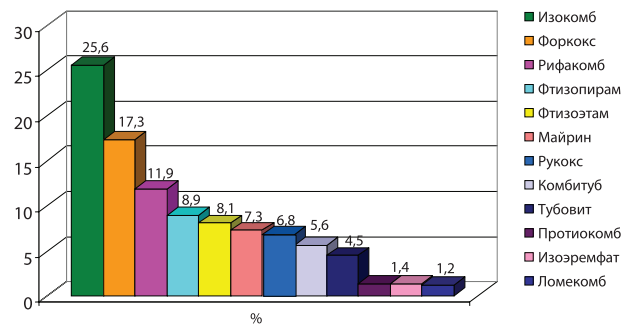


Рис. 2. Основные противотуберкулезные препараты, применяемые в I режиме химиотерапии, n = 590

Во IIa режиме химиотерапии первые позиции среди назначаемых препаратов занимают изоконб (23,9%), рифаконб (22,3%) и форкокс (18,1%), реже врачи применяют фтизоэтам (7,2%), майрин (6,9%), рукокс (6,9%) и другие препараты (рис. 3). Из общего числа рекомендуемых КППП, 36,4% приходится на препараты отечественного производства (ОАО «АКРИХИН»).

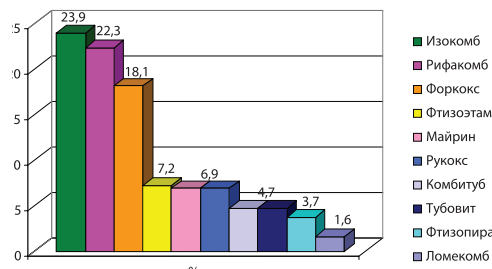


Рис. 3. Основные противотуберкулезные препараты, применяемые во IIa режиме химиотерапии, n = 574 .

Во IIb режиме химиотерапии наибольшее предпочтение респонденты отдают ломеконбу (24,4%), протиоконбу (21,2%), изоконбу (14,5%), рифаконбу (13,2%) и форкоксу (9,9%). Значительно реже назначаются фтизоэтам, фтизопирам, комбитуб, майрин и рукокс (рис. 4). Доля препаратов ОАО «АКРИХИН» составляет 67,7%.

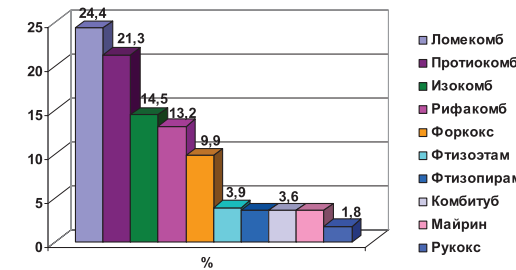


Рис. 4. Основные противотуберкулезные препараты, применяемые во IIb режиме химиотерапии, n = 385.

В III режиме химиотерапии респонденты основное предпочтение отдают изоконбу (24,0%), рифаконбу (20,8%) и форкоксу (14,3%), реже назначая другие КППП (рис. 5). При этом на долю противотуберкулезных препаратов производства ОАО «АКРИХИН» приходится более половины всех применяемых КППП (52,6%).

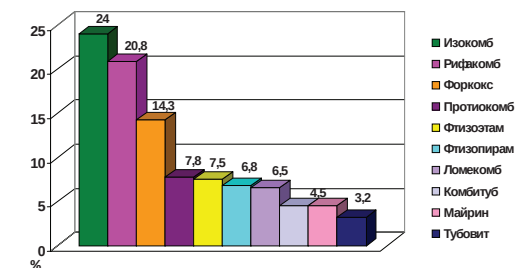


Рис. 5. Основные противотуберкулезные препараты, применяемые в III режиме химиотерапии, n = 308.

В IV режиме химиотерапии врач-фтизиатры из числа опрошенных наи-

большее предпочтение отдают протиоконбу (61,7%) и ломеконбу (30,4%) (рис. 6).

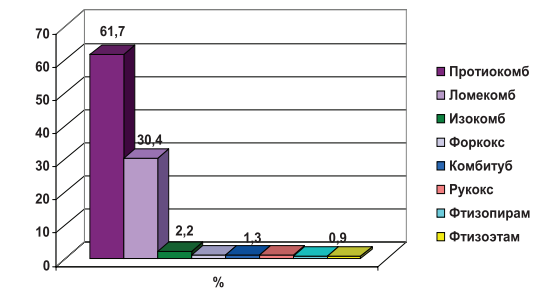


Рис. 6. Основные противотуберкулезные препараты, применяемые в IV режиме химиотерапии, n = 227.

В очень редких случаях доктора назначают изоконб, форкокс, комбитуб, рукокс, фтизопирам и фтизоэтам. Однако применение этих препаратов в IV режиме для лечения больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью противоречит Приказу МЗ РФ от 21 марта 2003 года № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации, «Приложение 6. «Инструкция по химиотерапии больных туберкулезом».

Эффективность, безопасность и переносимость КППП

Эффективность лечения туберкулеза при применении КППП, по мнению более половины опрошенных практикующих врачей (54,7%), сравнима с раздельным приемом противотуберкулезных препаратов, а 25,3% фтизиатров считают, что она превосходит стандартную терапию.

По данным опроса врачей, КППП достаточно безопасны в применении и хорошо переносятся пациентами. Развитие побочных эффектов в результате

терапии никогда не наблюдали 17,0% респондентов, 61,2% – отмечали крайне редко и лишь 16,7% – часто, 5,1% – затруднились с ответом.

Выводы

Таким образом, проведенный фармакоэпидемиологический анализ показал, что комбинированные противотуберкулезные препараты в настоящее время широко применяются в практике врачей-фтизиатров в нашей стране для лечения туберкулеза (98,3%). Двух-, трех- и четырехкомпонентные КППП назначаются наиболее часто как в интенсивную фазу лечения (49,5%), так и в фазу поддерживающей терапии (61,0%).

Во всех режимах химиотерапии туберкулеза применяются воспроизведенные КППП отечественного производства, при этом наиболее часто – во IIб (67,7%) и IV режимах химиотерапии (96,1%).

Основными важными преимуществами КППП врачи-фтизиатры считают удобство приема в результате меньшего количества таблеток, более высокий контроль лечения со стороны медперсонала, лучшую переносимость.

Среди основных недостатков отмечают неудобство подбора дозировок и сложность определения, на какой компонент может развиваться побочный эффект.

По мнению большинства респондентов, КППП обладают достаточным профилем безопасности и хорошей переносимостью.

Список литературы

1. Голубев Д.Н., Скорняков С.Н., Подгаева В.А., Мохирева Л.В., Кравчен-

ко М.А., Вахрушева Д.В., Черняев И.А. Особенности тактики химиотерапии туберкулеза органов дыхания в территориях с высоким уровнем лекарственной устойчивости: пособие для врачей. Екатеринбург. 2009. 48 с.

2. Краснов В.А., Свистельник А.В., Степанов Д.В., Мохирева Л.В. Эффективность и безопасность комбинированного противотуберкулезного препарата ломекомб при лечении впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких с бактериовыделением и высоким риском развития лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. // XV Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство». Тезисы докладов. М. 2008. С. 181-182.

3. Левашов Ю.Н., Елькин А.В., Скворцова Л.А., Павлова М.В., Виноградова Т.И., Арчакова Л.И., Мохирева Л.В. Оценка эффективности и безопасности комбинированного противотуберкулезного препарата ломекомб при лечении впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких. // XV Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство». Тезисы докладов. М. 2008. 196 с.

4. Левашов Ю.Н., Мишин В.Ю., Краснов В.А., Степанов Д.В., Свистельник А.В., Смердин С.В., Мохирева Л.В. Многоцентровые исследования эффективности IIб режима химиотерапии с использованием комбинированного препарата ЛОМЕКОМБ при лечении впервые выявленных больных туберкулезом легких с бактериовыделением. // XVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». – Тезисы докладов. М. 2009. 157 с.

5. Мишин В.Ю. Оптимизация лечения впервые выявленных больных туберкулезом легких на основе принципов

доказательной медицины // Consilium medicum. 2008. №3. С. 20-25.

6. Мишин В.Ю., Кононец А.С., Голубева Л.И., Хорошилова Н.Е., Мохирева Л.В. Эффективность комбинированного препарата протиокомб при лечении больных рецидивами туберкулеза легких. – Материалы VIII Российского съезда фтизиатров: «Туберкулез в России». М. 2007. С. 441-442.

7. Мишин В.Ю., Чуканов В.И., Григорьев Ю.Г., Эргешев А.Э., Гиллер Д.Б., Кононец А.С., Комиссарова О.Г., Мохирева Л.В., Мякишева Т.В., Осадчая О.А. Эффективность и побочное действие комбинированного препарата ломекомб при химиотерапии впервые выявленных больных туберкулезом легких. // Учебное пособие для врачей: В.Ю.Мишин [и др.]. «Туберкулез легких с лекарственной устойчивостью возбудителя». 2009. М.: ГЭОТАР-Медиа. Глава 8 (8.3). С. 107-109, 199-201.

8. Практические рекомендации для национальных программ по борьбе с туберкулезом по ведению и использованию комбинированных противотуберкулезных препаратов с фиксированными дозами (Перевод с английского). ВОЗ. 2005. 85 с.

9. Приказ МЗ РФ №109 от 21 марта 2003г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в российской Федерации». М. 2003. 347 с.

10. Смердин А.В., Чернов М.Т., Иванова О.В., Лузина Н.В., Мохирева Л.В. Эффективность комбинированного противотуберкулезного препарата ломекомб при химиотерапии впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких с бактериовыделением. // XV Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство». Тезисы докладов. М. 2008. 305 с.

11. Соколова Г.Б., Зуев А.П., Мохирева Л.В., Дубинский Р.Д. Клиническая эффективность и фармакоэкономика комбинированных противотуберкулезных препаратов // Главврач. 2005. № 9. С. 26-33.

12. Фтизиатрия. Национальное руководство /Под редакцией акад. РАМН М.И.Перельмана. М. 2007. 506 с.

13. Хоменко А.Г. Химиотерапия туберкулеза легких. М. 1980. 279 С.128-145.

14. Шилова М.В. Туберкулез в России в 2008 году: монография. М. 2010.

15. Шмелев Н.А. Противотуберкулезные препараты. М. 1969. 116 с.

16. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/ Infectious Diseases Society of America: Treatment of Tuberculosis. – 2002.

17. Bergmann J.S., Woods G.L. In vitro activity of antimicrobial combinations against clinical isolates of susceptible and resistant Mycobacterium tuberculosis (Активность *in vitro* комбинаций антимикробных препаратов в отношении клинических изолятов чувствительных и резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*). Int J Tuberc Lung Dis '1998. 2. 621 p.

18. Mor N., Vanderkolk J., Heifets L. Inhibitory and bactericidal activities of levofloxacin against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in human macrophages (Ингибиторная и бактерицидная активность левофлоксацина в отношении *Mycobacterium tuberculosis in vitro* и в человеческих макрофагах). Antimicrob Agents Chemother. 1994. 38. 1161-4.

19. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis control (Глобальная борьба с туберкулезом). Available from: URL: <http://www.who.int/gtb/publications/globrep99/index.html> [Accessed 2000 Oct 9].

Pharmakoepidemiology research of the reproduced combined antitubercular preparations and adherence to them of phthisiatricians in wide clinical practice

**L.V. Mokhireva, E.N. Khoseva, O.O. Karkach, A.V. Mokhirev,
P.I. Dzhura, T.E. Morozova**

Pharmakoepidemiology researches are resulted according to efficiency and safety of the combined antitubercular preparations and adherence in them of phthisiatricians. Questioning more than 700 phthisiatricians in 39 cities of Russia is spent. Most often in all modes of chemotherapy to tuberculosis treatment are applied reproduced combined antitubercular preparations a domestic production. The combined antitubercular preparations are estimated by doctors as effective, with good sufficient level of safety.

Key words: combined antitubercular preparations, efficiency, safety.