

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

Редационный совет:

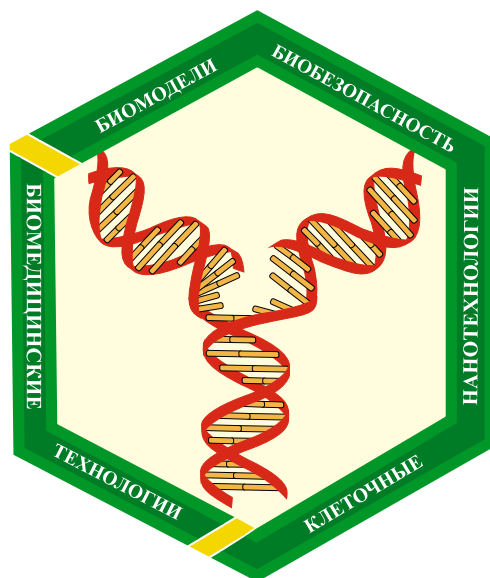
член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, prof. Iorgen Backmen (Германия),
акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А. М. Дыгай,
prof. Moineao S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С. И. Колесников, акад. РАМН А. А. Кубатиев,
акад. РАМН В. Г. Кукес, акад.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

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

Адрес редакции:

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

Отпечатано в типографии «Лин-Интер»
127591, Москва, ул. Дубнинская, д. 83а
Подписано в печать 07.06.2012 г.
Тираж 3 000 экз.



Содержание

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

И.А. Илюшкина, А.Н. Берчатова, И.А. Дьяченко, Д.И. Ржевский, Г.А. Слащева, А.Н. Родионов, А.Н. Мурашев, В.А. Коршунов Модели оценки новых противоаритмических препаратов	6
Э.А. Манвелян, В.А. Батурин, М.Д. Булгакова, Н.Н. Громова Циркадианные различия интенсивности галоперидоловой катаlepsии у овариоэктомированных самок крыс без и после эстрогенизации	14
Г.О. Мареев, О.В. Мареев Измерение смещения барабанной перепонки лазерным автодинным методом в модельном опыте на височных костях домашней свиньи	22
О.В. Мусатов, С.А. Зурнаджан, М.Н. Тризно Оценка микроциркуляции тканей передней брюшной стенки и некоторых органов брюшной полости как потенциальных аутотрансплантатов в абдоминальной хирургии	27
О.И. Степанова, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Н.А. Онищенко, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов, Т.Б. Бескова, Н.В. Касинская Эффективность коррекции клинических и морфологических признаков сахарного диабета 2 типа при трансплантации клеток костного мозга в зависимости от стадии заболевания	33
Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, А.С. Бирюкова Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте	53

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

А.С. Иванова, И.Г. Попова, С.Б. Назаров Роль оксида азота в регуляции функции перитонеальных макрофагов у крыс при экспериментальном нарушении маточно-плацентарного кровообращения	61
К.В. Кулакова, Т.Г. Щербатюк, В.В. Чернов Деструкция клеток лимфосаркомы Плисса после воздействия на нее низкоинтенсивным лазерным излучением в диапазоне синего света	68
Р.В. Мартиросян, Г.Д. Капанадзе, Е.В. Зорян, А.Б. Шехтер, В.Н. Балин, М.А. Саркисян, И.Н. Дорель Гистологическое изучение сравнительной эффективности отдельного применения остеоматериалов (наноструктурированных гидроксиапатита и β -трикальцийфосфатной керамики) и их комбинации с траумель С	75

С.В. Фролов, А.В. Горбунов, А.Ю. Потлов

Регистрация и анализ тремора с помощью детектора движения на основе веб-камеры 80

Ю.В. Фокин

Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения на вокализацию крыс в ультразвуке 84

Ю.В. Фокин

Пептидная регуляция системного поведения крыс 92

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

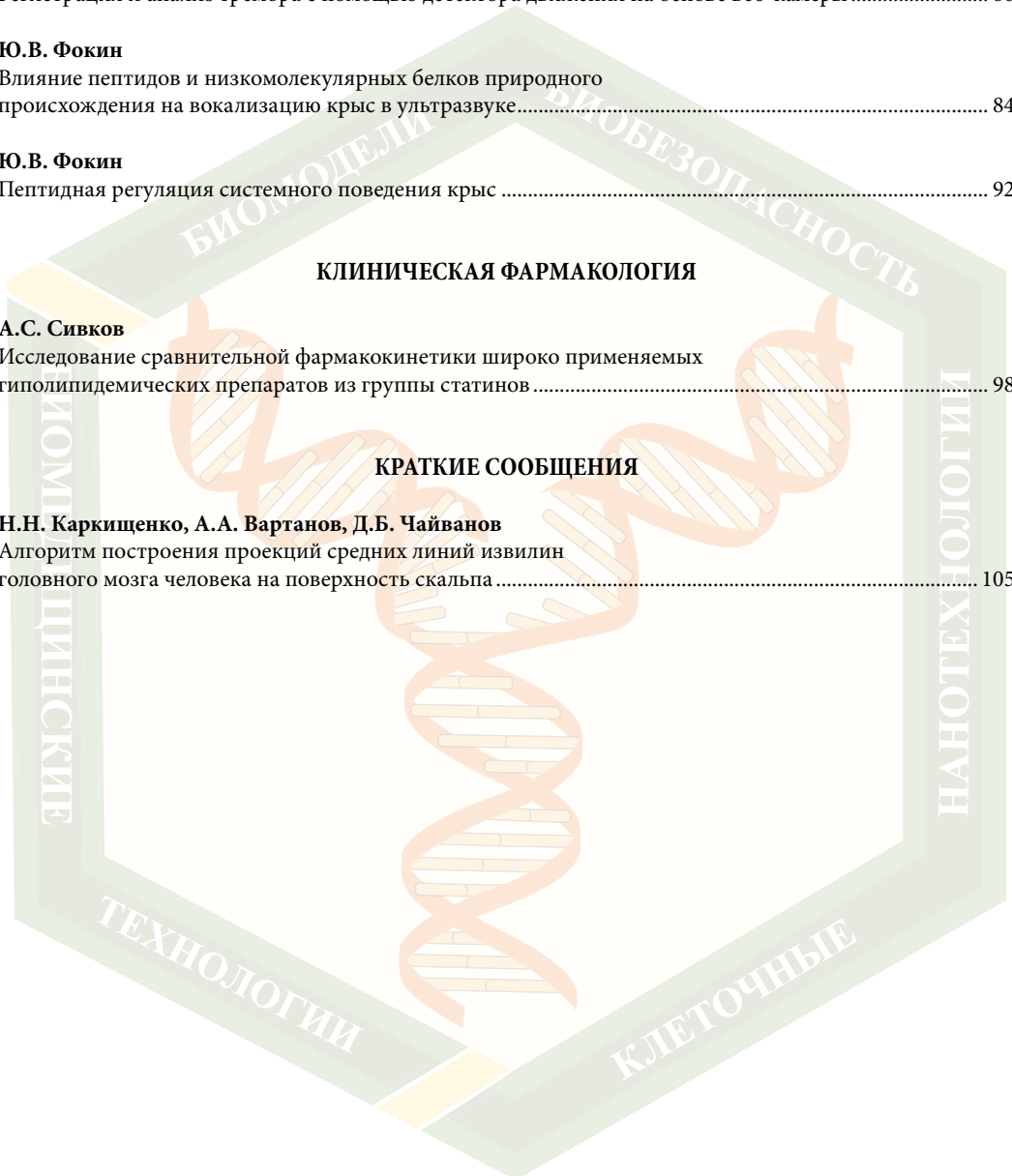
А.С. Сивков

Исследование сравнительной фармакокинетики широко применяемых гиполипидемических препаратов из группы статинов 98

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

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

Алгоритм построения проекций средних линий извилин головного мозга человека на поверхность скальпа 105



Content

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

I.A. Plushkina, A.N. Berchatova, I.A. Dyachenko, D.I. Rzhevsky, G.A. Slascheva, A.N. Rodionov, A.N. Murashev, V.A. Korshunov Model evaluation of new antiarrhythmic drugs.....	6
E.A. Manveljan, V.A. Baturin, M.D. Bulgakova, N.N. Gromova Circadian variations in the intensity of haloperidol's catalepsy in female rats without and after estrogen used.....	14
G.O. Mareev, O.V. Mareev Measurement of shift of an eardrum by a laser avtodinny method in modeling experience on temporal bones of a house pig.....	22
O.V. Musatov, S.A. Zurnadjan, M.N. Trizno Estimation of tissue microcirculation of the front abdominal wall and the some abdominal organs as potential autotransplants in abdominal surgery.....	27
O.I. Stepanova, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, N.A. Onischenko, O.V. Baranova, H.H. Semenov, T.B. Beskova, N.V. Kasinskaya Efficiency of correction of clinical and morphological symptoms of diabetes 2 types at transplantation of stem cells depending on a disease stage.....	33
E.N. Yakusheva, A.V. Shchulkin, A.S. Byryukova Dose-dependent thyroxine influence of P-glycoprotein functional activity in the experiment.....	53

BIOMEDICAL METHODS

A.S. Ivanova, I.G. Popova, S.B. Nazarov Role of nitric oxide in the regulation of peritoneal macrophages in rats offspring chronic disturbance of the uteroplacental blood circulation.....	61
K.V. Kulakova, T.G. Sherbatyuk, V.V. Chernov Destruction of Pliss's lymphosarcoma cells after being treated by low intensity laser radiation in the range of dark blue light.....	68
R.V. Martirosyan, G.D. Kapanadze, E.V. Zoryan, A.B. Shehter, V.N. Balin, M.A. Sarkisyan, I.N. Dorel Histologic study of comparative efficacy of separate application of osteomaterials (nanostructured hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics) and combination with Traumel C.....	75

S.V. Frolov, A.V. Gorbunov, A.Yu. Potlov
 Recording and analysis of tremor through motion detection based on the webcam 80

Yu.V. Fokin
 Influence of peptides and low-molecular proteins of a natural origin
 on vocalization of rats in ultrasound 84

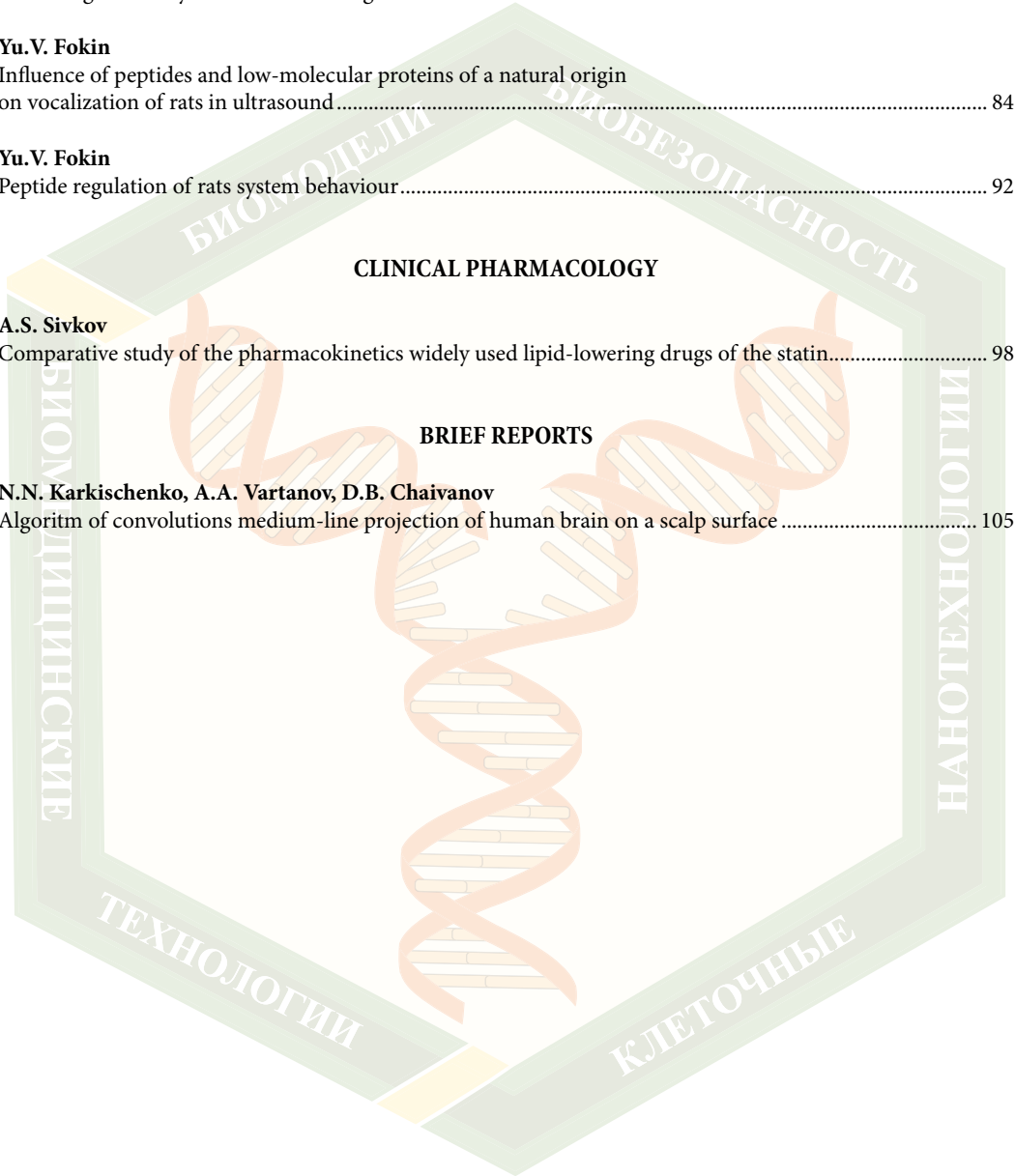
Yu.V. Fokin
 Peptide regulation of rats system behaviour 92

CLINICAL PHARMACOLOGY

A.S. Sivkov
 Comparative study of the pharmacokinetics widely used lipid-lowering drugs of the statin 98

BRIEF REPORTS

N.N. Karkischenko, A.A. Vartanov, D.B. Chaivanov
 Algorithm of convolutions medium-line projection of human brain on a scalp surface 105





Модели оценки новых противоаритмических препаратов

И.А. Илюшкина¹, А.Н. Берчатова^{1,2}, И.А. Дьяченко^{1,2}, Д.И. Ржевский^{1,2},
Г.А. Слащева^{1,2}, А.Н. Родионов^{1,2}, А.Н. Мурашев^{1,2}, В.А. Коршунов³

¹ — Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

² — Пущинский государственный естественный — научный институт, Пущино

³ — Aab Cardiovascular Research Institute, University of Rochester School of Medicine & Dentistry, Rochester, NY, USA

Контактная информация: Дмитрий Иванович Ржевский rjevski@fibkh.serpukhov.su

В статье показаны 4 модели аритмии: адреналиновая, хлоридбариевая, хлоридкальциевая и аконитиновая. Данное сочетание моделей позволяет полноценно изучить широкий спектр противоаритмических препаратов и механизм их воздействия. Кроме того, в работе были подобраны основные параметры для изучения новых противоаритмических препаратов: было показано, что изучение графиков АД и ЭКГ, а также вариабельности периода сердечных сокращений — достаточная основа для первичного скрининга противоаритмических препаратов.

Ключевые слова: аритмия, АД, ЭКГ, вариабельность сердечных сокращений.

В эру глобализации, скорости, неопределенности и нестабильности жизни люди подвергаются все возрастающим нагрузкам и стрессу. Это неизбежно приводит к повышенному риску заболеваний сердечно-сосудистой системы. Аритмия до сих пор остается одной из основных причин заболеваемости и смертности. Аритмия — патологическая электрическая активность в сердечной мышце, которая может быть вызвана либо аномальным формированием, либо проведением электрического импульса, а также двумя этими причинами. Наиболее часто диагностируемые аритмии сопровождаются предсердной и/или желудочковой фибрилляцией [7]. Несмо-

тря на заметное снижение уровня смертности среди взрослого населения от заболеваний сердечно-сосудистой системы в течение последних 40–50 лет, они остаются наиболее распространенной причиной смерти в развивающихся странах [4]. Фибрилляция предсердий — одна из наиболее распространенных причин приступов аритмии среди взрослого населения, тогда как фибрилляция желудочков — основная причина внезапной коронарной смерти [2]. Противоаритмические препараты — первоочередная терапия для пациентов с пароксизмальной и хронической фибрилляцией предсердий. Предотвращение связанных с фибрилляцией предсердий

осложнений основывается на антитромботической терапии, контроле желудочкового ритма и адекватной терапии сопутствующих сердечных заболеваний. Однако доступная фармакологическая терапия имеет множество ограничений, среди которых недостаточная эффективность, как сердечная, так и внесердечная токсичность и риски проаритмических осложнений (антиаритмические агенты) и кровотечений (антикоагулянты). Таким образом, сохраняется постоянная потребность в новых лекарственных средствах, приборах и подходах для восстановления нормального сердечного ритма [6]. Антиаритмические препараты различаются по фармакологическим свойствам и механизмам действия, в связи с чем их делят на 4 класса [1, 8]. Т. к. неизвестно, к какому из классов относится новое соединение, то для адекватной оценки его антиаритмических свойств необходимо изучить антиаритмическую активность исследуемого препарата параллельно на нескольких моделях. Основными моделями аритмии, вызванной химическим путем, использованной в данной работе, были:

- *Аконитовая модель.* Аконитин модифицирует быстрые натриевые каналы в миокардиальных клетках. Если исследуемый препарат проявляет высокую активность на данной модели его относят к I классу антиаритмиков [1, 3].
- *Хлоридкальциевая модель.* Большие дозы кальция хлорида вызывают тяжелые нарушения сердечного ритма, заканчивающиеся обычно летальной фибрилляцией желудочков. На данной модели обычно проявляют активность соединения, относящиеся к I и IV классам антиаритмического действия [1].
- *Хлоридбариевая модель.* Хлорид бария угнетает кальциевую проводимость. Данная модель считается адекватной

для выявления веществ со свойствами класса III антиаритмического действия [1, 2].

- *Адреналиновая модель.* Быстрое внутривенное введение адреналина приводит к развитию желудочковой экстрасистолии и моно- или мультифокальной желудочковой тахикардии. Данная модель используется для отбора соединений со свойствами антиаритмиков II и IV классов [1, 5].

Материалы и методы

В данном эксперименте использовалось 60 самцов нелинейных крыс (Sprague Dawley) массой 400–500 г. Источник животных — НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Животные содержались в условиях вивария при постоянной температуре ($22 \pm 4^\circ\text{C}$) со стандартным свето-темновым циклом (12 ч свет / 12 ч темнота), с 10-ти-кратной сменой объема воздуха в комнате в час. Относительная влажность в комнате содержания животных составляла 30–70%. Корм и воду давали *ad libitum*. Животные содержались индивидуально в поликарбонатных клетках на подстиле; клетки были покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. В качестве подстилки использовалась нехлорированная резаная автоклавируемая бумага. Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены институтомской комиссией по уходу и использованию животных (IACUC) на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными. Исследовательская организация отвечала требованиям утвержденного протокола исследования и стандартным операционным процедурам (СОП) лаборатории. Животные анестезировались (смесью кетамин + ксилазин

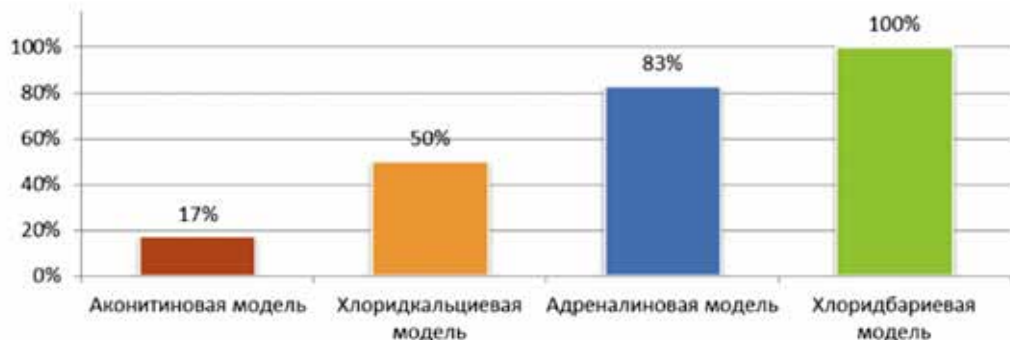


Рис. 1. Количество животных, выживших в эксперименте при различных видах аритмии (%).

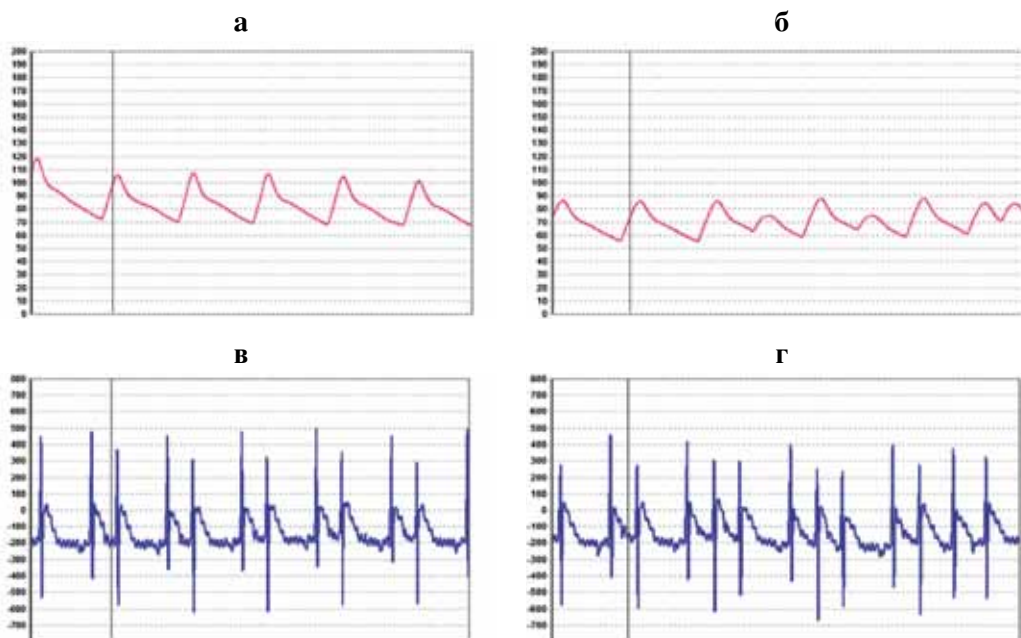


Рис. 2. Модель аритмии, развивающейся (на фоне) после введения аконитина:
а — электрическая активность в миокарде в отсутствие механического сокращения (электрическая экстрасистолия) на кривой АД;
б — экстрасистолия смешанного типа на кривой АД. Переход от аллоритмии к залповой экстрасистолии;
в — электрическая активность в миокарде в отсутствие механического сокращения (электрическая экстрасистолия) на ЭКГ;
г — экстрасистолия смешанного типа на ЭКГ. Переход от аллоритмии к залповой экстрасистолии.

(30–80 мг/кг + 5–10 мг/кг)) и подвергались операции по катетеризации яремной вены (для введения исследуемых веществ) и общей сонной артерии (для регистрации артериального давления и частоты сердечных сокращений), а также установке электродов в первом стандартном отведении. После проведения операции крысам вводили один из аритмогенных агентов (адреналин — 0,3 мг/кг, аконитин — 0,04 мг/кг, кальция хлорид — 65 мг/кг или бария хлорид — 8 мг/кг) в хвостовую вену и осуществляли регистрацию частоты сердечных сокращений (ЧСС) и электрокардиограммы (ЭКГ). Регистрация осуществлялась прямым методом при помощи установки «НемоDynamics»

в течение 2 ч после введения аритмогена, также регистрировалась смертность животных.

Результаты и их обсуждение

Выживаемость животных в эксперименте — важный показатель для оценки адекватности любой модели. Нами было выявлено, что аконитин вызывает наиболее сильные нарушения сердечного ритма, и здесь наблюдаются самая низкая выживаемость животных (17%). Более щадящими моделями оказались хлоридкальциевая и адреналиновая модели (50% и 83% соответственно). Самая высокая выживаемость (100%) была в хлоридбариевой модели (рис. 1). Помимо выживаемости

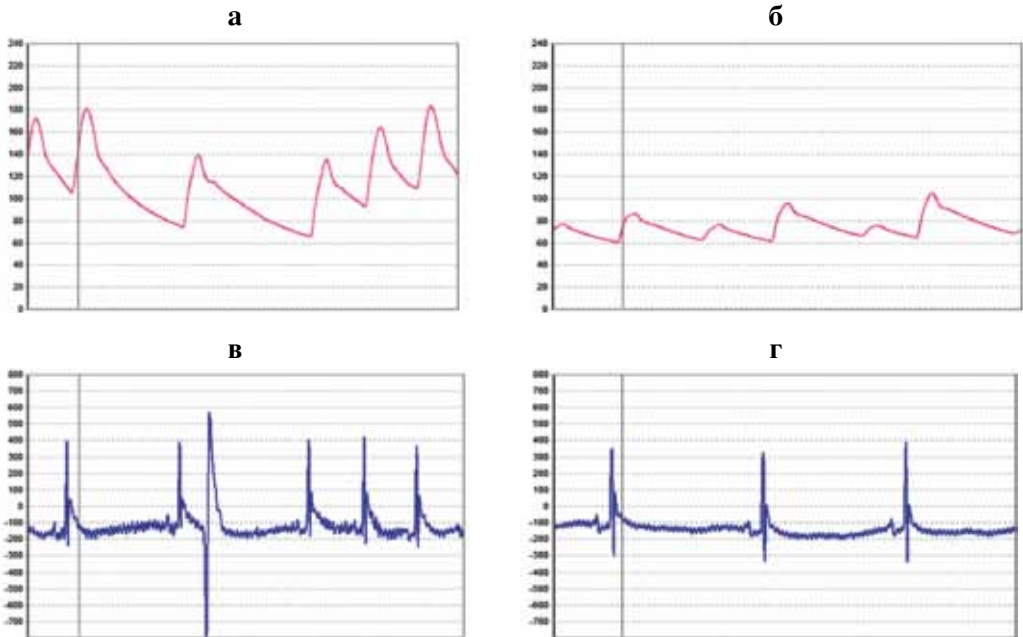


Рис. 3. Модель аритмии, возникающей после введения хлорида кальция:

- а — желудочковая экстрасистола на кривой АД;
- б — разобщенность в появлении электрических импульсов и механических ответов на кривой АД;
- в — желудочковая экстрасистола на ЭКГ;
- г — разобщенность в появлении электрических импульсов и механических ответов на ЭКГ.

животных, особое внимание уделялось патологическим нарушениям сердечного ритма на графиках АД и ЭКГ, которые были вызваны аритмогенными агентами. Для аконитина (рис. 2) характерна поли-топная экстрасистолия. Интересно проследить за тем, как она развивается: на первом этапе возникает электрическая экстрасистола, попадающая на рефрактерный период предыдущего цикла, из-за чего не возникает механического ответа. Далее количество экстрасистол растет, и после второго преждевременного электрического импульса уже появляется механический ответ (сердечная мышца сокращается). Затем экстрасистолия принимает залповый характер и может переходить в желудочковую тахикардию, что обычно заканчивается летально.

Хлорид кальция (рис. 3) вызывает брадикардию с желудочковыми экстрасистолами, которая может переходить затем в желудочковую тахикардию и при больших дозах заканчиваться фибрилляцией желудочков. Кроме того, нами было замечено, что хлорид кальция вносит некоторую разобщенность между электрическими импульсами и механическими сокращениями сердечной мышцы. Возникновение второго (неполноценного) сокращения, по-видимому, обусловлено механизмом действия кальция на миокард. Он, с одной стороны, оказывает прямой эффект на мембрану кардиомиоцитов, приводя к сдвигу влево кривой соотношения макс. скорости деполяризации и мембранного потенциала и увеличивая таким образом

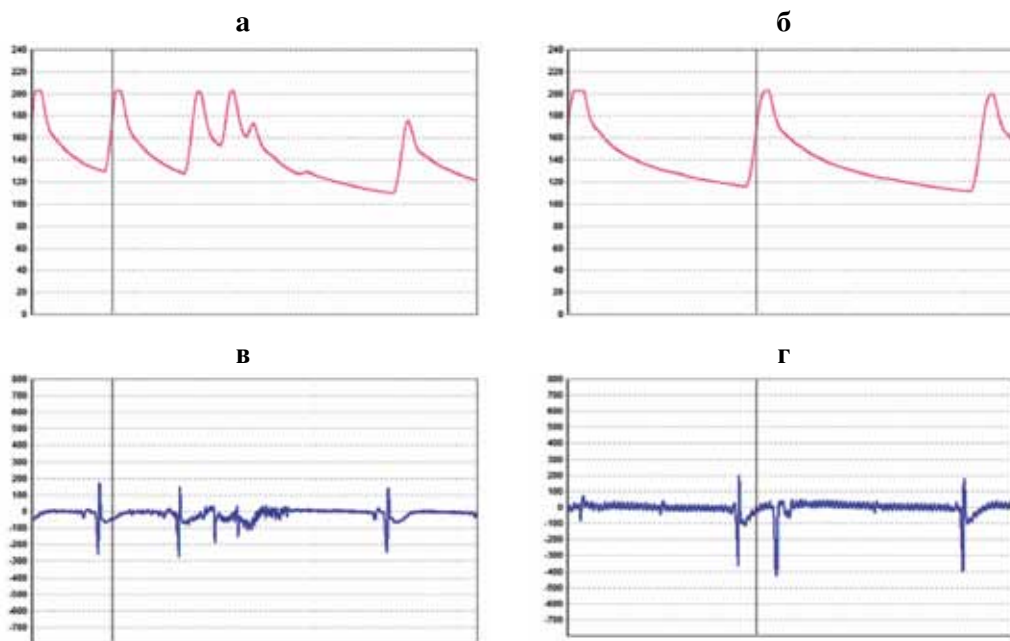


Рис. 4. Модель аритмии, возникающей после введения адреналина:
а — экстрасистолия (двух- и трехгорбые графики) на кривой АД;
б — желудочковая экстрасистолия на кривой АД в сочетании с атриовентрикулярной блокадой;
в — экстрасистолия (двух- и трехгорбые графики) на ЭКГ;
г — желудочковая экстрасистолия на ЭКГ в сочетании с атриовентрикулярной блокадой.

натриевую проводимость и процессы реактивации натриевых каналов, а с другой стороны, под влиянием больших доз хлорида кальция развивается асинхронизация восстановления возбудимости различных миокардиальных волокон. В добавление к прямому действию, хлорид кальция опосредованно путем активации симпатических влияний действует на миокард.

Для адреналина (рис. 4) характерно развитие желудочковых экстрасистол, после которых могут возникать неполноценные механические ответы (двух- или трехгорбые графики АД) и тахикардия.

После введения хлорида бария (рис. 5) развивается многофокальная аритмия с желудочковой экстрасистолией. Помимо изучения патологических изменений АД

и ЭКГ при введении различных аритмогенов, аритмия оценивалась качественно, путем подсчета эпизодов грубых нарушений сердечного ритма. Для количественной оценки была высчитана вариабельность периода сердечных сокращений. За вариабельность приняли стандартное отклонение различного числа циклов для исходного состояния и после введения одного из 4-х аритмогенных агентов. Данные о вариабельности сердечных сокращений представлены на рис. 6. Наибольшая вариабельность встречается в группе аконитиновой модели. Из диаграммы видно, что в адреналиновой и хлоридкальциевой моделях она ниже, и самая низкая — в хлоридбариевой. Эти данные коррелируют с данными о выживаемости животных в эксперименте.

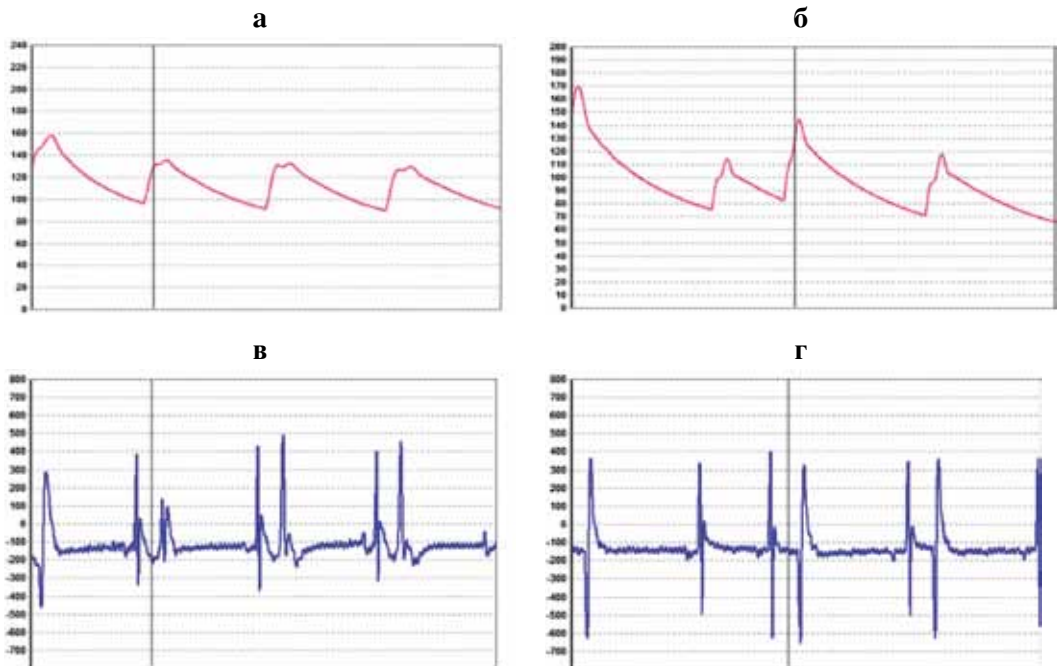


Рис. 5. Модель аритмии, возникающей после введения хлорида бария:
 а — полиморфная экстрасистолия на кривой АД;
 б — многофокальная аритмия с желудочковой экстрасистолией на кривой АД;
 в — полиморфная экстрасистолия на ЭКГ;
 г — многофокальная аритмия с желудочковой экстрасистолией на ЭКГ.

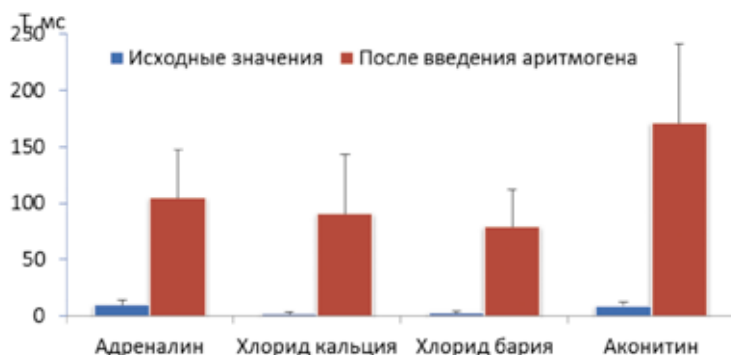


Рис. 6. Вариабельность периода сердечных сокращений.

Вывод

Нами было изучены 4 различных модели аритмии: адреналиновая, хлоридбариевая, хлоридкальциевая и аконитиновая. Данное сочетание моделей позволяет полноценно изучить широкий спектр противоаритмических препаратов и механизм их воздействия. Кроме того, в работе были подобраны основные необходимые параметры для изучения, обеспечивающие адекватное исследование новых противоаритмических препаратов: было показано, что изучение графиков АД и ЭКГ, а также вариабельности периода сердечных сокращений — достаточная основа для первичного скрининга противоаритмических препаратов.

Работа выполнена в рамках проекта «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы по Государственному контракту № 14.740.11.0923.

Список литературы

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под ред.

Хабриева П.У. Медицина. 2005.

2. Antiarrhythmic and antioxidant activity of novel pyrrolidin-2-one derivatives with adrenergic properties. Jacek Sapa, Alicja Nowaczyk, Katarzyna Kulig Naunyn-Schmied Arch Pharmacol. 2011.
3. *Grippe A.J., Johnson A.K.* Stress, depression, and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models // Stress. 2009. 12(1): 1–21.
4. *Huikuri H.V., Castellanos A., Myerburg R.J.* Sudden death due to cardiac arrhythmias // N Engl J Med. 2001. Vol. 345. No. 20.
5. *Liu N., Denegr M., Ruan Y., Avelino-Cruz J.E., Perissi A., Negri P.A., Napolitano C., Coetzee W.A., Boyden P.A., Silvia G.* Short Communication: Flecainide Exerts an Antiarrhythmic Effect in a Mouse Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia by Increasing the Threshold for Triggered Activity. Circulation Research. 2011.

6. *Luc`a F., La Meir M., Rao C.M., Parise O., Vasquez L., Carella R., Lorusso R., Daniela B., Maessen J., Gensini G.F., Gelsomino S.* Pharmacological Management of Atrial Fibrillation: One, None, One Hundred Thousand // *Cardiology Research and Practice*. 2011.
7. *Markides V., Schilling R.J.* Atrial fibrillation: Classification, pathophysiology, mechanisms and drug treatment // *Heart*. 2003;89:939–943.
8. *Walker M.J.A.* Antiarrhythmic drug research // *British Journal of Pharmacology*. 2006. 147. S222–S231.

Model evaluation of new antiarrhythmic drugs

**I.A. Ilushkina, A.N. Berchatova, I.A. Dyachenko, D.I. Rzhovsky,
G.A. Slascheva, A.N. Rodionov, A.N. Murashev, V.A. Korshunov**

This article shows 4 models of arrhythmias: adrenaline, barium chloride, calcium chloride and aconitine. This combination of models allows to fully explore the wide range of antiarrhythmic drugs and to study the mechanism of their effects. In addition, in the main parameters for study of new antiarrhythmic drugs were selected: it has been shown that the study of blood pressure and ECG-charts, as well as variability in heart rate period — sufficient basis for primary screening of antiarrhythmic drugs.

Key words: arrhythmia, blood pressure, ECG, heart rate variability.

Циркадианные различия интенсивности галоперидоловой каталепсии у овариоэктомированных самок крыс без и после эстрогенизации

Э.А. Манвелян, В.А. Батулин, М.Д. Булгакова, Н.Н. Громова

Ставропольская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития,

Ставрополь

Ставропольский государственный университет, Ставрополь

Контактная информация: д.ф.н. Манвелян Элеонора Аслибековна manveljan@rambler.ru

В экспериментах на белых крысах-самках линии Вистар сравнивали интенсивность галоперидоловой каталепсии (0,5 и 1 мг/кг) у интактных, овариоэктомированных и эстрогенизированных овариоэктомированных самок крыс в 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 3 ч. Оценку выраженности каталепсии проводили путем регистрации (в сек) длительности удержания животным заданного вертикального положения в позе «лектора».

Выполненное исследование выявило циркадианные различия в интенсивности каталепсии у интактных и овариоэктомированных самок крыс без и после эстрогенизации. Действие нейролептика зависело от дозы, времени тестирования, сохранности яичников, уровня эстрогенов. После удаления яичников каталептогенное действие нейролептического средства ослаблялось. Эстрогенизация на фоне овариоэктомии вызывала тенденцию к ослаблению суммарного среднесуточного каталептогенного эффекта галоперидола в дозе 0,5 мг/кг и к усилению в дозе 1 мг/кг.

Ключевые слова: галоперидоловая каталепсия, овариоэктомия, синэстрол, циркадианные различия.

Достаточно широкое использование антипсихотических лекарственных средств в клинической практике делает актуальными нейрофармакологические исследования на животных. Несомненные успехи в изучении механизмов специфической активности нейролептиков достигнуты за последние годы. Однако хронофармакология антипсихотических препаратов в женском организме остается слабо изученной. Свидетельства о вовлечении дофаминергической системы в эффекты нейролептиков позволили широко использовать блокатор дофаминовых рецепторов — галоперидол и вызываемое им состояние каталепсии для оценки функционального состояния дофаминергической передачи [1, 3, 8, 9, 15]. Нарушение мышечного тонуса ней-

ролептиками принимают за показатель блокады дофаминергической передачи в структурах головного мозга, а снижение выраженности каталепсии — как свидетельство уменьшения количества функционирующих дофаминовых рецепторов стриатума и снижение их аффинитета [1, 3, 14]. Нигрострионигральная система обеспечивает не только регуляцию двигательных актов, но и координирует сложные поведенческие ответы.

Вместе с тем, большой интерес представляет направленное выяснение особенностей влияния уровня половых гормонов на фармакологические эффекты антипсихотических лекарственных средств. В этой связи, целью настоящего исследования была хронобиологическая оценка выраженности галоперидоловой каталеп-

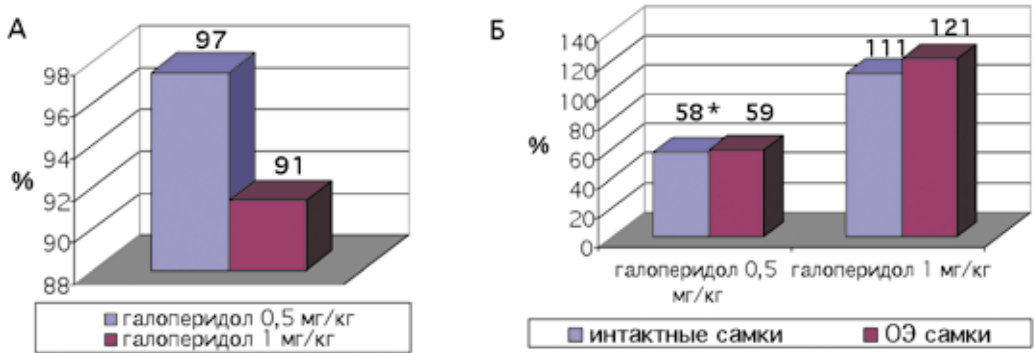


Рис. 1. Изменение выраженности галоперидоловой каталепсии у овариоэктомированных самок крыс без и после эстрогенизации.

По оси ординат (%) — время вертикализации самок крыс.

Диаграмма А: Изменение интенсивности галоперидоловой каталепсии у ОЭ самок крыс. 100% — среднесуточное среднеарифметическое время вертикализации intactных самок.

Диаграмма Б: Изменение каталептогенной активности галоперидола у эстрогенизированных овариоэктомированных самок. 100% — среднесуточное среднеарифметическое время вертикализации соответственно intactных и ОЭ самок крыс. * — при $P < 0,05$.

сии у intactных (И) и овариоэктомированных (ОЭ), а также, с учетом хорошо известных перmissивных свойств, эстрогенов кастрированных эстрогенизированных (ОЭЭ) самок крыс [4, 7, 10, 12, 13, 21, 22].

Материалы и методы

Опыты были выполнены на белых половозрелых intactных и овариоэктомированных самках крыс линии Вистар (питомник Рапполово) со средней массой 200–220 г (по 10 крыс в группе). Животных содержали в клетках-ваннах (по 5–6 крыс) при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного режима. Кормление (комбикорм) и уход осуществляли в привычном для животных режиме вивария. Обеспечивался свободный доступ крыс к пище и воде.

Для моделирования нейролептической каталепсии галоперидол вводили в дозах 0,5 и 1 мг/кг внутривенно.

Через час после инъекции приступали к оценке выраженности каталепсии путем регистрации (в сек) длительности удержания животным заданного вертикального положения на опоре (так называемая поза «лектора»). Выполняли 10 определений у каждой особи, при этом регистрировали время, когда крыса убирала с опоры первую лапу (первый латентный период) и вторую лапу (второй латентный период). Овариоэктомию выполняли по общепринятой методике [6]. Запланированные опыты на овариоэктомированных крысах начинали спустя 2 недели после операции. Синэстрол в дозе 0,1 мг/кг вводили внутривенно в течение двух недель после кастрации, затем проводили тестирование крыс. Эксперименты проводили в 9, 12, 15, 18, 21, 24, 3 и 6 часов.

Во время работы с животными соблюдались принципы Хельсинкской Декларации о гуманном обращении с объектами исследования.

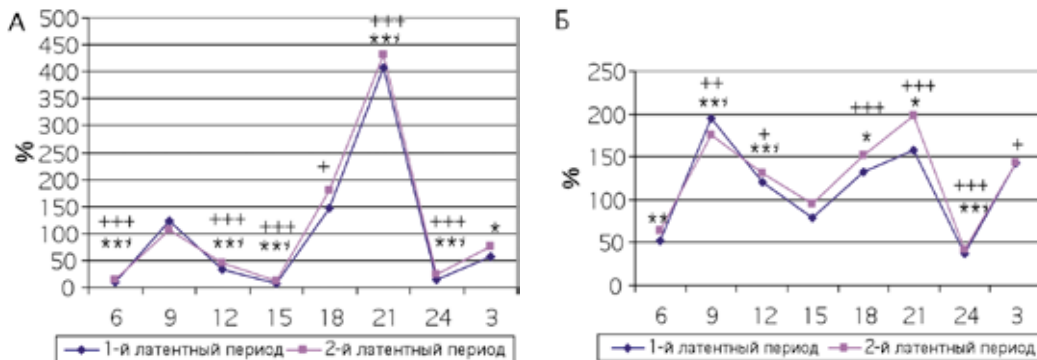


Рис. 2. Циркадианные изменения интенсивности галоперидоловой катаlepsии у овариоэктомированных эстрогенизированных самок крыс по сравнению с показателями кастрированных самок. По оси абсцисс — время тестирования; по оси ординат (%) — время вертикализации овариоэктомированных эстрогенизированных самок при введении галоперидола 0,5 мг/кг (А) и 1 мг/кг (Б) (первый и второй латентный периоды). 100% — показатели овариоэктомированных самок без эстрогенизации. Достоверность отличий при сравнении первого (*) и второго (+) латентных периодов: * (+) — при $P < 0,05$; ** (++) — при $P < 0,01$; *** (+++) — при $P < 0,001$.

Полученные результаты обрабатывались статистически с использованием пакета компьютерных программ. Данные тестирования представляли графически. Проводили относительный сравнительный анализ, в том числе, вычисляя среднесуточное среднеарифметическое значение латентного периода. Сопоставляли данные о влиянии галоперидола у интактных, овариоэктомированных и эстрогенизированных овариоэктомированных самок. Выявление статистически значимых отличий проводили с помощью критериев Стьюдента, Вилкоксона, Манна-Уитни [11].

Результаты и их обсуждение

В ходе наблюдений были выявлены циркадианные различия в интенсивности галоперидоловой катаlepsии у интактных и овариоэктомированных самок крыс без и под влиянием экзогенно вводимого эстрогенного препарата.

1. Тестирование интактных и овариоэктомированных самок крыс.

Анализ среднесуточных среднеарифметических латентных периодов вертикализации ОЭ крыс, получавших галоперидол в дозе 0,5 мг/кг, по сравнению с интактными самками, также получавшими нейролептик в указанной дозе (данные приняты за 100%), не выявил заметных отличий в интенсивности катаlepsии (ОЭ: $n=160, 36,15 \pm 5,92$; И: $n=160, 37,12 \pm 4,49$) (рис. 1А). Однако на протяжении суточного цикла выраженность катаlepsии у гонадэктомированных крыс была достоверно ниже, чем у интактных особей в 9, 12, 18, 21 ч, и выше в 6, 15, 24 ч.

На фоне большей дозы галоперидола (1 мг/кг) среднесуточный показатель катаlepsии у кастрированных крыс был несколько ниже, чем у интактных самок (ОЭ: $n=160, 82,64 \pm 3,88$; И: $n=160, 89,9 \pm 2,34$). При этом в течение суток интенсивность катаlepsии у самок без гонад была достоверно ниже в 6, 12, 21 ч и выше в 3 ч по сравнению с интактными особями.

Тем самым, показано ослабление суммарной катаlepsитогенной активности гало-

периода у овариоэктомированных крыс по сравнению с интактными самками.

2. Тестирование эстрогенизированных овариоэктомированных самок крыс.

Сравнение среднесуточного среднеарифметического показателя вертикализации на фоне 0,5 мг/кг галоперидола у эстрогенизированных ОЭ крыс с данными кастрированных самок (100%) выявило уменьшение интенсивности каталепсии синэстролом (ОЭЭ: n=160, 21,43±5,27) (рис. 1А). На протяжении суточного цикла выраженность каталепсии у ОЭ крыс, получавших эстрогенный препарат, была достоверно ниже, чем у кастрированных особей без синэстрола в 3, 6, 15, 24 ч, и выше в 18, 21 ч (рис. 2А).

При введении большей дозы галоперидола среднесуточный среднеарифметический показатель каталепсии ОЭ эстрогенизированных крыс был немного выше, чем у ОЭ самок (ОЭЭ: n=160, 100,2±12,1). При этом на протяжении суток интенсивность каталепсии у ОЭ крыс на фоне синэстрола была достоверно ниже в 6, 24 ч и выше в 3, 9, 12, 18, 21 ч по сравнению с кастрированными особями (рис. 2Б).

Тем самым, показано ослабление суммарной каталептогенной активности галоперидола в дозе 0,5 мг/кг у ОЭ крыс после эстрогенизации, выражено в ночные, утренние и дневные часы. Большая доза нейролептика (1 мг/кг) в сочетании с синэстролом вызывала более интенсивную каталепсию у кастрированных самок в дневное и вечернее время.

Сравнение среднесуточного среднеарифметического показателя вертикализации при использовании малой дозы нейролептика у эстрогенизированных ОЭ и интактных самок (100%) выявило заметное снижение интенсивности каталепсии (ОЭЭ: n=160, 21,63±5,27; p<0,05) (рис. 1Б). На протяжении суточного цикла выраженность каталепсии у кастрированных крыс, получавших синэстрол, была достоверно ниже, нежели у интактных особей в 6, 9, 12, 15 и 3 ч (рис. 3А).

На фоне большей дозы галоперидола и синэстрола среднесуточный среднеарифметический показатель полного тестирования ОЭ крыс был несколько выше, чем у интактных самок (ОЭЭ: n=160, 100,2±12,05). При этом на протяжении суток интенсивность каталепсии

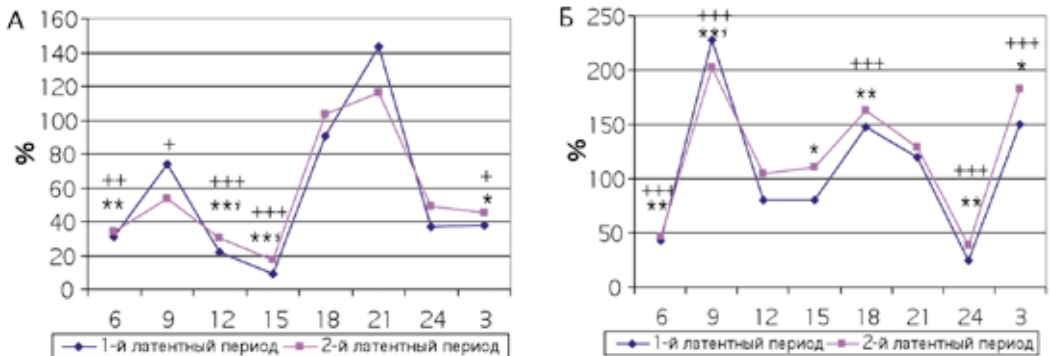


Рис. 3. Циркадианные изменения интенсивности галоперидоловой каталепсии у овариоэктомированных эстрогенизированных самок крыс по сравнению с показателями интактных самок. По оси ординат (%) — время вертикализации овариоэктомированных эстрогенизированных самок. 100% — показатели интактных самок. Остальные обозначения на рис. 2.

у ОЭЭ крыс была достоверно ниже в 6, 24 ч и выше в 3, 9, 18 ч по сравнению с интактными особями (рис. 3Б).

Тем самым, у эстрогенизированных кастрированных крыс по сравнению с интактными самками ограничивалась суммарная каталептогенная активность галоперидола в дозе 0,5 мг/кг. Интенсивность каталепсии на фоне нейролептика в большей дозе (1 мг/кг) при этом была несколько выше активности препарата у интактных самок.

Таким образом, эстрогенизация на фоне овариоэктомии вызывала тенденцию к ослаблению суммарного среднесуточного каталептогенного действия галоперидола в дозе 0,5 мг/кг и к усилению в дозе 1 мг/кг.

Согласно полученным результатам, после кастрации у самок ослабляется каталептогенное действие галоперидола, что, вероятно, можно объяснить экспериментальным фактом выраженного снижения плотности дофаминовых рецепторов D1- и D2- подтипов без изменения их чувствительности после овариоэктомии у самок крыс [17]. Наши наблюдения коррелируют с ранее полученными данными об ограничении после удаления яичников специфической антиконфликтной активности диазепам, гидазепам, антидепрессивного влияния амитриптилина в плавательном тесте, седативного эффекта галоперидола и клозапина в «открытом поле» [10]. Сходное изменение фармакологического эффекта показано при изучении действия у овариоэктомированных самок кардиотропных средств по данным кардиоинтевалографии, вариационной пульсометрии [4].

С другой стороны, у овариальных эстрогенов показаны дофаминоблокирующие свойства. Поскольку аналогичная активность лежит в основе специфического

эффекта нейролептиков, этим обосновывается происхождение их синергичного с гормонами действия на психику [1, 3, 13].

В наших исследованиях заместительная терапия синэстролом приводила к частичной коррекции нарушенного поведения у ОЭ самок крыс. При комбинированном использовании с нейролептиком после овариоэктомии синэстролом потенцировал галоперидоловую каталепсию, наиболее отчетливо — при введении препарата в дозе 1 мг/кг в вечернее время. Наши наблюдения согласовывались с ранее полученными сведениями о частичном восстановлении синэстролом противотревожной активности амитриптилина, диазепамы при многопараметрическом тестировании, в конфликтной ситуации и в «открытом поле» и работами авторов, показавших оптимизирующее действие на вегетативный баланс по данным вариационной пульсометрии сочетания эстрадиола с пропранололом и каптоприлом [4, 10]. Сходный потенцирующий эффект эстрадиола на антидепрессивное действие кетансерина, 8-ОН - DPAT показан в тесте Порсолта [7, 12, 13].

Вместе с тем, при сочетании синэстрола с нейролептиком, особенно в малой дозе, было показано ограничение каталептогенной активности последнего. Полученные результаты косвенно согласуются с данными клиницистов о том, что у женщин в постменопаузе, страдающих болезнью Паркинсона, использование эстрогенов облегчало симптомы заболевания. При этом было установлено, что дополнительное назначение эстрогенов повышает эффективность дофаминергической терапии [2, 3, 16]. Учитывая эти сведения, можно предположить, что целенаправленное совместное фармакологическое воздействие как на дофами-

новые, так и на эстрогеновые рецепторы приводит к восстановлению дофаминергических процессов у ОЭ самок.

Возможно, механизм изменения интенсивности каталепсии у кастрированных самок крыс после эстрогенизации связан с повышением эстрадиолом нейронального синтеза дофамина без истощения его содержания в стриатуме, но не изменяет содержание метаболита дофамина — диоксифенилуксусной кислоты [3, 18, 19]. Предполагают, что эстрадиол подавляет захват дофамина в стриатуме за счет ингибирования мембранного транспортера [24]. Введение эстрадиола ОЭ самкам повышает связывающую способность D2-подтипа рецепторов в гипофизе и в гипоталамусе (мезолимбическая и нигростриатная системы), а также стимулирует рост нейритов дофаминергических нейронов [17, 20]. Показано, что эстрогены могут повышать активность дофаминергической нейротрансдачи за счет десенситизации D2-подтипа рецепторов, а также влияя на опосредованную ГАМК-регуляцию дофамина [22].

Полученные нами результаты могут быть связаны с нормализующим действием синэстрола на дисбаланс эстрогенов и скоординированность между функциональной активностью гормональной системы и активностью медиаторных систем в условиях тотальной овариоэктомии.

В ходе исследования были выявлены циркадианные различия в динамике каталепсии, а, следовательно, в ответной фармакологической реакции при введении антипсихотического средства, которые, в определенной мере, могут быть обусловлены особенностями хронэргии и хронестезии у интактных и кастрированных особей [1, 5, 23]. Для циркадианных различий в фармакологической чувстви-

тельности имеет значение аффинность дофаминовых рецепторов и плотность их связывания с мембранами, в частности, клеток стриатума. Различная активность ряда метаболизирующих ферментов печени, зависящая от уровня половых гормонов, несомненно, сказывается на фармакокинетике нейролептика [3].

Таким образом, выполненное исследование выявило циркадианную диссимилиацию двигательных ответов при введении галоперидола интактным и овариоэктомированными самкам крыс без и после эстрогенизации.

Выводы

1. Отмечаются циркадианные различия в интенсивности каталепсии у интактных и овариоэктомированных самок крыс без и после эстрогенизации.

2. Овариоэктомия ослабляет интенсивность галоперидоловой каталепсии у самок крыс.

3. Эстрогенизация на фоне овариоэктомии вызывает тенденцию к ослаблению суммарного среднесуточного каталептогенного эффекта галоперидола в дозе 0,5 мг/кг и к усилению в дозе 1 мг/кг.

Список литературы

1. *Арушанян Э.Б., Батурич В.А., Белозерцев Ю.А.* Нейролептические средства. Чита. 1984. 100 с.
2. *Арушанян Э.Б.* Половые различия в чувствительности к психотропным средствам // Эксперим. и клин. фармакол. 2007. т. 70. № 1. С. 63–71.
3. *Арушанян Э.Б.* Психофармакология. Ставрополь: Изд-во Ставропольской государственной медицинской академии. 2008. т.1. 671 с.
4. *Батурич В.А., Колодийчук Е.В.* Половая диссимилиация эффектов кардиотропных средств. Ставрополь. Изд-

- во Ставропольской государственной медицинской академии. 2003. 111 с.
5. **Батурич В.А., Манвелян Э.А., Булгакова М.Д.** Зависимость от пола и времени суток интенсивности галоперидоловой каталепсии у крыс // Биомедицина. 2006. № 4. С. 78–79.
 6. **Кабак Я.М.** Практикум по эндокринологии. Основные методики экспериментально-эндокринологических исследований. М.: Изд-во Московского университета. 1968. 276 с.
 7. **Казакова С.Б., Федотова Ю.О., Сапронов Н.С.** Влияние тамоксифена на тревожность у интактных и овариоэктомизированных самок крыс // Эксперим. и клин. фармакол. 2007. т. 70. № 5. С. 3–8.
 8. **Козловский В.Л., Прахье И.В., Кенунен О.Г.** Влияние блокаторов кальциевых каналов на эффекты галоперидола и фенамина у мышей и крыс // Эксперим. и клин. фармакол. 1996. т. 59. № 3. С. 12–15.
 9. **Коршунов А.М., Воронина Т.А., Чурюканов В.В., Яхно Н.Н.** Влияние галоперидола в малой дозе на развитие синдрома паркинсонизма в эксперименте // Эксперим. и клин. фармакол. 1995. т. 58. № 6. С. 7–9.
 10. **Манвелян Э.А.** Половая диссимилиация эффектов психотропных средств. Ставрополь: Изд-во Ставропольского государственного университета. 2008. с. 106.
 11. **Реброва О.Ю.** Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: МедиаСФЕРА. 2002. 212 с.
 12. **Сапронов Н.С., Федотова Ю.О., Кузнецова Н.Н.** Антиамнестический эффект антагониста $\alpha 7$ -никотиновых рецепторов RJR-2403 у овариоэктомизированных крыс среднего возраста с деменцией Альцгеймеровского типа // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2006. т. 142. № 12. С. 656–658.
 13. **Федотова Ю.О., Сапронов Н.С.** Эффекты эстрогенов в центральной нервной системе // Успехи физиол. наук. 2007. т. 38. № 2. С. 46–62.
 14. **Эпштейн О.И., Воронина Т.А., Белопольская М.Л., Хейфец И.А., Дугина Ю.Л., Сергеева С.А.** Исследование феномена бипатии на примере галоперидола // В кн. «Человек и лекарство». М. 2008. 735 с.
 15. **Якимовский А.Ф.** Сравнение эффектов галоперидола при системном введении и инъекции в стриатум у крыс // Эксперим. и клин. фармакол. 1993. т. 56. № 1. С. 11–13.
 16. **Blanchert P.J., Fang F., Hyland K. et al.** Short-term effects of high-dose 17beta-estradiol in post-menopausal PD patients: a crossover study // Ibid. 2000. v. 53. P. 91–95.
 17. **Daniel J.M., Sulzer J.K., Hulst J.L.** Estrogen increases the sensitivity of ovariectomized rats to the disruptive effects produced by antagonism of D2 but not D1 dopamine receptors during performance of a response leaning task // Horm. Behav. 2006. v. 49. P. 38–44.
 18. **Di Paolo T., Rouillard C., Bedard P.** 17 β -estradiol and a physiological dose acutely increases dopamine turnover in rat brain // Eur. J. Pharmacol. 1985. v. 117. P. 197–203.
 19. **Di Paolo T.** Modulation of brain dopamine transmission by sex steroids // Rev. Neurosci. 1994. v. 5. P. 27–42.
 20. **McEwen B. S., Chao H., Angulo J.** Glucocorticoid and estrogen effects on the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic system // Trophic Regulation of the Basal Ganglia. / Eds. Fuxe K., Ag-

- nati L., Bjelke B., Ottoson D.L. — London: Pergamon Press. 1994. P. 67–88.
21. *McEwen B.S., Alves S.E.* Estrogen actions in the central nervous system // *Endocrine Rew.* 1999. v. 20. P. 279–307.
22. *McEwen B.S.* Estrogen actions throughout the brain // *Rec/ Progress Hrm. Res.* 2002. v. 57. P. 357–384.
23. *Reinberg A.* Advances in human chronopharmacology // *Chronobiologia.* 1976. № 2. P. 151–166.
24. *Tompson T.L., Moore C.C., Smith B.* Estrogen priming modulates autoreceptor-mediated potentiation of dopamine uptake // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. v. 401. P. 357–363.

Circadian variations in the intensity of haloperidol's catalepsy in female rats without and after estrogen used

E.A. Manveljan, V.A. Baturin, M.D. Bulgakova, N.N. Gromova

In experiments haloperidol's catalepsy intensity (0.5 and 1 mg/kg) of intact ovarioectomized and estrogen ovarioectomized (at 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 3 o'clock) rats were compared. Assessment of the severity of catalepsy was performed by registration (in seconds) the duration of retention of animals given a vertical situation in the pose of "lecturer".

Circadian variations in the intensity of catalepsy in intact female rats and ovarioectomized without and after estrogen used carried out the study found. Neuroleptic action on the dose, test time, keeping the ovaries, estrogen levels depended. Cataleptogenic neuroleptic action after removal of the ovaries means weakened. Estrogen used against ovarioectomy a tendency to reduce the total average daily cataleptogenic effect of haloperidol in dose of 0.5 mg/kg and to increase in dose of 1 mg/kg caused.

Key words: haloperidol's catalepsy, ovarioectomy, synoestrolum, circadian differences.

Измерение смещения барабанной перепонки лазерным автодинным методом в модельном опыте на височных костях домашней свиньи

Г.О. Мареев, О.В. Мареев

Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского,
Саратов

Контактная информация: Мареев Глеб Олегович jev_trasher@mail.ru

Рассматриваются вопросы измерения подвижности барабанной перепонки при помощи лазерного автодина в модельных опытах на свежих препаратах височных костей домашних свиней. Проведены исследования на интактном ухе, с имитацией адгезивных процессов в среднем ухе и разрыва цепи слуховых косточек. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения лазерного автодинного эффекта для измерения наносмещений биологических объектов.

Ключевые слова: среднее ухо, барабанная перепонка, адгезивный отит, лазерный автодин.

Измерение амплитуды смещения барабанной перепонки — чрезвычайно важный вопрос теоретической и практической медицины, который не решен и в настоящее время [1, 2]. Предлагавшиеся ранее способы неточны, либо весьма громоздки и не могут быть в дальнейшем развиты для использования *in vivo* [2, 6, 8, 9]. В настоящее время, в связи с созданием лазерных автодинов на квантоворазмерных структурах, появилась возможность проводить измерения микро- и нановибраций биологической ткани *in vivo* [3]. Автодинный эффект основан на изменении режима работы лазерного диода при возвращении части излучения обратно в его резонатор, данная система обладает высокой чувствительностью к отраженному сигналу [3, 4]. Для анализа автодинного сигнала в предположении гармоничности колебаний барабанной перепонки использовалась известная процедура разложения интерференционного сигнала в ряд по функциям Бесселя и в ряд Фурье. Амплитуду колебаний барабанной перепонки

определяют по спектру автодинного сигнала. В ряде работ [4, 5] установлена зависимость амплитуды гармоник, имеющей максимальное значение в спектре автодинного сигнала, от амплитуды колебаний барабанной перепонки.

Для определения вибрационных характеристик как отдельно барабанной перепонки, так и звукопроводящей цепи среднего уха в целом, нами проводилась серия модельных опытов, в которых использовались свежие препараты височных костей домашних свиней.

Материалы и методы

В целях проведения исследования *in vitro* на нативном свежем препарате височных костей нами были использованы височные кости домашних свиней (*Sus scrofa domestica*), ввиду их схожести с человеческими по площади и строению барабанной перепонки, а также по приблизительно схожей анатомии и микромеханике среднего уха — близкие к человеческим размеры и вес слу-

ховых косточек [7]. Для исследования взяты животные породы крупная белая, возраст 183–195 дней, массой 95–115 кг, коммерческих генетических линий, полученные из ЗАО «Липовское», содержащиеся в конвенциональных условиях предприятия; животные были забиты на сертифицированном коммерческом предприятии, откуда получались непосредственно свежие препараты височных костей. Всего измерения проведены на 7 животных (13 ушей; у одного животного были обнаружены признаки хронического гнойного среднего отита с деструктивными изменениями в барабанной полости). Определенным отличием свиней от височной кости человека является неполное погружение лабиринта внутреннего уха в каменистую часть височной кости, а также более наклонное расположение медиальной стенки барабанной полости височной кости свиньи. Первое обстоятельство весьма способствует проведению измерений, так как облегчает методику препарирования и доступ к среднему уху с внутренней стороны височной кости, дает возможность аккуратно удалить слуховые косточки и провести измерения непосредственно вибрационных свойств барабанной перепонки. Наружный слуховой проход имеет иное направление, нежели у человека, а также более выраженный изгиб и довольно длинный хрящевой отдел, что является препятствием при доступе к барабанной перепонке через наружный слуховой проход и требует тщательной предварительной подготовки препарата. Использовались височные кости животных, время с момента смерти которых до проведения эксперимента не превышало 3–4 ч.

Экспериментальное определение амплитуд колебаний барабанной перепонки

проводилось с использованием автодиной измерительной системы [4, 5], схема которой приведена на рис. 1.

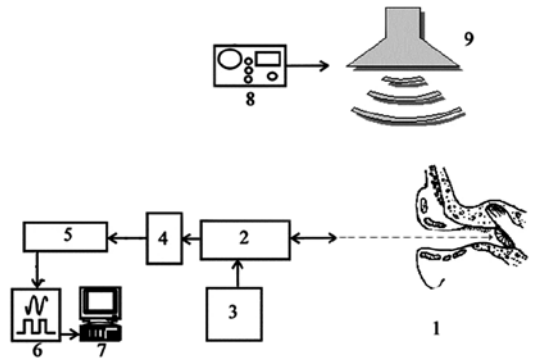


Рис. 1. Схема измерительной установки:

1 — барабанная перепонка с расширительной воронкой; 2 — лазерный диод на квантоворазмерных структурах; 3 — источник тока лазерного диода; 4 — фотоприемник; 5 — широкополосный усилитель, содержащий фильтр переменного сигнала; 6 — аналого-цифровой преобразователь; 7 — компьютер; 8 — генератор звуковых колебаний; 9 — излучатель звуковых волн.

В состав измерительной автодиной системы входит лазерный диод *RLD-650* 5 с длиной волны излучения 652 нм. На барабанную перепонку 1 направляют когерентное излучение от лазерного диода 2, питаемого от источника тока 3. Отраженное от барабанной перепонки лазерное излучение регистрируется с помощью фотоприемника 4. Сигнал с фотоприемника поступает через широкополосный усилитель, содержащий фильтр переменного сигнала 5, на вход аналого-цифрового преобразователя 6 компьютера 7. Для возбуждения колебаний барабанной перепонки используется излучатель звуковых волн 9 (исследование проводилось в свободном звуковом поле), работающий от генератора звуковых колебаний 8.

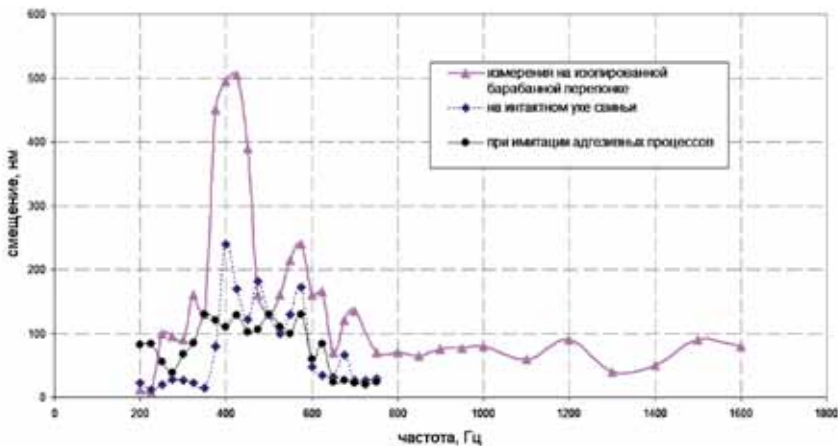


Рис. 2. Амплитудно-частотная характеристика барабанной перепонки, снятая при помощи лазерного автодинного метода при уровне звукового давления 85 дБ для:

- интактного препарата височной кости домашней свиньи;
- изолированного препарата барабанной перепонки домашней свиньи;
- при имитации адгезивных процессов в барабанной полости.

При исследовании снималась амплитудно-частотная вибрационная характеристика (АЧВХ) барабанной перепонки при уровне звукового давления у барабанной перепонки 65 и 85 дБ. Акустические измерения проводились при помощи акустического зонда и сертифицированного комплекса аппаратуры для акустических измерений фирмы «*Bruel & Kjaer*».

Исследования на интактном препарате среднего уха были произведены на 8 свежих препаратах височных костей домашней свиньи. При этом для получения адекватного доступа к барабанной перепонке долотами и бором практически полностью удалялась хрящевая и костная части наружного слухового прохода, вплоть до *annulus tympanicus*.

Исследования на препаратах среднего уха с имитацией разрыва цепи слуховых косточек были проведены на 2-х препаратах свежих височных костей домашней свиньи. Барабанная полость бором вскрывалась с внутренней стороны после удаления костного лабиринта, аккуратно удалялись слу-

ховые косточки. В результате становилась доступна для исследования непосредственно изолированная барабанная перепонка. Такой подход значительно облегчил приготовление препарата. Результаты измерения колебаний изолированной барабанной перепонки дают возможность судить о ее собственных резонансных частотах, а также представить в эксперименте модель ситуации с разобщением цепи слуховых косточек.

Имитация адгезивных процессов в барабанной полости проводилась на 3-х свежих препаратах височной кости домашней свиньи. Барабанная полость на этих препаратах была вскрыта с внутренней стороны по описанным выше методикам. На область наковаленно-молоточкового сустава наносилась капля резинового клея «Момент» (ОАО «Хенкель-ЭРА», Россия), которая также фиксировала сустав к стенке барабанной полости.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования подвижности барабанной перепонки на свежих

препаратах височных костей домашней свиньи представлены на рис. 2 (при уровне звукового давления 85 дБ).

Хорошо заметно, что в низкочастотной области АЧВХ барабанной перепонки интактного среднего уха наблюдаются четыре максимума, соответствующие четырем резонансным частотам данной системы — 375, 475, 550 и 675 Гц. С увеличением интенсивности звукового воздействия значительно увеличивается амплитуда колебаний барабанной перепонки на частоте 550 Гц, а положение максимума незначительно смещается в область низких частот. Также происходит рост амплитуды колебаний на частоте 675 Гц, а амплитуда колебаний барабанной перепонки на остальных частотах возрастает незначительно. Отсюда можно сделать вывод, что для системы «барабанная перепонка — слуховые косточки» резонансными являются частоты 550 и 675 Гц. Максимальная зарегистрированная амплитуда составила 257 нм на частоте 550 Гц.

При измерениях подвижности на препарате среднего уха с разъединением цепи слуховых косточек было обнаружено, что барабанная перепонка, не нагруженная на цепь слуховых косточек и структуры внутреннего уха, имеет гораздо больший размах колебаний и некоторые собственные резонансные частоты, отличные от частот собственного вибрационного резонанса системы интактного уха домашней свиньи. Для «свободной» барабанной перепонки наблюдаются максимумы амплитуды колебаний на частотах 370 и 575 Гц; отмечается равномерное увеличение амплитуды колебаний барабанной перепонки во всей области исследуемых частот, за исключением области вблизи 700 Гц, где наблюдается появление дополнительной резонансной

частоты. Максимальная зарегистрированная амплитуда составила 505 нм на частоте воздействия 425 Гц при уровне звукового давления, превышающего порог слышимости на 60 дБ.

Из сопоставления АЧВХ барабанной перепонки для случая целостного слухового аппарата и случая с разрывом в цепи «барабанная перепонка — слуховые косточки» можно сделать вывод, что диагностирование нарушения передаточной функции в цепи «барабанная перепонка — слуховые косточки» возможно по спектральной картине амплитудного отклика барабанной перепонки на звуковую нагрузку различной интенсивности. Амплитудный отклик контролируется по спектру сигнала полупроводникового лазерного излучателя на квантоворазмерных структурах, работающего в автодинном режиме.

На АЧВХ барабанной перепонки с имитацией адгезивных процессов в барабанной полости можно отметить статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение максимальной амплитуды вибрации барабанной перепонки до 80–100 нм, по сравнению с интактным препаратом височной кости домашней свиньи, явления резонанса выражены на частотах 400–600 Гц.

Выводы:

1. Лазерный автодинный измеритель наносмещений может использоваться для регистрации амплитуд вибрации биологических объектов с высокой точностью.
2. Измерения на свежих препаратах интактного среднего уха выявили резонансные частоты 550 и 675 Гц.
3. Максимальная зарегистрированная амплитуда вибрации барабанной перепонки интактного препарата составила 257 нм на частоте воздействия 550 Гц при уровне звукового давления 60 дБ;

при разрыве цепи слуховых косточек амплитуда колебаний в тех же условиях достигает 505 нм.

4. Отмечены достоверные отличия в регистрируемой данным методом амплитуде вибраций барабанной перепонки при имитации адгезивных процессов — снижение амплитуды вибрации барабанной перепонки до 80–100 нм, изменение частот ее резонанса.

5. Результаты указанных модельных опытов являются обоснованием экспериментальных исследований на человеке *in vivo*.

Список литературы

1. **Гельфанд С. А.** Слух: введение в физиологическую и психологическую акустику: Пер. с англ. — М.: Медицина. 1984. 352 с.
2. **Кобрак Г.** Среднее ухо. — М.: Медгиз. 1963. 455 с.
3. **Усанов Д.А., Скрипаль Ал.В., Скрипаль А.В.** Физика полупроводниковых радиочастотных и оптических автодинов — Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 2003. 312 с.
4. **Усанов Д.А., Скрипаль А.В., Добдин С.Ю.** Определение ускорения при микро- и наносмещениях по автодинному сигналу полупроводникового лазера на квантово-размерных структурах // ПЖТФ. 2010. Т. 36. вып. 21. С. 78–84.
5. **Усанов Д.А., Скрипаль А.В., Камышанский А.С.** Измерение скорости нанометровых перемещений по спектру автодинного сигнала лазера на квантоворазмерных структурах // ПЖТФ. 2004. № 7. С. 77–82.
6. **Frenckner P.** Movements of the tympanic membrane and of the malleus in normal cases and in cases of otosclerosis // Acta Otolaryngol. 1939. Vol. 27. P. 587–607.
7. **Pracy J.P., White A., Mustafa Y., Smith D., Perry M.E.** The comparative anatomy of the pig middle ear cavity: a model for middle ear inflammation in the human? // J. Anat. 1998. Vol. 192. P. 359–368.
8. **Rosowski J.J., Merchant S.N.** The Function and Mechanics of Normal, Diseased and Reconstructed Middle Ears. — Kugler Publications. 2000. 400 p.
9. **Tonndorf J., Khanna S.M.** Submicroscopic displacement amplitudes of the tympanic membrane (cat) measured by a laser interferometer // J. Acoust. Soc. Amer. 1968. Vol. 44. P. 1546–1554.

Measurement of shift of an eardrum by a laser avtodinny method in modeling experience on temporal bones of a house pig

G.O. Mareev, O.V. Mareev

The results of pig tympanic membrane mobility, measured by laser autodine effect are present in article. Fresh specimen of pig's temporal bone were used. Some measurements were made on intact middle ear structures, on the ear specimen with imitation of adhesive process and hearing chain destruction. Assessed results are important for further investigation of middle ear mechanics through laser autodine effect.

Key words: middle ear, tympanic membrane, adhesive otitis media, laser autodine.

Оценка микроциркуляции тканей передней брюшной стенки и некоторых органов брюшной полости как потенциальных аутотрансплантатов в абдоминальной хирургии

О.В. Мусатов, С.А. Зурнаджан, М.Н. Тризно

*Астраханская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ,
Астрахань*

Контактная информация: к.м.н. Мусатов Олег Валентинович olegmusatv@rambler.ru

Эксперименты выполнены на 10 кроликах породы шиншилла. Методом лазерной доплеровской флуометрии определены показатели микроциркуляции кожи, мышц передней брюшной стенки, париетальной брюшины, большого сальника, брыжейки тонкой кишки и её стенки, желудка – в области дна, тела, большой кривизны и привратника. Полученные значения интенсивности кровотока анализировались амплитудно-частотным спектром и вейвлет-анализом. Установлено, что интенсивность микроциркуляции в стенке желудка имела наибольшие значения по сравнению с другими исследованными органами и тканями. При этом наиболее оптимальным, с точки зрения интенсивности микроциркуляции, являлись тело и большая кривизна желудка.

Ключевые слова: микроциркуляция, желудок, сальник.

В современной хирургии одной из актуальных проблем является лечение разрывов паренхиматозных органов брюшной полости, которые по статистике занимают лидирующее положение при тупой травме живота [3, 21, 22]. Поэтому одной из важных задач при решении данного вопроса является подбор пластических материалов, обеспечивающих адекватную регенерацию их ран с продуктивным течением воспалительно-репаративного процесса и меньшим отрицательным воздействием на иммунную систему [15, 19]. Проведенные в этом направлении исследования установили, что биологические материалы — мышцы передней брюшной стенки [10, 11], серозно-мышечный лоскут желудка [2, 6], большой сальник [20], брыжейка [8] и стенка тонкой кишки [1, 4, 16, 23] — имели преимущество перед синтетиче-

скими [5, 18, 24]. Изучение регенерации ран после экспериментальных аутопластических операций позволили высказать предположение о механизме тканевой диффузии между исследуемыми трансплантатами и реципиентным ложем органов [13]. В этой связи, дополнительно предпринята возможность проанализировать её и методом лазерной доплеровской флуометрии [7, 9, 12].

Цель. Исследование микроциркуляции ряда органов брюшной полости и тканей передней брюшной стенки, использованных в качестве донорских, методом лазерной доплеровской флуометрии.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования по оценке микроциркуляции в органах

брюшной стенки и интактных тканях области живота выполнены на 10 кроликах-самцах породы шиншилла (*Oryctolagus cuniculus chinchilla*) в возрасте 6–12 мес. и массой 1,5–2,0 кг, выведенных на кроликоферме «Астрахань-МИ-АКРО», которые в процессе эксперимента содержались в условиях вивария. Под наркозом (кетамин 1 мг/кг внутримышечно) осуществлялась верхняя-срединная лапаротомия. Исследования микроциркуляции проводились в тканях исследуемых органов методом лазерной доплеровской флуометрии (ЛДФ) при помощи аппарата «ЛАКК-01» производства НПП «Лазма» (Россия). Датчиком указанного аппарата последовательно снимали показатели в области передней брюшной стенки (ПБС), ее мышц, а также париетальной брюшины, брыжейки тонкой кишки и её стенки. В самом желудке показатели интенсивности кровотока исследовались отдельно: в области дна, тела, большой кривизны и привратника, в большом сальнике исследуемые значения определялись по левому и нижнему его краям, как в местах с наиболее интенсивной микроциркуляцией [17]. Время снятия показаний с каждой точки продолжалось не менее двух мин [9]. ЛДФ анализировались с помощью амплитудно-частотного спектра (АЧС) и вейвлет-анализа. Полученные данные измерялись в перфузионных единицах (ПЕ).

После выполненных исследований все животные выводились из эксперимента внутривенным введением тиопентала с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МинВУЗа №724 от 13.11.1984 г.).

Количественные результаты подвергались статистической обработке с вы-

числением средних величин и их ошибок ($M \pm m$). Достоверными считались различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На этапе оперативного доступа были зафиксированы основные показатели микроциркуляции различных органов и тканей: для кожи передней брюшной стенки они составили — $19,85 \pm 0,8$ ПЕ; нейрогенный тонус (НТ) — $5,6 \pm 0,23$; миогенный тонус (МТ) — $4,95 \pm 0,19$; показатель шунтирования (ПШ) — $0,88 \pm 0,07$; данные по мышцам передней брюшной стенки при оперативном вмешательстве в среднем составили $31,35 \pm 1,4$ ПЕ, МТ — $5,55 \pm 0,25$, НТ — $4,96 \pm 0,22$, ПШ — $1,06 \pm 0,09$; париетальная брюшина — $23,42 \pm 1,8$ ПЕ; нейрогенный тонус — $2,01 \pm 0,14$; миогенный тонус — $3,11 \pm 0,29$; ПШ — $1,47 \pm 0,11$.

По завершении операционного доступа искомые значения интактного желудка составили: большая кривизна — $37,9 \pm 1,8$ ПЕ; НТ — $1,93 \pm 0,13$; МТ — $2,14 \pm 0,18$; ПШ — $1,11 \pm 0,09$; дно — $41,2 \pm 2,1$ ПЕ; НТ — $2,01 \pm 0,18$; МТ — $2,12 \pm 0,18$; ПШ — $1,14 \pm 0,08$; пилорический отдел — $37,08 \pm 1,7$ ПЕ; НТ — $1,99 \pm 0,12$; МТ — $2,21 \pm 0,18$; ПШ — $1,03 \pm 0,08$; тело — $43,04 \pm 2,1$ ПЕ; НТ — $2,07 \pm 0,9$; МТ — $2,14 \pm 0,14$; ПШ — $0,98 \pm 0,09$. В других интактных органах брюшной полости исследуемые показатели были следующими: в стенке тонкой кишки — $34,51 \pm 1,6$ ПЕ, НТ — $1,6 \pm 0,11$, МТ — $2,2 \pm 0,17$, ПШ — $1,09 \pm 0,08$; в брыжейке тонкой кишки — $22,71 \pm 1,1$ ПЕ, НТ — $2,34 \pm 0,17$, МТ — $3,11 \pm 0,22$, ПШ — $0,98 \pm 0,06$ и по левому и нижнему краям большого сальника — $26,73 \pm 1,3$ ПЕ, МТ — $4,31 \pm 0,29$, НТ — $4,1 \pm 0,2$, ПШ — $0,95 \pm 0,08$.

Полученные результаты показали (рис. 1), что в стенке желудка констати-

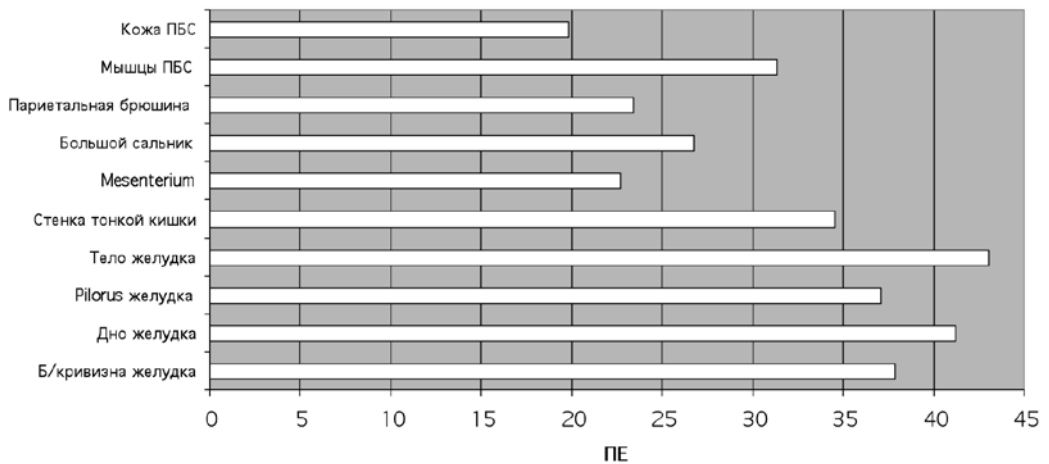


Рис. 1. Показатели интенсивности микроциркуляции некоторых органов и тканей области живота (М).

рована наибольшая интенсивность микроциркуляции. При этом ее сравнение в различных отделах желудка выявило его максимальное значение в области тела — $43,04 \pm 2,1$ ПЕ, которое несколько уменьшалось в области дна, большой кривизны и пилорического отдела ($41,2 \pm 2,1$ ПЕ, $37,9 \pm 1,8$ ПЕ и $37,08 \pm 1,7$ ПЕ соответственно). Сравнение данных вейвлет-анализа показало, что миогенный, нейрогенный тонусы и показатель шунтирования были сходны по своим параметрам во всех исследуемых точках желудка, что позволяет говорить о равномерности и сбалансированности регуляции микросудистого русла желудка.

В других исследуемых нами органах и тканях искомый показатель был ниже по сравнению с желудком: в большом сальнике — $26,73 \pm 1,3$ ПЕ, в париетальной брюшине — $23,42 \pm 1,8$ ПЕ. В стенке тонкой кишки интенсивность микроциркуляции составила $34,51 \pm 1,6$ ПЕ, в ее брыжейке существенно меньше — $22,71 \pm 1,1$ ПЕ. В мышцах передней брюшной стенки интенсивность микроциркуляции со-

ставляла $31,35 \pm 1,4$ ПЕ, а в коже передней брюшной стенки констатировано наименьшее ее значение по сравнению со всеми вышеназванными исследуемыми органами и тканями — $19,85 \pm 0,8$ ПЕ.

Сравнительная оценка полученных нами результатов с данными литературы по микроциркуляции в органах и тканях морской свинки [14] (рис. 2) показали идентичность выявленной нами тенденции, касающейся тела желудка, где отмечен наибольший показатель микроциркуляции, а также искомых показателей в фундальном, пилорическом отделах желудка и большом сальнике — соответственно по убывающей. Проведенный сравнительный анализ продемонстрировал более интенсивный уровень микроциркуляции во всех исследуемых нами органах и тканях у кроликов по сравнению с аналогичными показателями у морских свинок. Поэтому мы считаем предпочтительным для создания экспериментальной модели аутопластической операции использовать кролика, ввиду большей интенсивности микроциркуля-

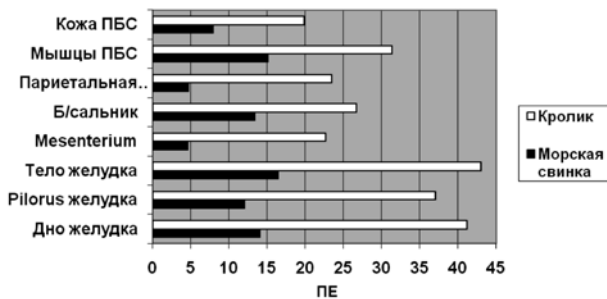


Рис. 2. Сравнительная оценка микроциркуляции органов и тканей области живота (М) кролика (наши данные) и морской свинки [14].

ции в органах брюшной полости по сравнению с морской свинкой.

С точки зрения интенсивности микроциркуляции, стенка желудка в области его тела и большой кривизны является наиболее оптимальной для применения в пластических целях. Всё это дает возможность рекомендовать стенку желудка в клиническую хирургическую практику для аутопластики различных органов человека.

Выводы

1. Интенсивность микроциркуляции в стенке желудка имеет наибольшие значения по сравнению с другими исследованными органами брюшной полости и тканями передней брюшной стенки.

2. Наиболее оптимальной в пластических целях, с точки зрения интенсивности микроциркуляции, является стенка желудка в области его тела и большой кривизны.

3. У кролика выявлена бóльшая интенсивность микроциркуляции исследованных органов по сравнению с подобными её показателями морских свинок, поэтому предпочтительно использовать при создании экспериментальной модели аутопластической операции именно кроликов в качестве экспериментальных животных.

Список литературы

1. **Беляков А.П.** Сравнительная оценка эффективности некоторых методов периферической реваскуляризации почки. Автореф. дис. ...канд. мед. наук. Иваново. ИГМИ. 1975. 24 с.
2. **Вальтер В.Г., Пролиско С.В.** Использование серозно-мышечного лоскута желудка для реваскуляризации почки // Вестн. хир. им. И.И. Грекова. 1969. Т. 102. № 4. С. 34–37.
3. **Владимирова Е.С., Абакумов М.М., Дубров Э.Я., Черная Н.Р., Вильк А.П., Бармина Т.Г.** Диагностика и лечение повреждений у пострадавших с сочетанной травмой. Анн. хир. гепатол. 2008. Т. 13. № 2. С. 27–35.
4. **Жегулёвцева А.П.** Оценка операции двухсегментарной энтерореваскуляризации почки в эксперименте. Дисс. ...канд. мед. наук. М. П МОЛГМИ. 1971. 181 с.
5. **Затолокина А.Д.** Морфологические изменения в печени после различных видов резекций и пластики ее раневой поверхности биологическими и синтетическими материалами. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М.: П МОЛГМИ. 1980. 20 с.
6. **Зурнаджянц В.А.** Использование сегмента большой кривизны желудка в пластической хирургии // Вестн.

- хир. им. Грекова. 1987. Т. 138. № 6. С. 94–96.
7. **Козлов В.И., Корси Л.В., Соколов В.Г.** Лазерная доплеровская флуометрия и анализ коллективных процессов в системе микроциркуляции // Физиология человека. 1998. Т. 24. № 6. С. 112–121.
 8. **Куликов Л.К., Филиппов А.Г.** Хирургическая тактика при непаразитарных кистах селезенки // Хирургия. 1995. № 2. С. 62–63.
 9. Лазерная доплеровская флуометрия и микроциркуляция крови / Под ред. А.И. Крупаткина, В.В. Сидорова: Руководство для врачей. М.: ОАО «Издательство «Медицина». 2005. 256 с.
 10. **Маховская В.В.** Пластика раневой и резецированной поверхности почки мышечным лоскутом на сосудистой ножке. Дис. ...канд. мед. наук. Ставрополь. СтГМА. 1997. 125 с.
 11. **Маховский В.В., Николаев А.В., Ступников П.И., Маховский В.З.** Морфологическая характеристика зоны пластики резекционной поверхности селезенки мышечным лоскутом на сосудистой ножке // В кн.: Анатомо-физиологические аспекты современных хирургических технологий / М-лы Всеросс. Научн. Конф., посв. 100-летию со дня рожд. проф. А.Н. Максименкова. СПб. ВМА. 2006. С. 127–128.
 12. **Мирошников В.М., Асфандияров Ф.Р., Абдулхакимов Э.Р., Бредихин М.В., Круглов В.А., Шафиева Д.Г.** Лазерная доплеровская флуометрия в урологии. Астрахань. АГМА. 2009. 325 с.
 13. **Мусатов О.В., Журнаджан С.А., Богатырёва О.Е.** Пролиферация гистиоцитов при экспериментальных ранах печени, селезенки или почки после пластики фрагментом желудка // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. 2010. № 5. С. 43–47.
 14. **Назарочкин Ю.В., Чернухин Д.А.** Применение лазерной доплеровской флуометрии для оценки кровообращения свободных трансплантатов в абдоминальной хирургии // В кн.: Актуальные вопросы современной хирургии / М-лы Всеросс. конф. Астрахань. АГМА. 2006. С. 137–138.
 15. **Попов В.А.** Гемостаз и герметизация швов (операции на внутренних органах). М.- ГЭОТАР-Медиа. 2008. 320 с.
 16. **Рагимов Г.С.** Органосохраняющие операции при повреждениях и очаговых поражениях селезенки // В кн.: Анатомо-физиологические аспекты современных хирургических технологий / М-лы Всеросс. Научн. Конф., посв. 100-летию со дня рожд. проф. А.Н. Максименкова. СПб. ВМА. 2006. 148 с.
 17. **Сигал З.М., Бабушкин Ф.Г.** Новая фундаментальная медицинская технология при операциях на органах желудочно-кишечного тракта // Актуальные вопросы прикладной анатомии и хирургии / В кн: М-лы XV Всеросс. Конф. с междунар. участием. СПб. СПбГМУ. 2007. С.120–123.
 18. **Таланян К.А.** Сравнительная оценка некоторых способов остановки кровотечения при повреждениях селезенки: автореф. дис. ...канд. мед. наук. Астрахань. А-МА. 2004. 23 с.
 19. **Цыбырнэ К.А., Липован В.Г., Барган М.А.** Сравнительная оценка некоторых методов гемостаза при операциях на печени и селезенке // Хирургия. 1987. № 7. С. 45–49.
 20. Большойсальник: Пер. сангл./под ред. **Liebermann-Meffert D., White H.M.** Медицина. 1989. 336 с.

21. *Eberle B.M., Schnüriger B., Inaba K., Cestero R., Kobayashi L., Barmparas G., Oliver M., Demetriades D.* Thromboembolic prophylaxis with low-molecular-weight heparin in patients with blunt solid abdominal organ injuries undergoing nonoperative management: current practice and outcomes // *J.Trauma*. 2011. Vol. 70. № 1. P. 141–146.
22. *Hashemzadeh, S.H., Hashemzadeh K.H., Dehdilani M., Rezaei S.* Non-operative management of blunt trauma in abdominal solid organ injuries: a prospective study to evaluate the success rate and predictive factors of failure // *Minerva Chir.* 2010. Vol. 65. № 3. P. 267–274.
23. *Katz V.J., Cockett C.A., Moore R.C.* Chronic effects of revascularising the ischemic hypertensive kidney utilizing a segment of ileum // *Invest. Urol.* 1965. Vol. 2. № 6. P. 512–522.
24. *Zachariou Z.* Amniotic membranes as prosthetic material: experimental utilization data of a rat model // *J. Pediatr. Surg.* 1997. Vol. 32. № 10. P. 1458–1463.

Estimation of tissue microcirculation of the front abdominal wall and the some abdominal organs as potential autotransplants in abdominal surgery

O.V. Musatov, S.A. Zurnadjan, M.N. Trizno

Experiments are executed on 10 chinchilla rabbits. The method laser Doppler's fluometry certain parameters of microcirculation of a skin, muscles of a front abdominal wall, parietal peritoneum, the greater omentum, mesentery a thin gut and its wall, a stomach — in the region of a fundus, a body, the greater curvature and the pylorus. The received values of intensity of a blood-groove were analyzed by a peak-frequency spectrum and the wavelet-analysis. It is established, that intensity of microcirculation in a wall of a stomach had the greatest values in comparison with other investigated bodies and fabrics. Thus, the optimal from the point of view of intensity of microcirculation were the body and greater curvature of a stomach.

Key words: microcirculation, stomach, omentum.

Эффективность коррекции клинических и морфологических признаков сахарного диабета 2 типа при трансплантации клеток костного мозга в зависимости от стадии заболевания

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

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

* — *Научный центр Трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова, Минздравсоцразвития РФ, Москва*

Контактная информация: к.б.н. Степанова Ольга Ивановна scbmt@yandex.ru

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

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

Сахарный диабет (СД) остается одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, приводящих к глубокой инвалидизации и гибели людей трудоспособного возраста во всем мире. Эксперты прогнозируют дальнейший рост этой патологии, особенно СД 2 типа, что заставляет искать новые, более эффективные способы терапии. В связи с развитием клеточных технологий и отсутствием работ по применению их при данном заболевании, было решено в эксперименте изучить различные режимы применения клеток костного мозга на модели СД 2 типа. Отсутствие в России такой экспериментальной модели и, соответственно, данных об изменениях кли-

нических проявлений СД 2 типа под влиянием аллогенных или изогенных клеток костного мозга и определило актуальность данного исследования.

Целью настоящего исследования явилось изучение целесообразности использования мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ в качестве модели при проведении экспериментальных работ по коррекции СД 2 типа методом трансплантации клеток костного мозга.

Материалы и методы

Для достижения намеченной цели работа проводилась по трем основным направлениям: по пути изучения динамики патофизиологических изменений состоя-

ния животных в генетической модели СД 2 типа, по пути освоения техники применения клеточных технологий и по пути исследования возможностей коррекции СД 2 типа с помощью аллогенных и изогенных клеток костного мозга (ККМ).

Патофизиологические изменения в организме при СД 2 типа изучали на мутантных мышцах C57BL/KsJYLepr^{db/+} (B/Ks-Lepr^{db/+}), которые несут рецессивный ген leptin receptor-Lepr^{db} — (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). Ген db в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сходный с diabetes mellitus, с дегрануляцией β-клеток в островках поджелудочной железы (ПЖ), но без дефицита инсулина. Мыши-диабетики B/Ks-Lepr^{db/Lepr^{db}} (db/db) обоих полов бесплодны [1, 4, 8]. Для контроля динамики развития СД 2 типа использовали группу здоровых мышей — фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/+).

Для коррекции клинических и морфологических признаков СД 2 типа использовали модель гомозиготных мутантных мышей линии db/db. Контрольную группу составили мыши с СД 2 типа без введения ККМ.

В опытных группах на фоне развития СД вводили ККМ мышам в возрасте 1 мес., т. е. на первой стадии СД, и в возрасте 3–4 мес., т. е. на второй стадии развития СД.

В опытных группах для коррекции клинических и морфологических нарушений в организме использовали аллогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) КМ от здоровых доноров мышей линии B10.GFP или изогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) КМ от фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии db/+.

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных 30–40 мин). Исследовали жизнеспособность гемопоэтических клеткок костного мозга (ГПККМ) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (фибробластоподобные клетки) (ММСК КМ) по их окраске трипановым синим, а также исследовали пролиферативную активность в культуре ММСК КМ по скорости образования монослоя.

Введение ККМ проводили внутрибрюшинно, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, сроки наблюдения составили 2 и 4 мес.

При введении ККМ на второй стадии заболевания (3–4 мес.), когда имели место выраженные клинические признаки, было выполнено 6 опытных серий, из них 3 серии с трансплантацией аллогенных ККМ от здоровых доноров мышей B10.GFP:

серия 1.1 — мышам db/db в возрасте 3 мес. вводили однократно гемопоэтические ККМ (ГПККМ) в количестве 4,5–5 млн; клетки были культивированы 4 суток;

серия 1.2 — мышам db/db в возрасте 3 мес. вводили однократно некультивированные ККМ в количестве 4,5–5 млн;

серия 1.3 — мышам db/db в возрасте 3,5–4 мес. производили 7-кратное введение ККМ — сначала ГПККМ (моноклеарная фракция), культивированных в течение 5 суток, и затем ММСК КМ, культивированных в течение 14 суток.

Реципиентам моноклеарную фракцию ККМ вводили по 4,5–5 млн 4-х-кратно (18–20 млн) с интервалом в 7 дней; ММСК КМ вводили по 2–2,5 млн 3-х-кратно (6–7,5 млн) с интервалом в 14 дней, от пер-

вого введения мононуклеарной фракции.

Также было проведено 3 серии с трансплантацией изогенных ККМ от фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии db/+:

серия 2.1 — мышам db/db в возрасте 3 мес. производили трехкратное введение ГПККМ по 8–13 млн (всего 24–39 млн клеток) с интервалом в 3–4 дня; клетки были предварительно культивированы 4 суток;

серия 2.2 — мышам db/db в возрасте 3 мес. производили трехкратное введение ММСК КМ, которые были культивированы в течение 14 суток и вводились с интервалом в 7–14 дней по 8–10 млн (24–30 млн) клеток;

серия 2.3 — мышам db/db в возрасте 3 мес. производили однократное введение ГПККМ в количестве 100 млн, клетки были культивированы в течение 5 суток.

Создаваемые серии опытов различались между собой фенотипом клеток,

дозами и способами подготовки их к введению.

При введении ККМ на первой стадии заболевания (1 мес.), характеризующейся начальными признаками СД, в опытной группе было выполнено 2 опытных серии, где нами были использованы наиболее эффективные схемы введения ККМ:

серия 1 — это 7-кратное введение смеси аллогенных гемопоэтических и стромальных ККМ в суммарной дозе 24–27,5 млн клеток;

серия 2 — однократное введение изогенных гемопоэтических в дозе 100 млн клеток.

У мышей-реципиентов в динамике определяли в крови содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c), измеряли массу тела и массу внутренних органов; определяли объем выпитой воды и съеденного корма.

Проводили в динамике гистологиче-

Таблица 1

Значения показателей уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина у мышей с СД 2 типа после введения алло- и изогенных ККМ (в возрасте 5 мес. после рождения)

Серии опытов	Глюкоза, ммоль/л	HbA1c, %
Серия 1.1 (n=25)	17,5±5,42*	6,9±0,48*
Серия 1.2 (n=25)	22,1±3,57*	7,7±0,56*
Серия 1.3 (n=25)	17,2±4,18*	6,7±0,81*
Серия 2.1 (n=30)	19,3±2,49*	7,2±0,67*
Серия 2.2 (n=30)	19,4±4,18*	7,3±0,61*
Серия 2.3 (n=30)	17,1±5,52*	6,6±0,46*
Серия 1 (n=30)	6,9±2,82*	4,4±0,55*
Серия 2 (n=30)	6,7±2,18*	4,4±0,57*
Контроль с СД 2 типа без ККМ (n=25)	26,3±3,61	8,7±0,80
Группа без СД (норма) (n=30)	5,7±0,65	3,9±0,57

где * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем СД 2 типа без терапии ККМ

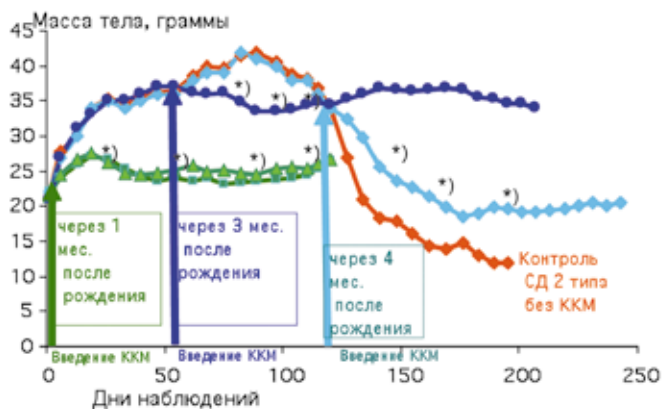


Рис. 1. Динамика изменения массы тела у мышей с СД 2 типа после клеточной терапии на разных стадиях болезни.

* — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой СД 2 типа без терапии ККМ.

ские исследования поджелудочной железы, печени, почек и селезенки.

Результаты и их обсуждение

После трансплантации ККМ при СД 2 типа на стадии ранних (1 мес. после рождения) и выраженных (3–4 мес. после рождения) патогенетических нарушений в организме выявлено, что при введении ККМ на стадии выраженных клинических проявлений СД 2 типа (3–4 мес.) во всех сериях опытов к 5-ому мес. имеет место снижение глюкозы и HbA1c по сравнению с контролем (табл. 1). Более выраженное снижение было получено в серии 1.3 — при 7-кратном введении аллогенных ККМ разных фракций (ГПКМ и ММСК КМ) и в серии 2.3 с однократным введением максимальной дозы 100 млн изогенных ГПКМ.

В сериях 2.1 и 2.2 (где были введены разные фракции изогенных ККМ почти в одинаковых дозах) были получены равноценные результаты, что также было подтверждено нами гистологически; менее выраженное снижение показателей углеводного обмена получено в серии 1.2, где

были введены некультивированные аллогенные ККМ.

Однако при введении алло- и изогенных ККМ на раннем этапе развития СД 2 типа (через 1 мес.) в исследуемых сериях 1-2 к 5-ому мес. мы наблюдали нормальные значения показателей уровней глюкозы и HbA1c, т.е. мы показали, что заблаговременное введение ККМ предотвращало развитие основных клинических проявлений СД; к 5-му мес. уровень глюкозы и HbA1c был достоверно ниже не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с опытами, где клеточную терапию проводили на стадии развернутой клинической картины СД (по сравнению с 1.1-2.3).

Из рис. 1 видно, что при введении ККМ на стадии выраженных клинических проявлений (т.е. на 3-й мес.) отмечается лишь стабилизация массы тела и предотвращение её снижения на этапе декомпенсации метаболизма и развития терминальных нарушений в организме, которые возникают в контроле.

- При введении ККМ через 4 мес. предотвратить снижение массы тела не

Показатели объема выпитой воды и съеденного корма в течение 30 дней после проведения клеточной терапии у мышей на разных стадиях развития СД 2 типа

Серии опытов	Объем выпитой воды, мл	Объем съеденного корма, г
Серия 1.1 (n=25)	13,7±1,41*	5,9±0,24*
Серия 1.2 (n=25)	17,6±1,75*	6,7±0,15*
Серия 1.3 (n=25)	9,44±0,92	4,97±0,34*
Серия 2.1 (n=30)	12,5±0,69*	5,54±0,23*
Серия 2.2 (n=30)	12,4±0,92*	5,62±0,32*
Серия 2.3 (n=30)	8,0±1,51*	4,48±0,34*
Серия 1 (n=30)	5,04±0,37*	3,96±0,42*
Серия 2 (n=30)	5,11±0,61	4,02±0,83*
Контроль с СД 2 типа без ККМ (n=25)	25,7±1,18	8,9±0,29
Группа без СД (норма) (n=30)	4,69±0,35	3,74±0,096

где * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой СД 2 типа без терапии ККМ.

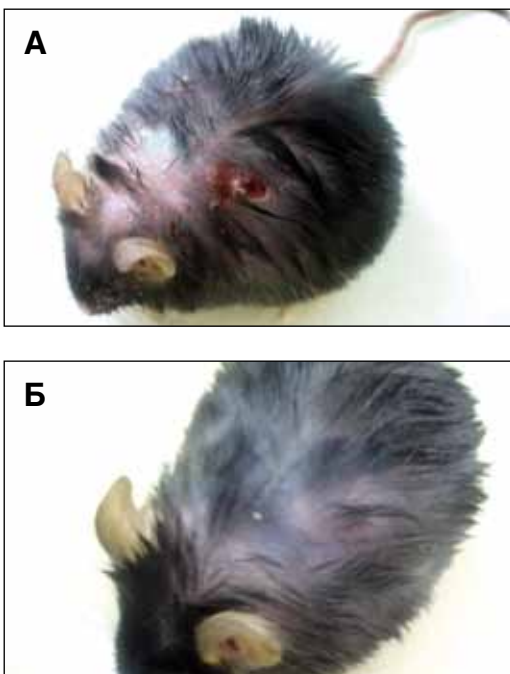


Рис. 2. Состояние кожных покровов у мышей с СД 2 типа до и после проведения аллогенной клеточной терапии (через 120 дней после рождения).

А — Мацерация кожи до введения ККМ.

Б — Заживление кожных ран через 21 день после введения ККМ (серия опыта 1.3).

удавалось, хотя степень снижения её была менее выраженной (масса тела стабилизировалась к 56-ому дню и достоверно удерживалась практически так же до конца эксперимента).

- При раннем введении (через 1 мес.) масса животных в течение 120 дней наблюдений достоверно не отличалась от нормы.

Показатели объема выпитой воды и съеденного корма у мышей с СД 2 типа (табл. 2) менялись в соответствии с другими клиническими показателями. Было отмечено снижение полидипсии и полифагии после алло- и изогенной клеточной терапии во всех сериях, особенно в сериях при введении ККМ на ранних сроках развития болезни (сериях 1 и 2); хорошие результаты были получены на поздних сроках введения ККМ в сериях 1.3 и 2.3, где нами вводились клетки многократно (7 раз) и в максимально высокой дозе. Отмечен регресс трофических изменений кожных покровов: например,

Сроки жизни животных с СД 2 типа после алло и изогенной трансплантации ККМ на разных стадиях развития СД 2 типа

Серии опытов	Кол-во животных на дожитие	Срок жизни, дни	
		Длительность жизни	Средний срок
Серия 1.1.	5	324, 330, 337, 345, 349	337±10,3*
Серия 1.3.	5	412, 417, 424, 432, 435	424±9,7*
Серия 2.3.	5	431, 442, 447, 456, 459	447±11,3*
Серия 1.	5	486, 505, 508, 513, 520	506±12,7*
Серия 2.	5	514, 526, 539, 548, 557	537±17,1*
Контроль с СД 2 типа без ККМ	5	138, 159, 167, 185, 199	169±23,2

где * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной серией СД 2 типа без ККМ.

при введении аллогенных ККМ на поздних сроках в серии 1.3 на рис. 2 показана мацерация кожи до введения, после введения мацерация полностью исчезла. При введении ККМ на ранних сроках мацерация кожных покровов не возникала в течение всего срока наблюдений (120 дней).

При раннем применении ККМ мы наблюдали в течение всего исследуемого срока (120 дней) не только сохранение нормальных показателей клинического состояния животных, но и достоверно более длительные сроки жизни таких животных (табл. 3), не только по сравнению с контролем, но и с животными, получавшими ККМ на поздних сроках жизни (болезни).

При морфологических исследованиях оказалось, что у животных, получивших ККМ на ранней стадии развития СД, в ПЖ через 5 мес. сохраняется большая площадь ОЛ, большее количество клеток в ОЛ и более выраженная базофильность

этих клеток (табл. 4 и рис. 3), свидетельствующие об их более высокой функциональной активности, чем в контроле (СД 2 типа без ККМ).

С целью подтверждения присутствия нейроэндокринных (α и β) клеток в составе ОЛ во всех сериях опытов нами проводился иммуногистохимический анализ ОЛ с маркером специфических нейроэндокринных гранул — хромогранином-А, который экспрессируется в цитоплазме клеток эндокринной части ПЖ при их восстановительной регенерации.

Наши результаты показали, что положительное цитоплазматическое окрашивание было выявлено в значительном количестве клеток в островках при позднем, но особенно при раннем введении алло- и изогенных ККМ, и эти данные мы представили на рис. 4А. В контроле с СД 2 типа без введения ККМ положительное цитоплазматическое окрашивание было выявлено только в клетках периферических отделов островков, в

Морфометрическое исследование островковой ткани ПЖ у мышей db/db в разных опытных сериях в возрасте 5 мес. после рождения

Серия опытов	Площадь ОЛ ПЖ в усл.ед.	Количество клеток в ОЛ
1.1 (n=16)	37858,73±1021*	131±21*
1.2 (n=17)	31565,25±1025*	112±17
1.3 (n=13)	96555,2±6578*	258±103*
2.1 (n=13)	44284,01±1756*	142±23*
2.2 (n=13)	41327,5±1437*	135±22*
2.3 (n=13)	63696,1±1922*	199±45*
1.1 (n=13)	102143,1±2712*	313±69*
1.2 (n=17)	92299,5±2103*	306±84*
Контроль СД 2 типа без ККМ (n=25)	11318,8±783	81±27
Группа без СД (норма) (n=20)	58954,7±1134	226±40

где * — $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей контроля (СД 2 типа без ККМ).

зонах нахождения α -клеток, тогда как в центральных участках — местах расположения β -клеток — клетки были хромогранин-А-негативными (рис. 4Б). Данные результаты свидетельствовали об отсутствии признаков восстановительной регенерации островковых клеток в контроле. Примечательно, что

метод окрашивания хромоганином-А позволил выявить не выявляемые гистологически рассеянные мелкие скопления положительно окрашенных клеток — от 3 до 6 клеток (рис. 4В, Г) в ткани ПЖ (возможно, новообразующиеся островки?). Часть этих клеток располагалась вблизи протоков ПЖ, что соответству-

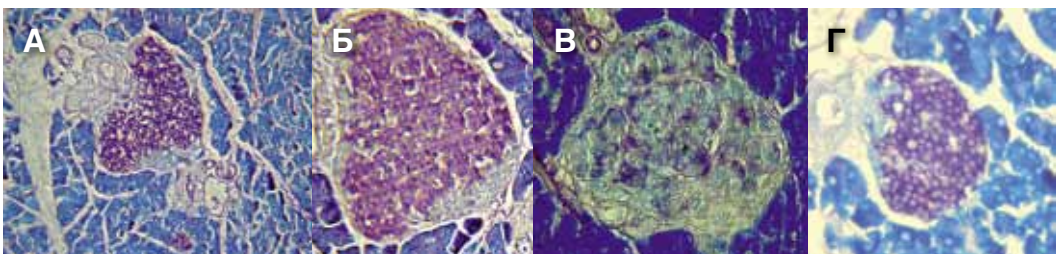


Рис. 3. Островковая ткань поджелудочной железы мышей db/db с СД 2 типа через 120 дней после раннего введения ККМ (через 30-35 суток после рождения). Окраска альдегид-фуксином по Гомори.

А, Б — Базофильные β -клетки в ОЛ при СД после введения ККМ;

А — Увел. x 100;

Б — Увел. x 400; по результатам гистохимического окрашивания количество активно функционирующих β -клеток в ОЛ при сравнении с нормой (Г) было практически одинаковым (визуальная оценка);

В — Уменьшение числа базофильных β -клеток в ОЛ в контроле — СД без ККМ, Увел. x 400;

Г — Базофильные β -клетки в ОЛ ПЖ здоровых мышей db/+ (норма), Увел. x 400.

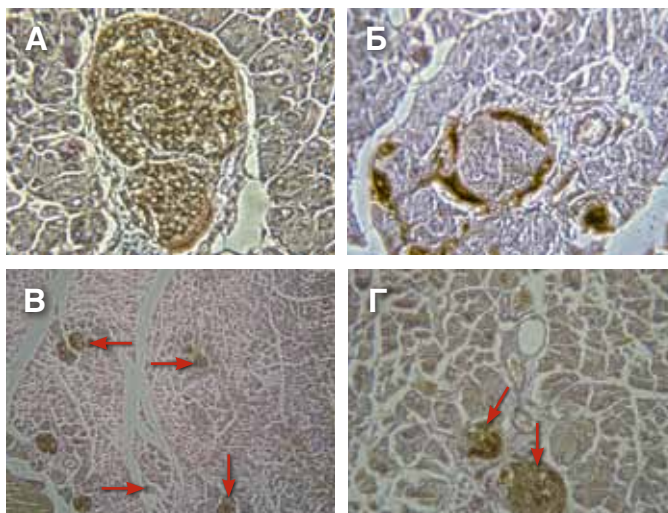


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы с хромогранин-А маркером нейроэндокринных гранул в ОЛ (парафиновые срезы).

А — Хромогранин-А в цитоплазме клеток ОЛ на 120 сутки после введения ККМ (опытная серия IV.1), Увел. X 200;

Б — Хромогранин-А в цитоплазме отдельных клеток периферических участков ОЛ после введения «мертвых» ККМ (дополнительный контроль), Увел. x 200;

В — Хромогранин-А в мелких скоплениях клеток вблизи протоков в ПЖ (указано стрелками) на 120 сутки после введения ККМ (опытная серия 1.3), Увел. x 200;

Г — Хромогранин-А в мелких скоплениях клеток вблизи протоков в ПЖ (указано стрелками) на 120 сутки после введения ККМ (опытная серия 2.3.), Увел. x 400.

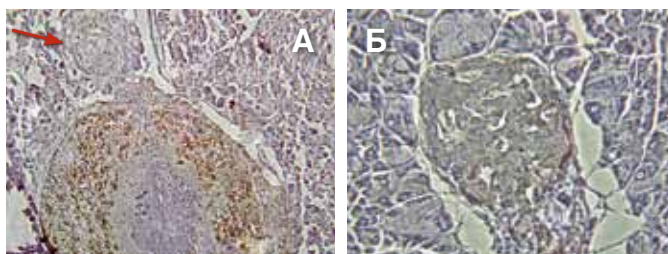


Рис. 5. Иммуногистохимическое выявление через 120 дней после введения ККМ репликации ДНК в ядрах клеток ОЛ ПЖ антителами к Ki-67 (парафиновые срезы).

А — Ki-67-позитивные клетки ОЛ (указано стрелками) после проведения клеточной терапии в опытной серии III.2.3 (свидетельство пролиферативной активности в ОЛ) на фоне высокой пролиферативной активности клеток лимфатического узла (внутренний контроль), Увел. x 200;

Б — Ki-67-негативные клетки ОЛ после введения «мертвых» ККМ контроль, Увел. x 400.

ет представлениям о новообразовании островковых клеток из стволовых клеток, располагающихся вблизи протоков. Эти наблюдения свидетельствуют о стимуляции дифференцировки дуктального эпителия в островковые клетки.

С целью изучения пролиферативной активности клеток островковой части ПЖ после введения ККМ (стволовых и прогениторных клеток) нами было выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием маркера репликации ДНК — антитела Ki-67 (маркер пролиферативной активности). По результатам наших исследований установлено, что Ki-67-положительно окрашенные клетки составляют приблизительно от 5 до 15% всех клеток островка — как при позднем, так при раннем

сроке введения ККМ. На рис. 5 — положительное окрашивание ядер отдельных клеток ОЛ на фоне высокой пролиферативной активности лимфатического узла. В группах контроля СД без ККМ пролиферативная активность клеток отсутствовала.

Позитивная динамика была отмечена в состоянии других органов. В печени — более выраженное накопление гликогена, лучшая сохранность балочной структуры, а также отсутствие признаков жировой дистрофии (рис. 6), которые наблюдались в контроле к 120-му дню наблюдения, мы также отмечали отсутствие жировой дистрофии гепатоцитов и накопление в них гликогена.

В почках после применения ККМ признаки выраженных дистрофических

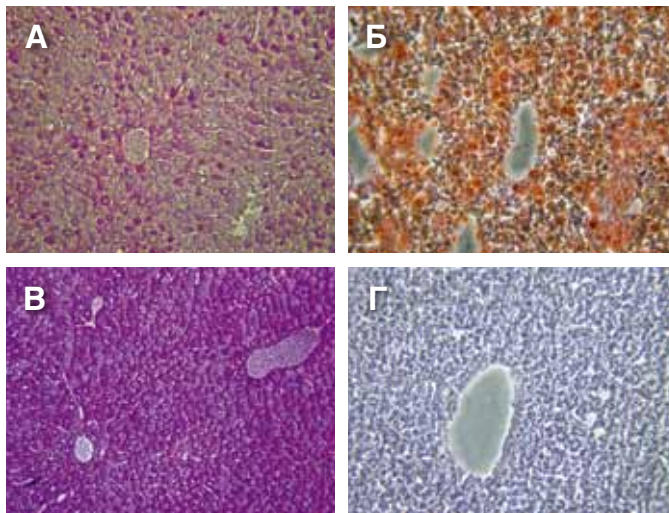


Рис. 6. Ткань печени мышей с СД 2 типа через 120 дней после раннего введения ККМ (через 30-35 суток после рождения).

А — Резкое снижение накопления гликогена в гепатоцитах печени у контрольных мышей db/db через 5 мес. после рождения, окраска PAS — реакцией; Увел. x 400;

Б — Мелко-крупнокапельная жировая дистрофия ткани печени у контрольных мышей db/db через 5 мес. после рождения, окраска Суданом III; Увел. x 400;

В — Полное накопление гликогена в гепатоцитах печени после ранней клеточной терапии, окраска PAS — реакцией; Увел. x 100 (5 мес. после рождения);

Г — Отсутствие жировой дистрофии в ткани печени после ранней клеточной терапии, окраска Суданом III; Увел. x 400 (5 мес. после рождения).

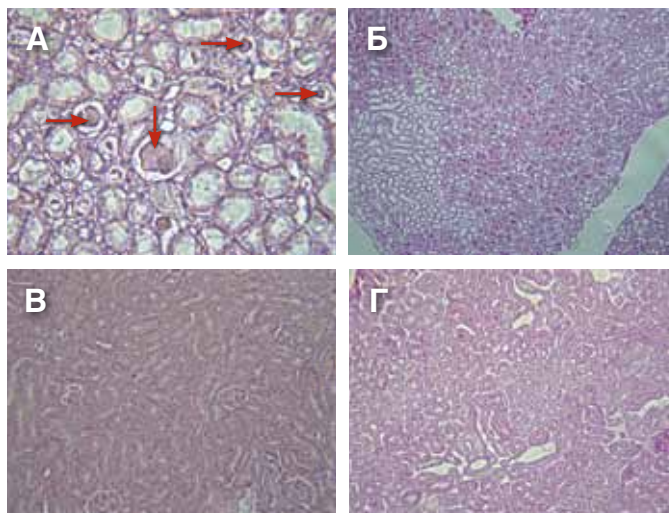


Рис. 7. Ткань почки мышей db/db с СД 2 типа через 120 дней после раннего введения ККМ (на 30–35 сутки после рождения).

А — Эозинофильные массы (указаны стрелками) в просвете извитых канальцев и собирательных трубочек у мыши с СД 2 типа без введения ККМ (контроль); окраска гематоксилин-эозином, Увел. х 400 (5 мес. после рождения);

Б — Отсутствие эозинофильных масс в просвете извитых канальцев и собирательных трубочек в почке у мыши с СД 2 типа после введения ККМ; окраска гематоксилин-эозином, Увел. х 400 (5 мес. после рождения);

В — PAS-положительные массы в просвете канальцев у мыши с СД 2 типа без введения ККМ (контроль), Увел. х 200 (5 мес. после рождения);

Г — Отсутствие PAS-положительных масс вблизи апикальных поверхностей эпителия канальцев в почках при СД 2 типа после клеточной терапии, Увел. х 200 (5 мес. после рождения).

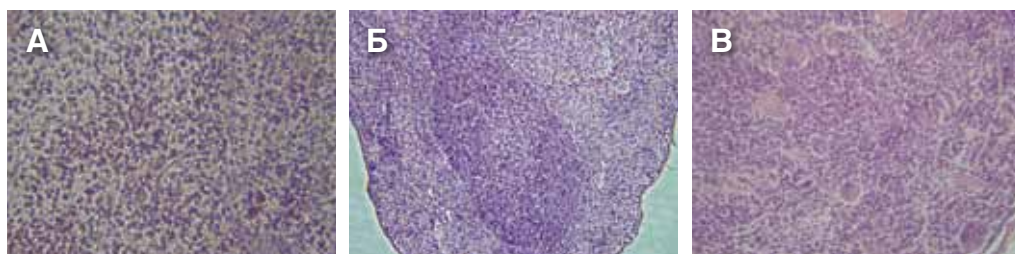


Рис. 8. Ткань селезенки мышей с СД 2 типа без клеточной терапии и через 120 дней после раннего введения ККМ (через 30-35 суток после рождения), окраска гематоксилин-эозином.

А — СД 2 типа без применения ККМ (контроль). Рисунок ткани селезенки стерт, признаки гипоплазии (5 мес. после рождения), Увел. х 200;

Б — Серия 1. СД 2 типа с введением ККМ. Сохранение четкой структуры лимфоидных фолликулов, Увел. х 400;

В — Серия 1. Выраженный мегакариоцитоз (указаны стрелками мегакариоциты) в ткани селезенки после введения ККМ; Увел. х 400.

изменений канальцев, а также скопление в их просвете эозинофильных белковых и PAS-положительных масс отсутствовали (рис. 7), тогда как в контроле они были резко выраженными.

Установленная сохранность структур органов, участвующих в патогенезе СД и его осложнений, свидетельствует, прежде всего, о более высоком регенерационном потенциале тканей этих органов и о более высоком их адаптационном и компенсаторном резерве. Т. к. ведущая роль в процессах адаптации и регенерации принадлежит иммунной системе, мы исследовали морфологическое состояние органов иммуногенеза.

Мы установили, что под действием ККМ в ткани селезенки формируются крупные лимфоидные фолликулы, наблюдается интенсивная бластотрансформация лимфоидных клеток (рис. 8), что свидетельствует о восстановлении структуры селезенки как иммунокомпетентного органа и о восстановлении её иммунорегуляторной активности. Важно подчеркнуть, что нами впервые был установлен факт, что в ткани селезенки под влиянием как изогенных, так и аллогенных ККМ возникают нетипичные для этого органа признаки активизации кроветворения (мегакариоцитоз) (рис. 8 В). Тогда как в контроле рисунок ткани стерт и имеются все признаки гипоплазии этого органа.

Для выявления связи возникновения позитивных клинических, биохимических и морфологических изменений в организме мышей с СД 2 типа при введении ККМ с их жизнеспособностью в течение длительного срока (120 дней) нами были проведены исследования по выявлению распределенных по органам жизнеспособных аллогенных донорских клеток от мышей В10.GFP. Мы установили, что

донорские ККМ в криопрепаратах из разных органов (рис. 9) — по крайней мере, в течение 120 дней — не погибают, а сохраняют свою жизнеспособность. Сохраняющаяся люминесценция криосрезов разных органов позволила нам по святяющемуся зеленому белку ККМ выявить донорские клетки в органах и связать возникающие в них изменения (морфологические и функциональные) со стимуляцией в этих органах процессов адаптации и компенсации функции паренхимы клеток.

Гистологическим методом мы выявили у реципиентов во внутренних органах присутствие донорского гена зеленого белка на 60-е и 120-е сутки после введения, также нами было подтверждено (пробы из печени) с помощью более точного (проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР)) метода присутствие донорских клеток у реципиентов в те же сроки (рис. 10) [11].

Ставя перед собой цель изучить целесообразность применения алло- и изогенных ККМ для коррекции метаболических и морфологических нарушений при СД 2 типа как более распространенной и более социально значимой патологии, нам необходимо было не только оптимизировать дозу используемых клеток, определить эффекты фенотипа ККМ и значения их гистосовместимости, но также провести исследования на модели СД 2 типа у животных. Оказалось, что охарактеризованная экспериментальная модель СД 2 типа отсутствует, и поэтому наши исследования по применению стволовых и прогениторных ККМ мы начали с изучения пригодности генетической модели с нарушением углеводного обмена у животных, используя для этого мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db/+} (B/Ks-Lepr^{db/+}). Оказалось, что мыши с

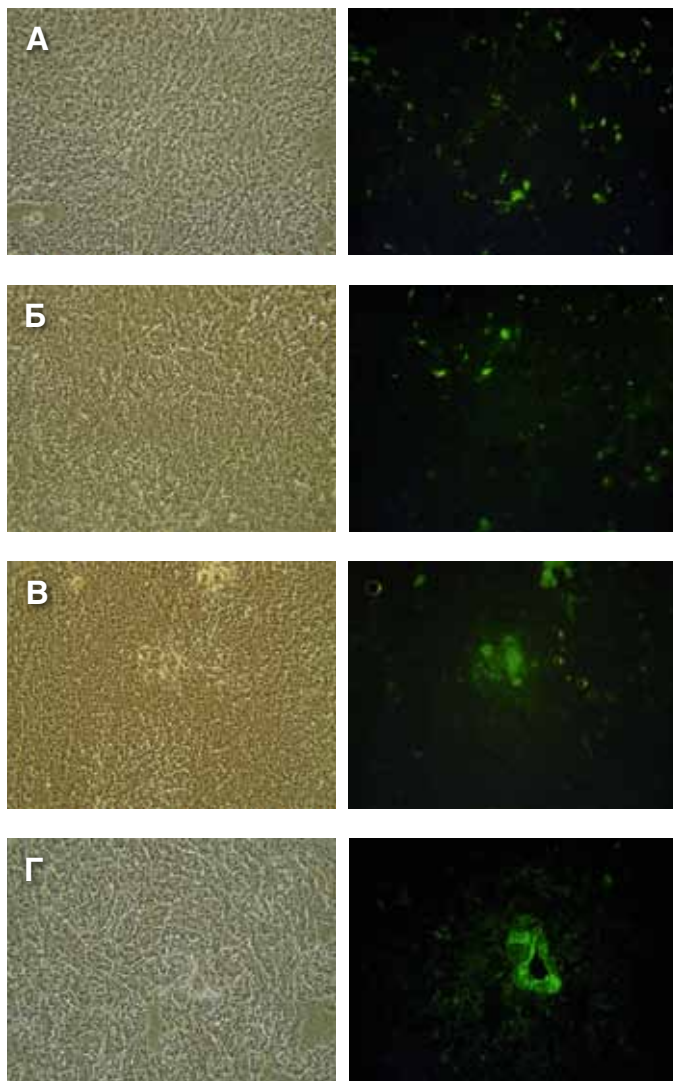


Рис. 9. Распределение донорских ККМ (мыши B10.GFP) в органах через 120 суток после внутрибрюшинного введения реципиентам db/db. Увел. x 200.

А — поджелудочная железа;

Б — печень;

В — селезенка;

Г — флюоресцентное свечение в периваскулярных участках почечной артерии; слева — фазово-контрастная микроскопия; справа — люминесцентная микроскопия.

нарушением углеводного обмена несут рецессивный ген *leptin receptor-Lepr^{db}* — (*db*) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома), где ген *db* в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сходный с *diabetes mellitus*, с дегрануляцией β -клеток в островках ПЖ, но без дефицита инсулина, где мыши-диабетики *db/db* обоих полов бесплодны [2, 5, 9]. Эти мыши были предоставлены нам лабораторией генетики НЦБМТ РАМН. Мутантные мыши линии *V/Ks-Lepr^{db/+}* были подвергнуты динамическому обследованию от рождения до их естественной гибели. У этих мышей проводились исследования содержания в крови глюкозы, HbA1c, массы тела, исследовали пищевой и питьевой режим, а также клинические проявления нарушения углеводного обмена, включая гистологические и гистохимические исследования состояния внутренних органов. Контролем к опытным мышам *db/db* служили здоровые гетерозиготные мыши *db/+* той же линии *V/Ks-Lepr^{db/+}* и мыши линии *C57BL/10* (*B10*). Оказалось, что у исследуемых мышей *db/db* по сравнению с двумя другими контролями наблюдались типичные

изменения углеводного обмена, быстрое нарастание массы тела, изменения со стороны кожных покровов и внутренних органов, характерные для СД 2 типа. Внутренние органы мышей *db/db* характеризовались стадийными изменениями, прежде всего тканей ПЖ. На ранней стадии развития СД 2 типа у мышей *db/db* ко 2-му мес. развивается гиперплазия ОЛ, достоверно увеличивается их площадь и количество базофильных клеток в ОЛ по сравнению с контролями. С увеличением возраста мышей *db/db* (к 4–6 мес.) площадь ОЛ и количество базофильных клеток в ОЛ достоверно снижается по сравнению с контролем, причем это снижение становится более выраженным к 6-ому мес. К 2–4-ому мес., но особенно к 4-ому мес., у мышей *db/db* появляются другие клинические признаки СД 2 типа, такие как развитие ангиопатии и дисфункции иммунной системы. Проявлениями этих нарушений были мацерация кожных покровов в области холки и резкое ожирение, которое к 5–6-ому мес. переходило к стадии кахексии и гибели животных на фоне снижения массы

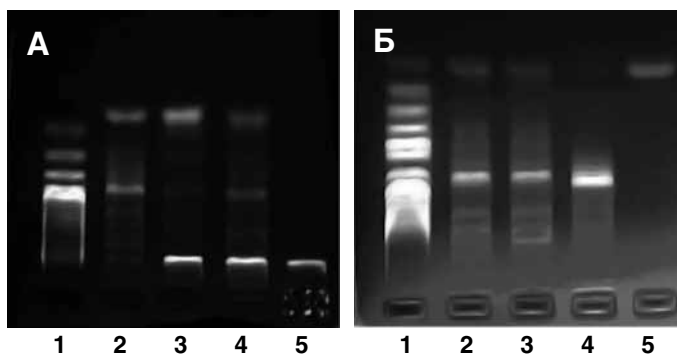


Рис. 10. Электрофоретический спектр продуктов амплификации от мышей реципиентов *db/db* на 60–120 сутки после введения аллогенных ККМ. А — на 60 сутки после введения ККМ: 1 — маркер молекулярной массы, 2 — без гена зеленого белка, 3–5 — наличие гена зеленого белка; Б — на 120 сутки после введения ККМ: 1 — маркер молекулярной массы, 2–4 — наличие гена зеленого белка, 5 — без гена зеленого белка.

селезенки к 6-му мес. Изменения структуры селезенки связаны с уменьшением площади фолликулов белой пульпы. Указанные изменения свидетельствуют о снижении неспецифического иммунитета у мышей db/db при СД 2 типа к 5–6-ому мес. жизни, что подтверждается данными литературы об ингибировании гликолиза в лимфоцитах [6], т. е. основного пути образования энергии в этих клетках. Уменьшение концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата (Ф-2,6-Р2) в лимфоцитах, являющегося мощным регулятором гликолиза в этих клетках, тормозит энергообразование и делает невозможным нормальное функционирование лимфоцитов и иммунной системы в целом при тяжелой (декомпенсированной) форме СД (в нашем эксперименте, это больные мыши 5–6-мес. возраста с явлениями выраженной глюкоземии). Исследование изменений содержания Ф-2,6-Р2 в лимфоцитах периферической крови, тимуса и селезенки у больных СД 2 типа (по данным литературы) [13, 14] показало, что при отсутствии лечения в начальной стадии СД наблюдается повышение уровня Ф-2,6-Р2 почти в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой, у больных с компенсированной в результате лечения пероральными антидиабетическими препаратами формой диабета уровень Ф-2,6-Р2 нормализуется, а у больных с тяжелой (декомпенсированной) формой СД концентрация Ф-2,6-Р2 резко снижается [6]. Таким образом, данные литературы объясняют обнаруженные нами изменения со стороны лимфоидной ткани у мутантных мышей db/db, больных СД 2 типа, развивающиеся к 5–6 мес. жизни.

Гистологически в печени мышей db/db были выявлены признаки жировой дистрофии и снижение содержания глико-

гена. В почках имело место накопление эозинофильных и PAS-положительных субстанций, которое свидетельствовало о глубоких нарушениях углеводного и белкового обменов в организме. Полученные данные позволили прийти к заключению, что мутантные мыши db/db являются адекватной моделью постепенного развития (3 стадии) СД 2 типа в организме [10]. Именно эти мыши оказались пригодными для динамического изучения различных корректирующих воздействий, в том числе стволовыми и прогениторными ККМ, что в наших экспериментах и было целью исследования.

При использовании стволовых и прогениторных ККМ нам было необходимо установить эффективную дозу, фенотип (ГПККМ или ММСК КМ) клеток, который оказывает выраженный корректирующий эффект (с визуализацией), и значение гистосовместимости (алло- или изогенных) клеток донора и реципиента, а также выявить ту стадию СД, которая поддается наиболее выраженной регуляции. Для ответа на эти вопросы нами были выполнены 2 основные группы исследований. В 1-ой группе исследований стволовые и прогениторные ККМ трансплантировали на этапе выраженной клинической картины заболевания, которая имела место через 3–4 мес. после рождения мышей db/db. А во 2-ой группе — стволовые и прогениторные ККМ в больших дозах трансплантировали на этапе ранних сроках развития СД 2 типа (через 1 мес. после рождения), когда имела место лишь гипергликемия в результате инсулинорезистентности.

В 1-й группе исследований были проведены опытные серии аллогенными ККМ с геном зеленого белка (GFP) (1.1, 1.2, 1.3) и серии изогенными ККМ (2.1, 2.2, 2.3).

В серии 1.1 — трансплантировали однократно 4,5–5 млн культивированных гемопоэтических клеток (ГПКМ), в серии 1.2 — такое же количество некультивированных ККМ, а в серии 1.3 — проводили 7-ми-кратное введение сначала ГПКМ, а затем ММСК КМ, общее количество которых составляло 24–27,5 млн.

В опытной серии 2.1 — 3-х-кратно трансплантировали ГПКМ в количестве 24–39 млн, в серии 2.2 — 3-х-кратно трансплантировали ММСК КМ в количестве 24–30 млн, а в серии 2.3 — однократно вводили ГПКМ в количестве 100 млн.

Во 2-й группе экспериментов в первой серии опытов (1) трансплантировали 7-ми-кратно аллогенные ККМ (сначала ГПКМ, а потом — ММСК КМ), общая доза 24–27,5 млн, а во второй серии (2) трансплантировали однократно 100 млн изогенных ГПКМ.

Во всех сериях и группах опытов клетки КМ вводили внутривенно. Клеточную терапию проводили без диет (в свободном доступе животных к брикетированному корму, кашам с растительным маслом, овощам, сухому молоку, хлебным сухарям и воде), что максимально приближало исследования к реальным условиям. ККМ получали либо от аллогенных (B10.GFP), либо от изогенных (db/+) здоровых доноров. Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных 30–40 мин). Исследовали жизнеспособность клеток гемопоэтической и стромальной фракций ККМ по окраске трипановым синим, а также исследовали пролиферативную активность в культуре стромальных ККМ по ско-

рости образования монослоя. При этом нами были получены микрофотографии, доказывающие подлинность культуры ГПКМ, что было подтверждено на точном цитофлуориметре. Подлинность культуры ММСК КМ также подтверждена микрофотографиями, для идентификации фибробластоподобных ММСК КМ был использован иммуногистохимический метод на коллаген I типа.

Важно подчеркнуть, что во всех сериях опытов, кроме серии 1.2, донорские клетки КМ предварительно культивировали для активизации биорегуляторной активности стволовых и прогениторных ККМ. Необходимость применения культивированных изогенных ККМ от здоровых доноров у мышей db/db с СД 2 типа была обусловлена тем, что собственные аутологичные ККМ (стволовые и прогениторные клетки) у больных с хронической патологией, какой является СД, имеют сниженный биорегуляторный потенциал [3].

Наши исследования по трансплантации алло- или изогенных ККМ на этапе выраженной клинической картины СД 2 типа показали, что эффективность этого метода недостаточна для коррекции всех развивающихся нарушений. Нами было установлено, что трансплантация ККМ мышам db/db с СД 2 типа через 3–4 мес. после рождения приводила во всех сериях опытов с применением алло- или изогенных ККМ к снижению уровня глюкозы и HbA_{1c} в крови, к достоверному снижению массы тела или сохранению массы тела на одном уровне в течение 60–70 дней после трансплантации клеток КМ. Однако снижение этих показателей не достигало значения нормы, было нестабильным и непродолжительным. При применении культивированных алло- или изогенных ККМ у животных с СД 2 типа удавалось

снизить признаки полидипсии, полифагии и полиурии, особенно при многократном применении аллогенных клеток в серии 1.3 и при однократном применении изогенных клеток в дозе 100 млн (серия 2.3), отмечался регресс трофических изменений кожных покровов в серии 1.3, в остальных опытных сериях мацерация не возникала, т.к. животные использовались в эксперименте в возрасте 3 мес., и к достижению возраста 120 дней им уже была проведена клеточная терапия. Между тем, длительность жизни животных, получивших терапию ККМ, увеличивалась в 1,7–2,3 раза, и этот факт мы связываем с позитивным изменением морфологического состояния внутренних органов в возрасте 5-ти мес., которое сохранялось на более отдаленных сроках наблюдения (120 дней). В возрасте 5-ти мес. после клеточной терапии у мышей db/db в ПЖ были отмечены явления гипертрофии и гиперплазии ОЛ в ПЖ. Они заключались в достоверном увеличении площади ОЛ и количества в них клеток во всех сериях опытов в 1 группе экспериментов, особенно сильно увеличивалась площадь ОЛ и повышалось количество базофильно окрашенных, активно функционирующих клеток в ОЛ в сериях 1.3 и 2.3, в которых применяли или многократное введение аллогенных ККМ (ГПККМ+ММСК КМ), или однократное введение изогенных ККМ (ГПККМ) в высокой дозе. Отсутствие достоверных различий между остальными сериями опытов позволило нам прийти к заключению, что эффективность применения стволовых и прогениторных ККМ не зависит от фенотипа используемых клеток (ГПККМ или ММСК КМ) и их гистосовместимости (аллогенная или изогенная) с реципиентами, но зависит от дозы и кратности их введения. О пози-

тивном эффекте ККМ, повышающем резистентность тканей к повреждающему действию гипергликемии, свидетельствуют и другие исследования — в частности, иммуногистохимические исследования с хромогранином-А и с антителами к маркеру репликации ДНК Ki-67. При использовании ГПККМ в максимальной дозе (100 млн клеток) эти исследования подтверждают, что ККМ активизируют процессы регенерации и адаптации тех структур, которые участвуют в нормализации углеводного обмена в организме. Показано [7, 12], что стволовые и прогениторные ККМ участвуют в нормализации метаболизма путем ингибирования процессов клеточного апоптоза. Они ингибируют процессы перекисного окисления мембранных структур клеток, способствуют активизации процессов неоангиогенеза и устранению иммунной дезрегуляции, что неизбежно сопровождается восстановлением структур клеток и органов, повышением устойчивости к действию повреждающих факторов и активизации процессов репаративной регенерации. Именно этим, очевидно, объясняется, что при проведении морфологических исследований внутренних органов нами были отмечены позитивные изменения состояния этих органов по сравнению с контролями (СД без ККМ и СД с мертвыми ККМ). При исследовании ткани печени в возрасте 5 мес. после введения ККМ мы констатировали накопление гликогена в гепатоцитах и снижение выраженности жировой дистрофии, причем в большей части наблюдений жировая дистрофия отсутствовала полностью. Морфологические исследования через 120 суток после введения ККМ также подтвердили благоприятное состояние ткани печени этих животных по сравнению с контролем. Аналогичная

позитивная динамика была отмечена в состоянии почек, селезенки и лимфатического узла. Нами было отмечено, что у животных в возрасте 5-ти мес. после введения ККМ имело место во всех опытах с применением алло- или изогенных ККМ достоверное увеличение площади фолликулов селезенки и массы ткани селезенки, причем так же как при морфометрическом исследовании ОЛ ПЖ мы отметили, что наибольшая площадь фолликулов селезенки и наибольшая масса селезенки наблюдались в опытных сериях (1.3 и 2.3). Примечательно, что эти показатели были достоверно выше аналогичных у нормальных животных. Это дает нам право утверждать, что позитивный эффект ККМ связан со стимуляцией органов иммуногенеза и повышением резервов их адаптационных возможностей. Для выявления связи клинических, биохимических и морфологических изменений, наступающих в организме мышей db/db с СД 2 типа после проведения клеточной терапии, с распределением ККМ в организме и их жизнеспособностью нами были проведены исследования с аллогенными донорскими ККМ мышей V10.GFP. Исследование показало, что на 60-е и 120-е сутки после внутрибрюшинного введения введенные клетки достигают разных органов (печень, почки, ПЖ, лимфоидная ткань) и не погибают, а сохраняют свою жизнеспособность.

Недостаточно выраженное влияние ККМ на показатели уровней глюкозы и HbA1c в крови позволило нам предположить, что к моменту применения ККМ (через 3–4 мес. после рождения) регенерация ОЛ оказывается недостаточной для восстановления нарушенного гемостаза и секреторной активности β -клеток. Это заставило нас провести отдельную серию опытов, в которой ККМ вводили не на ста-

дии глубокого повреждения островкового аппарата, а лишь на стадии относительной инсулиновой недостаточности (инсулинорезистентности). В этих исследованиях нами использовались только культивированные ККМ и только в большей или многократной введенной дозе клеток (1 и 2), причем эти клетки трансплантировали через 30–35 суток после рождения.

Наше исследование показало, что в течение 120 суток после трансплантации показатели глюкозы и HbA1c в крови и масса животных поддерживались на уровне нормальных величин и сохранялись на более отдаленных сроках наблюдения (180 дней). Подтверждением нормализации метаболизма у мышей db/db может служить динамическое измерение количества съедаемого корма и выпитой воды, значения которых достоверно отличались от аналогичных у контрольных мышей db/db с СД 2 типа и недостоверно — от нормы. Продолжительность жизни животных этой группы была выше, чем в 1-й группе исследований, и соответствовала, в среднем, $506 \pm 12,7$ дней и $537 \pm 17,1$ дней, что в 2,5–2,7 раза больше по сравнению с контролем. Повышение выживаемости мышей db/db, очевидно, связано с лучшей сохранностью состояния паренхимы внутренних органов, что было морфологически подтверждено. При морфологических исследованиях ткани ПЖ и селезенки оказалось, что площадь ОЛ ПЖ и количество клеток в них, а также площадь фолликулов селезенки и её массы были достоверно выше, чем в контроле, и соответствовали значениям этих показателей в 1-й группе опытов в сериях 1.3 и 2.3. Эти данные позволили нам прийти к заключению, что ККМ, используемые во 2-й группе эксперимента, так же активны как в 1-й группе. Однако более выраженное влияние их на показатели углевод-

ного обмена (нормализация глюкозы и HbA1c), очевидно, связано с отсутствием повреждения инсулярного аппарата ПЖ, количество клеток и островков которого остается достаточным для обеспечения адекватной регуляции углеводного обмена. Об этом свидетельствует большое количество базофильных клеток в ОЛ. О более выраженной регуляторной активности ККМ, введенных на раннем этапе развития СД 2 типа, свидетельствуют морфологические изменения печени, почек, но особенно морфологические изменения ткани селезенки, в которой (через 120–180 суток после введения ККМ) отмечается не только четкий рисунок структуры лимфоидных фолликулов, но и выявляются многочисленные участки мегакариоцитоза, не свойственные ткани селезенки. Они свидетельствуют об участии этого органа не только в регуляции иммунной системы у данных животных, но и в регуляции кроветворения, продукции многочисленных цитокинов и ростовых факторов, т. к. известно, что эти мегакариоциты продуцируют, в частности, трансформирующий ростовой фактор, который играет ведущую роль в регуляции аутоиммунных процессов, процессов регенерации и адаптации.

Наши данные свидетельствуют о том, что ККМ, использованные в биологически активных дозах и при отсутствии необратимого повреждения органов-мишеней, могут стать эффективным средством в профилактике развития СД 2 типа, особенно популяции с ожирением и метаболическим синдромом, относящимися к группе риска СД 2 типа.

Использование ККМ на стадии выраженных клинических проявлений СД 2 типа может стать эффективным вспомогательным средством в профилактике развития осложнений и способ-

ствовать улучшению качества и сроков жизни у таких больных.

Выводы

Корректирующий эффект терапии клетками костного мозга СД 2 типа впервые изучен на отечественной генетической модели СД 2 типа у мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/. Мутантные мыши линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ отвечают всем требованиям экспериментальной генетической модели СД 2 типа, т. к. воспроизводят стадийность течения заболевания и соответствующие патогенетические, функциональные и структурные изменения в организме.

Развитие СД 2 типа у мышей db/db проходит 3 стадии: 1-я стадия (на 1–2-м мес. со дня рождения) характеризуется гипергликемией за счет гипертрофии и гиперплазии островков Лангерганса в поджелудочной железе (стадия инсулинорезистентности); 2-я стадия (на 3–4-м мес. со дня рождения) характеризуется снижением количества функционирующих β -клеток в островках Лангерганса. На этой стадии возникают ожирение и выраженные изменения со стороны внутренних органов, которые отражают нарушения углеводного и липидного обмена, а также недостаточность иммунной системы (гипоплазия лимфоидной ткани); 3-я стадия (на 5–6-м мес. после рождения) характеризуется развитием кахексии, глубоких изменений внутренних органов, которые прогрессируют и заканчиваются гибелью животного.

Отработанные методы выделения, культивирования и трансплантации гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга позволяют осуществлять эффективную коррекцию патогенетических нарушений в организме при СД 2 типа.

Трансплантация аллогенного или изогенного костного мозга животным с СД 2 типа является безопасной и эффективной процедурой, позволяющей корригировать клинические, метаболические и структурные нарушения в организме.

Выраженность терапевтического эффекта от применения клеток костного мозга у мышей с СД 2 типа находится в прямой зависимости от дозы и кратности введения культивированных клеток от здоровых доноров, а также от стадии развития болезни, но не зависит от фенотипа использованных клеток (гемопозитических или стромальных клеток костного мозга) и их гистосовместимости (изогенные или аллогенные).

Введение культивированных клеток костного мозга на ранней стадии развития СД 2 типа (через 1 мес. после рождения) позволяет пролонгированно сохранять (в течение 5 мес.) нормальные уровни глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, а также сохранять значения массы тела в пределах нормы за счет индукции пролонгированной гипертрофии и гиперплазии островков Лангерганса в поджелудочной железе и торможения развития патологических изменений во внутренних органах (печень, почки, органы иммуногенеза). Введение клеток костного мозга позволяет в 2,5–2,7 раза увеличить сроки жизни животных по сравнению с контролем (СД 2 типа без клеток костного мозга).

Введение культивированных клеток костного мозга на стадии выраженных клинических проявлений СД 2 типа (3–4 мес. после рождения) не сопровождается достоверным и стабильным снижением уровней гликемии и гликозилированного гемоглобина, однако снижает выраженность патоморфологических изменений во внутренних органах, что способствует

сохранению их адекватной функции и пролонгирует сроки жизни животных в 1,7–2,3 раза по сравнению с контролем (СД 2 типа без клеток костного мозга).

Пролонгированное поддержание восстановительного морфогенеза поврежденных органов при моделировании СД 2 типа обусловлено длительным (120 дней) сохранением жизнеспособности введенных клеток костного мозга, что подтверждается люминесценцией клеток костного мозга мышей В10.GFP, содержащих ген зеленого белка.

Список литературы

1. **Бландова З.К., Малащенко А.М., Крышкина В.П., Семенов Х.Х., Шмидт Е.Ф.** Правила разведения инбредных лабораторных животных: Методические указания / АМН СССР, НИЛ экспериментально-биологических моделей. М. 1979.
2. **Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф.** Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований.: М. Наука. 1983. 42. 105 с.
3. **Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др.** Состояние пулов стволовых клеток при экспериментальном сахарном диабете. Клеточные технологии в биологии и медицине 2007. 3: С. 123–126.
4. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М: ВПК. 2004. 217 с.
5. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Том 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. М: ВПК. 2007. 320 с.
6. **Коровин Б.Ф., Беляева Н.Ф., Краевой С.А., Голубев М.А., Городецкий В.К., Маркова М.С., Кольченко О.Л.** Изменение содержания фруктозо-2,6-биофосфата в лимфоцитах пери-

- ферической крови больных сахарным диабетом. М.: Вопросы медицинской химии. 1999. № 3. С. 37–43.
7. **Расулов М.Ф.** Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и эмбриональных фибробластов в лечении ожоговых ран. М: Тихоокеанский мед. журнал. 2004. № 1 (15). С. 7–9.
8. **Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В.** Междисциплинарные исследования в медицине. М: Техносфера. 2007. 368 с.
9. **Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В., Галахова Т.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.** Мутантные мыши линии C57BL/KsLep^{db}/+ как генетическая модель сахарного диабета 2-го типа. М: Бюллетень экспер. биол. и мед. 2007. № 12. С. 664–667.
10. **Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Галахова Т.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Онищенко Н.А., Касинская Н.В.** Генетиче- ская модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsLep^{db}/+ М: Биомедицина. 2009. № 2. С. 28–40.
11. **Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Деньгина С.Е.** Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга. М: Биомедицина. 2011. № 2. С. 30–34.
12. **Потапов И.В., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А.** Клеточная кардиомиопластика. М: Вестник трансплантологии и иск. органов. 2001. № 2. С. 54–62.
13. **Теппермен Дж., Теппермен Х.** Физиология обмена веществ и эндокринной системы. / Пер. с англ. Под ред. Я.И. Ажипы — М.: Мир. 1989. С. 488–599.
14. **Hers H.G.** The discovery and biological role of fructose 2,6 biphosphate. Biochem. Soc. Trans. 1984. 12: 729.

Efficiency of correction of clinical and morphological symptoms of diabetes 2 types at transplantation of stem cells depending on a disease stage

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

For the first time the method of treatment of diabetes 2 types by means of allogenic and isogenic cultivated stem cells from native biomodel of diabetes 2 types wich reproduce clinical manifestation of human diabetes. The conditions which optimized treatment with stem and progenitory cells were determined. It was demonstrated that prolong clinical effect of carbohydrate exchange and prevention of deep structural pathogenetic violation in an internal come when stem cells used in an early stage of diabetes 2 types in high doses or repeated application of average cells doses that allows to compensate a carbohydrate exchange for a long time by preservation of adequate functional activity of the islets by pancreas. This method may be considered as a preclinical stage in studing of possibilities and prospects of stem cells application in complex treatment of diabetes of 2 types.

Key words: diabetes 2 types, mice of db/db, pancreas, stem cells.

Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-P в эксперименте

Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, А.С. Бирюкова

Рязанский государственный медицинский университет, Минздравсоцразвития РФ, Рязань

Контактная информация: Якушева Елена Николаевна enya.rzn@yandex.ru

В исследовании на кроликах изучено влияние L-тироксина на активность белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp). Активность Pgp изучали по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина. Установлено, что введение L-тироксина в течение 14 дней приводит к дозозависимой индукции активности Pgp.

Ключевые слова: гликопротеин-P, MDR1, L-тироксин, гипертиреоз, фексофенадин.

Суперсемейство ABC-транспортеров (ATP-binding cassette), к которому относятся более ста транспортных белков, обнаруженных как у бактерий, так и у человека, в настоящее время находится под пристальным вниманием исследователей. Белки указанного суперсемейства транспортируют самые разнообразные субстраты — от неорганических ионов до полисахаридов и белков, для них характерна общая доменная организация в клетках и высокая консервативность. Одним из наиболее изученных транспортеров является гликопротеин-P (от англ. permeability — проницаемость) — крупный трансмембранный белок с молекулярной массой 170 кДа, состоящий из двух одинаковых частей, каждая из которых включает шесть трансмембранных участков [9].

Гликопротеин-P (Pgp) — АТФ-зависимый насос, локализованный на цитоплазматических мембранах различных клеток и осуществляющий выброс во внеклеточное пространство различных ксенобиотиков, в том числе и лекар-

ственных веществ. Ряд химических соединений как естественного, так и синтетического происхождения оказывают индуцирующее или ингибирующее влияние на функциональную активность Pgp, что приводит, в конечном счете, к значительному изменению фармакокинетики, активности и токсичности лекарственных веществ [4].

Влияние тиреоидных гормонов на функциональную активность Pgp остается недостаточно изученным. Активация белково-синтетических функций и повышение интенсивности энергетических процессов в клетке под действием тироксина гипотетически способны оказать влияние на функциональную активность Pgp.

Цель настоящего исследования: изучить влияние L-тироксина на функциональную активность гликопротеина-P в эксперименте.

Материалы и методы

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах породы шиншилла, средней массой 3500±100 г. В исследование

включали самок, которые находились в состоянии течки. L-тироксин (Berlin-Chemi Menarini) вводили подкожно в течение 14 дней: 6 самкам — в дозе 25 мкг/кг массы (серия с низкой дозой тирокина) и 6 самкам — в дозе 100 мкг/кг массы (серия с высокой дозой тирокина) [1, 2]. За сутки до начала эксперимента, через 14 дней введения L-тироксина и на 5-й день отмены препарата у животных определяли активность Pgp и уровень ТТГ, Т3 и Т4 в сыворотке крови.

Активность белка-транспортера оценивали по концентрации в плазме крови его маркерного субстрата — фексофенадина. Фексофенадин (Sanofi Aventis) вводили животным перорально с помощью металлического зонда в дозе 30 мг/кг массы [3]. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 ч от момента введения препарата из ушной вены кроликов забирали кровь в объеме 5 мл. Для получения плазмы пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин и хранили до анализа при температуре -29°C . Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Beckman Coulter» с ультрафиолетовым детектором и колонке «Beckman Coulter» $4,6 \times 250$ мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по методу Раменской Г.В. с соавт. [5] в собственной модификации. Анализ выполняли при длине волны 225 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. Использовали подвижную фазу следующего состава: 133,7 мл бидистиллированной воды, содержащей 2,33 мл ледяной уксусной кислоты (ХИММЕД) и 0,936 мл триэтиламина (Chem-Lab), доведенной ортофосфорной кислотой до pH 4 и 64 мл ацетонитрила (Chem-Lab). Осуществляли жидкостную экстракцию фексофенадина из плазмы крови. В каче-

стве экстрагентов использовали дихлорметан (ACROS ORGANICS), этилацетат (ACROS ORGANICS) и диэтиловый эфир (ХИММЕД). Коэффициент экстракции составил 53%.

Количественное определение фексофенадина выполняли по методу абсолютной калибровки, с использованием стандарта фексофенадина (Strasbourg cedex). Представлено уравнение калибровочной зависимости для определения фексофенадина в плазме крови:

$$y = ax + b = -0,0001 + 9,4089 \cdot 10^{-6} \cdot x,$$

где y — высота пика фексофенадина в единицах экстинкции, x — содержание фексофенадина в стандартном растворе в нг/мл. Коэффициент регрессии r для данной калибровочной зависимости равнялся 0,9958.

Примененный метод хроматографического анализа обладал следующими характеристиками: время удерживания — 13,7 мин; предел обнаружения фексофенадина в плазме крови — 90 нг/мл; точность — 4,2%.

Вычисление концентрации фексофенадина осуществляли с помощью программы Gold. Фармакокинетические параметры (максимальную концентрацию C_{\max} , площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время $AUC_{0-\infty}$, общий клиренс, объем распределения) рассчитывали модельно-независимым методом с использованием программы Kinetica 5.0. Отношение $C_{\max}/AUC_{0-\infty}$ рассчитывали самостоятельно.

Уровень гормонов определяли радиоиммунным методом с применением стандартных тест-систем производства IMMUNOTECH (Чехия) и дальнейшей обработкой результатов на анализаторе «Иммунотест» (Москва) в ЦНИЛ РязГМУ.

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программ

Statsoft Statistica 6.1. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение, внутри каждой серии использовали тест ANOVA повторных измерений, межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Для оценки статистической значимости различий групп при распределении признака, которое от-

личается от нормального, использовали критерий Фридмана, межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров от уровня гормонов определяли по коэффициенту корреляции Пирсона для выборок с нормальным распределением (r) и по коэффициенту корреляции Спирмена (R_s) для выборок с распределением отличным от нормального.

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина и гормональный статус кроликов при введении тироксина в дозе 25 мкг/кг массы ($M \pm m$ — при нормальном распределении признаков; медиана, нижний и верхний квартиль — при распределении признака, отличном от нормального)

Изучаемые параметры	Исходные значения n=6	Тироксин 14 дней n=6	5-й день отмены тироксина n=6
С _{max} , нг/мл	385,9±54,7	234,0±22,4*, **	320,1±24,1
T _{max} , ч	4,0 (3,0; 4,0)	4,0 (4,0; 5,0)	4,0 (4,0; 4,0)
T, ч	28,9 (5,4; 29,02)	10,17 (6,07; 14,56)	8,17 (6,47; 20,34)
AUC _{0-t} , нг/чмл	6886,9±1351,5	3795,7±767,7	4841,6±1011,8
AUC _{0-∞} , нг/чмл	4058,4 (3609; 4394,9)	1526 (1449,3; 2148,8)*	2191,8 (2054,1; 3644,8)
Общий клиренс, л	16,1±4,0	30,1±6,5	22,2±3,6
Объем распределения, л	344,3±52,3	446,1±49,2	360,3±25,1
С _{max} / AUC	0,072±0,021	0,077±0,017	0,081±0,016
MRT, ч	38,9 (10,0; 41,8)	17,1 (11,1; 22,5)	14,8 (11,0; 27,8)
MRT _t , ч	10,0 (8,8; 11,9)	6,5 (4,1; 6,7)*	6,0 (5,9; 9,7)*
ТТГ, мМЕ/л	0,7 (0,7; 0,8)	0,5 (0,4; 0,5)*, **	0,7 (0,6; 0,8)
T3, нмоль/л	1,2 (1,1; 1,6)	7,7 (7,2; 8,3)*, **	1,1 (1,0; 1,1)
T4, нмоль/л	39,8±0,6	139,1±13,0*, **	60,7±7,5

Примечание: * — достоверные различия с данными у интактных животных, $p < 0,05$;
** — достоверные различия с данными на 5 день отмены тироксина, $p < 0,05$.

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина и гормональный статус кроликов при введении тироксина в дозе 100 мкг/кг массы ($M \pm m$ — при распределении признаков; медиана, нижний и верхний квартиль — при распределении признака отличном от нормального)

Исследуемые параметры	Исходные значения n=6	Тироксин 14 дней n=6	5-й день отмены тироксина n=6
C_{max} , нг/мл	399,8±14,2	180,3±9,8*, **	332,4±14,3*
T_{max} , ч	4,0 (3,0; 4,0)	4,0 (4,0; 5,0)	4,0 (4,0; 4,0)
T, ч	13,5±4,0	7,7±4,4	12,8±1,9
AUC_{0-1} , нг/чмл	3522,4 (3303,0; 3631,3)	1195,0 (1032,1; 1202,4)*, **	3237,7 (1875,6; 3992,1)
$AUC_{0-\infty}$, нг/чмл	5336,4±717,3	1937,1±666,3*, **	4881,5±763,0
Общий клиренс, л	18,6±2,6	52,7±14,4*, **	21,3±3,7
Объем распределения, л	329,9±47,5	445,9±72,9	372,5±20,8
C_{max}/AUC	0,084±0,0135	0,144±0,04	0,076±0,01
MRT, ч	20,9±5,1	13,8±6,2	19,7±2,6
MRT _t , ч	10,5 (8,3; 10,8)	5,7 (5,1; 6,9)*	10,3 (6,3; 11,1)
ТТГ, мМЕ/л	0,6±0,02	0,5±0,03*	0,6±0,03
Т3, нмоль/л	1,8±0,09	9,9±0,5*, **	4,2±0,6*
Т4, нмоль/л	70,0±4,3	241,6±12,9*, **	42,1±1,8*

Примечание: * — достоверные различия с данными у интактных животных, $p < 0,05$;

** — достоверные различия с данными на 5 день отмены тироксина, $p < 0,05$.

Полученные данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего результата в случае нормального распределения признака или в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля — если распределение данных отличалось от нормального.

Результаты и их обсуждение

Введение как низкой (25 мкг/кг массы), так и высокой дозы (100 мкг/кг массы) L-тироксина приводило к раз-

витию выраженного гипертиреоза, что проявлялось повышением уровней Т4 на 249,5% ($p < 0,05$) и 245,1% ($p < 0,05$), Т3 на 496,1% ($p < 0,05$) и 450,0% ($p < 0,05$) и снижением содержания ТТГ в сыворотке крови на 36,9% ($p < 0,05$) и 19,4% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с исходными значениями (табл. 1 и 2). Более выраженные изменения показателей у животных, получавших низкую дозу L-тироксина, связаны с исходно более низкими показателями уровней Т4, Т3

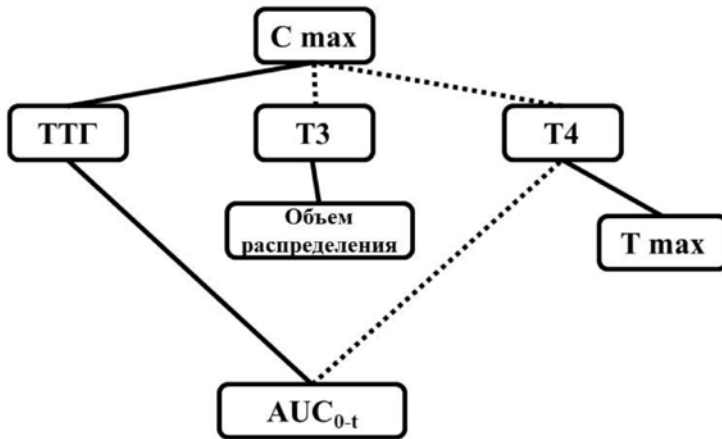


Рис. 1. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров от гормонального статуса кроликов при введении тироксина в дозе 25 мкг/кг массы (коэффициент корреляции Спирмена). Обозначения: непрерывная линия — прямопропорциональная связь; пунктирная линия — обратнопропорциональная связь между признаками.

и более высоким уровнем ТТГ в данной серии опыта (табл. 1). На 5-й день отмены низкой дозы L-тироксина происходила нормализация гормонального статуса лабораторных животных. В отличие от данных этой серии, на 5-й день отмены высокой дозы L-тироксина содержание Т3 оставалось повышенным на 133,3% ($p < 0,05$), концентрация Т4 снижалась на 39,9% ($p < 0,05$), уровень ТТГ соответствовал норме.

При изучении фармакокинетики фексофенадина — маркерного субстрата Pgp на фоне введения тироксина — получены результаты, которые представлены в табл. 1 и 2.

Применение кроликам L-тироксина в дозе 25 мкг/кг в течение 14 дней вызвало снижение C_{max} на 39,4% ($p < 0,05$), AUC_{0-t} — на 62,4% ($p < 0,05$), $MRTt$ — на 35,0% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями. На 5-й день отмены L-тироксина изучаемые параметры возвращались к норме и достоверно от исходных значений не отличались, за исключением $MRTt$, которое оставалось сниженным на 40,0% ($p < 0,05$).

При введении L-тироксина в дозе 100 мкг/кг массы в течение 14 дней наблюдалась схожая динамика показателей, но выраженная в большей степени. C_{max} снизилась на 54,9% ($p < 0,05$), $AUC_{0-\infty}$ — на 63,7% ($p < 0,05$), $MRTt$ — на 45,7% ($p < 0,05$), общий клиренс увеличился на 183,3% ($p < 0,05$). На 5-й день отмены высокой дозы L-тироксина C_{max} оставалась сниженной на 16,8% ($p < 0,05$), остальные изучаемые фармакокинетические параметры достоверно от исходных значений не отличались ($p > 0,05$).

Оценка зависимости фармакокинетических параметров от гормонального статуса показала (рис. 1), что у животных, получавших L-тироксин в низкой дозе, имелась прямая пропорциональная связь между уровнем ТТГ — C_{max} фексофенадина ($R=0,65$, $p=0,005$) и AUC_{0-t} ($R=0,5$, $p=0,042$); уровнем Т3 и объемом распределения ($R=0,53$, $p=0,03$); содержанием Т4 и T_{max} ($R=0,51$; $p=0,04$) и обратно пропорциональная связь между уровнем Т3 и C_{max} ($R=-0,6$; $p=0,01$); содержанием Т4 — C_{max} ($R=-0,56$; $p=0,019$) и AUC_{0-t} ($R=-0,67$; $p=0,003$).

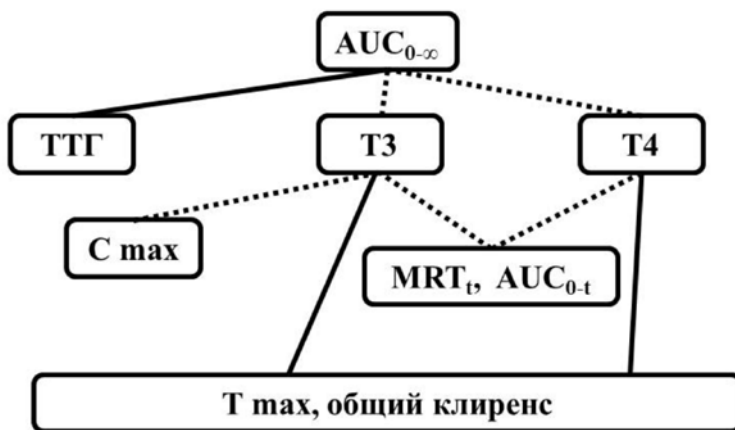


Рис. 2. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров от гормонального статуса кроликов при введении высокой дозы тироксина в дозе 100 мкг/кг массы (коэффициент корреляции Спирмена). Обозначения: непрерывная линия — прямопропорциональная связь; пунктирная линия — обратно-пропорциональная связь между признаками.

У животных, получавших L-тироксин в высокой дозе, наблюдалась (рис. 2) прямая пропорциональная связь между уровнем ТТГ и $AUC_{0-\infty}$ ($R=0,48$; $p=0,049$); содержанием Т3 — T_{max} ($R=0,6$; $p=0,01$), общим клиренсом ($R=0,73$; $p=0,0012$); концентрацией Т4 — T_{max} ($R=0,5$; $p=0,038$), общим клиренсом ($R=0,54$; $p=0,029$). Обратной пропорциональной связью отмечалась между концентрацией Т3 — C_{max} ($R=-0,857$; $p=0,0001$), AUC_{0-t} , ($R=-0,77$; $p=0,0003$), $AUC_{0-\infty}$ ($R=-0,77$; $p=0,0002$) и MRT_t ($R=-0,72$; $p=0,001$); уровнем Т4 — AUC_{0-t} ($R=-0,6$; $p=0,01$), $AUC_{0-\infty}$ ($R=-0,6$; $p=0,01$) и MRT_t ($R=-0,55$; $p=0,023$).

P_{gr} — белок-транспортёр, обладающий широкой субстратной специфичностью. В научной литературе описан ряд лекарственных средств, влияющих на функциональную активность гликопротеина-P, повышающих ее (индукторы) или снижающих (ингибиторы) [2].

В настоящем исследовании изучено влияние L-тироксина на функциональную активность P_{gr} на уровне целого ор-

ганизма, что позволяет прогнозировать фармакокинетику субстратов белка-транспортёра. Показано, что на фоне введения L-тироксина происходит снижение C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} , MRT_t и одновременно повышение общего клиренса фексофенадина, что свидетельствует о повышении активности белка-транспортёра P_{gr}. В то же время увеличение общего клиренса (характеризующего выведение лекарственных веществ из организма) и отсутствие изменений в отношении $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ (характеризующего всасывание лекарственных веществ) можно рассматривать как селективное повышение активности P_{gr} под действием L-тироксина в печени и почках — органах, ответственных за выведение фексофенадина. Полученные данные косвенно свидетельствуют о тканеспецифичной индукции P_{gr}. Более выраженные изменения фармакокинетики фексофенадина при введении L-тироксина в дозе 100 мкг/кг массы по сравнению с дозой 25 мкг/кг являются следствием дозозависимой стимуляции активности P_{gr}.

Результаты исследования сопоставимы с данными по изучению экспрессии Pgp у крыс с гипертиреозом. Авторы выявили существенное повышение экспрессии Pgp в печени и почках, умеренное — в тощей и подвздошной кишке, что позволило им сделать вывод о тканеспецифичной индукции экспрессии белка-транспортера [7]. Активация Pgp под влиянием тироксина может быть связана со стимуляцией ядерных рецепторов и индукцией экспрессии Pgp, которая опосредована увеличением транскрипции мРНК, кодируемой геном *mdr1a/b*, что обнаружено в ткани почек у крыс [7, 10].

На культуре клеток с повышенной экспрессией MDR1 обнаружено, что Т3 выводится из клеток Pgp [6]. Аналогичные данные получены для Pgp в гематоэнцефалическом барьере. Показано, что белок-транспортер регулирует проникновение Т4 в спинно-мозговую жидкость [11].

На культуре клеток кишечника человека Сасо-2 выявлено, что Т3 регулирует экспрессию и функции Pgp. Установлено, что накопление дигоксина в клетках Сасо-2 существенно снижалось при использовании Т3. [8]. Таким образом, тиреоидные гормоны являются субстратами и тканеспецифичными индукторами Pgp, а дисфункция щитовидной железы способна существенно изменять фармакокинетику лекарственных веществ.

Выводы

1. Введение кроликам L-тироксина подкожно в дозах 25 и 100 мкг/кг массы в течение 14 дней приводит к развитию экспериментального гипертиреоза, который характеризуется повышением уровней Т3 и Т4 и снижением уровня ТТГ в сыворотке крови.

2. L-тироксин, назначаемый кроли-

кам в течение 14 дней, вызывает дозозависимую индукцию активности гликопротеина-Р, определяемую по фармакокинетики его маркерного субстрата фексофенадина, что подтверждается снижением C_{max} , AUC_{0-t} , MRTt (дозы 25 и 100 мкг/кг) и увеличением общего клиренса (доза 100 мкг/кг).

3. Выявляется обратная корреляция между уровнем Т3 и C_{max} фексофенадина при назначении L-тироксина в низкой и высокой дозах.

Список литературы

1. **Айвазова А.С., Колхир В.К.** Патент 2357296 Рос. Федерация. МПК 609823/28 Способ моделирования тиреотоксикоза и коллоидного зоба. Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР); № 2007143562/14; заявл. 27.11.2007; опублик. 27.06.2009.
2. **Годовалов А.П.** Адренергическая регуляция фагоцитарной активности нейтрофилов при экспериментальном тиреотоксикозе // Вестник уральской медицинской академической науки. 2010. № 2/1 (29). 112 с.
3. **Колхир С.В.** Клиническое значение изучения активности транспортера лекарственных средств гликопротеина-Р для оптимизации фармакотерапии: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.00.25 / С.В. Колхир; ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова. М. 2007. 21 с.
4. **Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В.** Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализационной медицины: руководство для врачей — М.: ГЭОТАР-МЕДиа. 2008. 304 с.

5. *Раменская Г.В., Скуридина Е.В., Красных Л.М.* Разработка методики количественного определения маркера активности Р-гликопротеина фексофенадина в плазме крови // Хим. фарм. журн. 2006. том 40. № 12. С. 47–50.
6. *Kassem N. et al.* Thyroxine (T4) transfer from CSF to choroid plexus and ventricular brain regions in rabbit: contributory role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides // Brain Res. 2007. Vol. 1181. P. 44–50.
7. *Mitchell A.* Thyroid hormone export from cells: contribution of P-glycoprotein / A. Mitchell, M. Tom, R. Mortimer // Endocrinol. 2005. Vol. 185. № 1. P. 93–98.
8. *Nishio N.* Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues / [et al.] // Journal of endocrinology. 2005. Vol. 185. P. 93–98.
9. *Nishio N., Katsura T., Inui K.* Thyroid hormone regulates the expression and function of P-glycoprotein in Caco-2 cells // Pharm. Res. 2008. Vol. 25(5). P. 1037–1042.
10. *Reibeiro R.C.J. et al.* The molecular biology of thyroid hormone action // Ann NY Acad Sci. 1995. Vol. 758. P. 366–389.
11. *Sarkadi B., Homolya L., Szakocs G. et al.* Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinmunity Defense System // Physiol. Rev. 2006. Vol. 86. P. 1179–1236.

Dose-dependent thyroxine influence of P-glycoprotein functional activity in the experiment

Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, А.С. Бирюкова

In the research on the rabbits influence of L-thyroxine on the activity of the protein-transporter P-glycoprotein (Pgp) was studied. Activity of the Pgp was studied on the pharmacokinetics of its marker substrate fexofenadine. It was established that introduction of L-thyroxine within 14 days lead to the dose-dependent induction of Pgp activity.

Key words: P-glycoprotein, MDR1, L-thyroxine, hyperthyroidism, fexofenadine.



Роль оксида азота в регуляции функции перитонеальных макрофагов у крыс при экспериментальном нарушении маточно-плацентарного кровообращения

А.С. Иванова¹, И.Г. Попова², С.Б. Назаров^{1,2}

¹ – *Ивановская государственная медицинская академия, Минздравсоцразвития РФ, Иваново*

² – *Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова, Минздравсоцразвития РФ, Иваново*

Контактная информация: Анастасия Сергеевна Иванова asivanova@mail.ru

Изучение активности перитонеальных макрофагов, состояние NO-зависимых механизмов и свободнорадикальных процессов при нормальной беременности и на фоне экспериментального нарушения маточно-плацентарного кровообращения (НМПК) проводилось на белых крысах.

При введении L-NAME и при НМПК в сыворотке крови наблюдаются сходные изменения в виде снижения уровня суммарных нитратов и нитритов, усиления свободнорадикальных процессов. Активность перитонеальных макрофагов меняется противоположным образом: L-NAME ее значительно увеличивает, а НМПК — уменьшает. При сочетанном воздействии повышается продукция оксида азота и образование нитротирозина, что в этих условиях играет защитную роль, обеспечивая приспособление нарушенного фето-плацентарного кровотока к потребностям плода, активность макрофагов соответствует уровню интактных крыс.

Ключевые слова: оксид азота, беременность, перитонеальные макрофаги, гипоксия плода.

Изучение закономерностей регуляторных процессов гестации имеет не только важное теоретическое значение, но и практическую ценность, которая заключается в выяснении причин нарушения физиологических механизмов при различных патологиях беременности и выработке подходов к их коррекции. В этом плане одно из центральных мест занимает проблема NO-зависимой регуляции гестации. В результате развития этого направления исследований накоплен достаточно большой объем инфор-

мации, дающей представление о роли оксида азота при беременности и родах [15, 17, 18]. Известно, что изменение уровня NO приводит к появлению классических симптомов эклампсии, фето-плацентарной недостаточности, эмбрио- и фетопатиям, внутриутробной задержке роста и смерти плода.

Оксид азота продуцируется множеством клеток, в том числе индуцибельной NO-синтазой макрофагов, и существенно влияет на их активность. Макрофаги в работе женской репродуктивной си-

стемы выполняют множество функций: обеспечивают взаимодействие в системе мать-плацента-плод, регулируют ангиогенез и процессы апоптоза в плаценте, образование стероидных гормонов, фолликулогенез, образование желтого тела и его регрессию [3, 5].

При повышении концентрации NO на фоне усиления свободнорадикальных процессов может образовываться высокотоксичное долгоживущее соединение пероксинитрит, который вызывает повреждение клеток и тканей [8]. В то же время при дефиците оксида азота активируются липооксигеназа и циклооксигеназа, высвобождаются протеолитические ферменты и медиаторы воспаления [11, 21].

Цель работы — изучить активность перитонеальных макрофагов, состояние NO-зависимых механизмов и свободнорадикальных процессов при нормальной беременности и на фоне нарушения маточно-плацентарного кровообращения у белых крыс.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 70 белых беспородных половозрелых крысах-самках массой 200–260 г. Животные содержались в условиях вивария на стандартном рационе и имели свободный доступ к воде. Выбор крыс как объекта исследований обусловлен их гемохориальным типом плаценты, подобным человеку, что имеет значение для интерпретации данных при использовании этого вида животных в эксперименте. Первый день беременности регистрировался по появлению сперматозоидов во влагалищных мазках.

Животные были разделены на 5 групп: 1) животные с нормальной беременностью; 2) беременные крысы, полу-

чавшие неселективный ингибитор синтеза оксида азота *Nw-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME) внутримышечно в дозе 10 мг/кг с 1-го дня беременности [9]; 3) беременные крысы с экспериментальным нарушением маточно-плацентарного кровообращения [2]; 4) беременные крысы с экспериментальным нарушением маточно-плацентарного кровообращения и введением неселективного ингибитора синтеза оксида азота L-NAME внутримышечно в дозе 10 мг/кг с 1-го дня беременности; 5) ложноперированные беременные крысы (группа сравнения).

Операция по нарушению маточно-плацентарного кровообращения проводилась под нембуталовым наркозом (40 мг/кг) по методике М.М. Варгановой (1984) путем перевязки части преплацентарного сосудистого пучка на 16-й день беременности, то есть в тот период, когда плацентация уже завершена и плод полностью переходит на плацентарное кровообращение.

У животных на 20-й день беременности осуществлялся забор крови из подъязычного сплетения. В сыворотке оценивали следующие показатели: концентрация суммарных нитратов и нитритов (NO_x , по методике *Miranda K.*, 2001), концентрация нитротирозина (с использованием набора для ИФА-исследований фирмы NBT, Нидерланды), состояние свободнорадикальных процессов и антиоксидантная активность (хемилюминесцентным методом на биохемилюминометре БХЛ-06М). Активность свободнорадикальных процессов в организме определяли по светосумме свечения (S) и максимальной интенсивности сигнала (Im), состояние антиоксидантной защиты — по тангенсу угла наклона кривой ($tg \alpha$).

Функцию перитонеальных макро-

фагов оценивали, используя предложенную *Mantovani B.* (1987) методику их краткосрочного культивирования с аутологичными эритроцитами [14]. Макрофаги крыс взаимодействуют с аутологичными эритроцитами *in vitro* с образованием розеткоподобных структур. Производился дифференциальный подсчет этих структур с выделением 5 типов: макрофаги без эритроцитов (МФ0), макрофаги, несущие на своей поверхности 1–2 (1-й тип, МФ1), 3–5 (2-й тип, МФ2), 6–8 (3-й тип, МФ3), более 9 эритроцитов (4-й тип, МФ4). Для интегральной оценки клеточных механизмов эритродиереза рассчитывался индекс адгезивно-фагоцитарной активности (ИАФА): $ИАФА = (МФ_1 + 2 * МФ_2 + 3 * МФ_3 + 4 * МФ_4) / МФ_0$.

Эвтаназию животных осуществляли под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) путем дислокации шейных позвонков.

Статистическая обработка полученных результатов производилась методами вариационного анализа с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Показатели ложнооперированных животных от интактных беременных крыс достоверно не отличаются.

При введении L-NAME в организм беременных животных в сыворотке крови достоверно снижается концентрация NO_x , содержание нитротирозина не меняется, что можно объяснить торможением активности NO-синтаз. Активность свободнорадикальных процессов повышается, антиоксидантная активность увеличивается (табл. 1). На этом фоне возрастает фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов (табл. 2). Увеличивается число розеток 2 и 3 типа. Величина ИАФА

больше значений интактных животных на 512%. Усиление фагоцитоза можно объяснить, с одной стороны, нарушением под влиянием L-NAME нормальной структуры мембран [20], а с другой — свободнорадикальным их повреждением под влиянием ПОЛ, вследствие дефицита оксида азота, обладающего антиоксидантным действием [21]. Подобные изменения возникают не только в эритроцитах, но и в эндотелии, приводя к его дисфункции. В этих условиях повышается активность макрофагов через увеличение образования в них интерлейкина-6, *monocyte chemoattractant protein-1* и *nuclear factor-kB* [7]. Согласно современным представлениям, физиологическую беременность можно назвать «умеренным воспалением», а беременность при гестозе является крайним случаем — «избыточным воспалением». По мнению ряда авторов, оно связано с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов на фоне дефицита NO и чрезмерной активацией макрофагов [16], что мы и наблюдаем в нашем случае.

При нарушении маточно-плацентарного кровообращения наблюдаются изменения, сходные с предыдущей группой животных (табл. 1). В сыворотке крови снижается концентрация NO_x , содержание нитротирозина достоверно не меняется. Уровень свободнорадикальных процессов достоверно повышается. Эти изменения можно объяснить возникновением эндотелиальной дисфункции при перевязке преплацентарного сосудистого пучка, связанной с облитерацией части сосудов и существенным перераспределением кровотока на фоне гипоксии плаценты и плода [1]. В условиях сниженного синтеза оксида азота происходит оксидантное повреждение

Состояние NO-зависимых механизмов
и свободнорадикальных процессов у белых крыс

Показатель	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
NO _x , ммоль/л	242,7±23,86	178,22±8,10*	165,6±8,36*	211,4±16,94#&
нитротирозин, нмоль/л	4,56±0,26	4,92±0,40*	4,57±0,56	6,23±0,42*#&
состояние свободнорадикальных процессов и антиоксидантная активность				
S, имп./с	12,46±0,98	19,36±1,81 [·]	15,28±0,92 [#]	18,36±1,08 [·]
Imax, имп./с	1,91±0,08	2,93±0,11 [·]	2,76±0,09 [·]	2,72±0,08 [·]
tg2	0,52±0,02	0,72±0,04 [·]	0,66±0,05 [·]	0,30±0,02 ^{#&}

Примечание: * — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 1-й группы животных;
— отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 2-й группы животных;
& — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 3-й группы животных.

Таблица 2

Активность перитонеальных макрофагов у крыс разных групп

Показатели	Группы			
	1	2	3	4
МФ0, %	55,1 ±2,64	22,8±2,68*	68,89±3,53**	51,83±7,44 [#]
МФ1, %	34,6±2,12	30,2±2,86	25,00±2,72*	27,67±4,62
МФ2, %	7,67±0,94	37,0±1,89*	4,89±1,54 [#]	13,83±3,69 [#]
МФ3, %	1,67±0,50	8,50±1,95*	1,22±0,44 [#]	5,17±2,23 ^{&}
МФ4, %	1,00±0,47	1,50±1,20	1,11±0,66	1,50±0,66
ИАФА	1,13 ±0,14	6,89 ±1,50*	0,67±0,11**	1,95±0,58 [#]

Примечание: * — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 1-й группы животных;
— отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 2-й группы животных;
& — отмечены показатели, достоверно отличающиеся от значений 3-й группы животных.

эндотелиальных клеток, повышается активность ангиотензина и тромбина, что в совокупности приводит к нарушению микроциркуляции, возникновению многоочаговой тканевой гипоксии, которая еще более усугубляет степень повреждения сосудов и сопряженных с этим осложнений [12]. Таким образом, в случае НМПК также моделируется гестоз. Однако активность перитонеальных макрофагов достоверно меньше, чем у интактных животных (ИАФА ниже на 40%), и, тем более, чем у животных с L-NAME (табл. 2). Это, вероятно, можно объяснить более выраженными и менее продолжительными нарушениями образования оксида азота (при введении L-NAME NO_x снижается по сравнению с интактными крысами на 27%, при НМПК — на 46%), снижением выработки *macrophage colony-stimulating factor* [6], увеличением выработки глюкокортикоидов [10], изменением двигательной активности макрофагов вследствие гипоксии, индукцией в них процессов апоптоза [4].

При нарушении маточно-плацентарного кровообращения на фоне введения антагониста оксида азота концентрация NO_x и содержание нитротирозина достоверно повышаются по сравнению с изолированным нарушением маточно-плацентарного кровообращения и введением L-NAME. Активность свободнорадикальных процессов достоверно не меняется по сравнению с 2-й и 3-й группами животных (табл. 1), но значительно снижается антиоксидантная активность. Повышение уровня NO при сочетанном нарушении связано, вероятно, с активацией индуцибельной NO -синтазы при длительном введении антагониста оксида азота [17], что необходимо для существования плодов в этих условиях. Увеличение уровня нитротирозина

свидетельствует о высоком образовании пероксинитрита, который играет относительно саногенетическую роль, являясь вазодилататором, но при этом ингибирует активность других сосудорасширяющих веществ, увеличивая сосудистую дисфункцию [13, 19]. Активность макрофагов в этих условиях увеличивается по сравнению с изолированным НМПК и практически достигает уровня интактных крыс (табл. 2). Вероятно, повышение образования оксида азота стимулирует перитонеальные макрофаги.

Таким образом, при введении L-NAME и при НМПК в сыворотке крови наблюдаются сходные изменения в виде снижения уровня NO_x , активации свободнорадикальных процессов. Активность перитонеальных макрофагов меняется противоположным образом: L-NAME ее значительно увеличивает, а НМПК — уменьшает. При сочетанном воздействии повышается концентрация NO_x и нитротирозина, что в этих условиях играет защитную роль, обеспечивая приспособление нарушенного фето-плацентарного кровотока к потребностям плода, активность макрофагов соответствует уровню интактных крыс.

Список литературы

1. **Белокриницкая Т.Е., Казанцева Е.В., Витковский Ю.А.** Некоторые патогенетические механизмы развития нарушений в фетоплацентарной системе у пациенток с артериальной гипертензией // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2005. Т. 1. С. 12–16.
2. **Вартанова М.М.** Патогенез и профилактика синдрома отставания в развитии плода при плацентарной недостаточности и его отдельные последствия // Автореферат дисс. докт. мед. наук. Ленинград. 1984.

3. **Шестопалов А.В.** Метаболическая активность плацентарных макрофагов и молекулярные механизмы формирования плаценты при различных вариантах течения беременности // Автореферат дисс. докт. мед. наук. Ростов-на-Дону. 2007.
4. **Burke M.R., Troeger C., Brinkhaus W. et al.** Severely reduced presence of tissue macrophages in the basal plate of preeclamptic placentae // *Placenta*. 2001. Vol. 22. № 4. P. 309–316.
5. **Cohen P.E., Nishimura K., Zhu L., Pollard J. W.** Macrophages: important accessory cells for reproductive function // *Journal of Leukocyte Biology*. 1999. Vol. 66. P. 765–772.
6. **Fried G., Sand A., Èstlund E. et al.** Endothelin-1 and macrophage colony-stimulating factor are co-localized in human amnion membrane cells and secreted into amniotic fluid // *Molecular Human Reproduction*. 2003. Vol. 9. № 11. P. 719–724.
7. **Gonzalez W., Fontaine V., Pueyo M. E. et al.** Molecular plasticity of vascular wall during G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester—induced hypertension. Modulation of proinflammatory signals // *Hypertension*. 2000. Vol. 36. P. 103–109.
8. **Goodrum L.A., Saade G.R., Belfort M.A. et al.** Arginine flux and nitric oxide production during human pregnancy and postpartum // *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2003. Vol. 10. № 7. P. 400–405.
9. **Huang H.-S., Ma M.-Ch., Chen J.** Chronic L-arginine administration increases oxidative and nitrosative stress in rat hyperoxaluric kidneys and excessive crystal deposition // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008. Vol. 295. P. 388–396.
10. **Imperatore A., Rolfo A., Petraglia F. et al.** Hypoxia and Preeclampsia: Increased Expression of Urocortin 2 and Urocortin 3 // *Reproductive Sciences*. 2010. Vol. 17. № 9. P. 833–843.
11. **Kanner J, Harel S, Granit R.** Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclo-oxygenase and hemoglobin // *Lipids*. 1992. Vol. 27. P. 46–49.
12. **Krikun G., Huang S.T., Schatz F. et al.** Thrombin activation of endometrial endothelial cells: a possible role in intrauterine growth restriction // *Thromb Haemost.* 2007. Vol. 97. № 2. P. 245–253.
13. **Liu S., Beckman J.S., Ku D.D.** Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994. Vol. 268. P. 1114–1121.
14. **Mantovani B.** Phagocytosis of in vitro aged erythrocytes — a sharp distinction between activated and normal macrophages // *Exp. Cell. Res.* 1987. Vol. 173. № 1. P. 282–286.
15. **Nath A.K., Enciso J., Kuniyasu M.** Nitric oxide modulates murine yolk sac vasculogenesis and rescues glucose induced vasculopathy // *Development*. 2004. № 131. P. 2485–2496.
16. **Redman C.W.G., Sargent I.L.** Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response — a review // *Placenta*. 2003. Vol. 17. P. 1–27.
17. **Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K.** Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction // *Hum. Reprod. Update*. 1998. № 4. P. 3–24.
18. **Sladek S.M., Magness R.R., Conrad K.P.** Nitric oxide and pregnancy // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272. P. 441–463.
19. **Villa L.M., Salas E., Darley-USmar M, Radomski M.W.** Peroxynitrite induces

both vasodilation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P.12383–12387.

20. *Vokurkova M., Dobesova Z., Pechanova O. et al.* Erythrocyte ion transport and membrane lipid composition in young and adult rats with NO-deficient

hypertension // Life Sci. 2003. Vol. 73. P. 1637–1644.

21. *Wink D., Hanbauer I., Krishna M., DeGraff W. et al.* Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 9813–9817.

Role of nitric oxide in the regulation of peritoneal macrophages in rats offspring chronic disturbance of the uteroplacental blood circulation

A.S. Ivanova, I.G. Popova, S.B. Nazarov

Exam of the activity of peritoneal macrophages, NO-dependent state and mechanisms of free radical processes in normal pregnancy and in the background of the experimental disturbance of the utero-placental circulation (DUPC) was done with using of white rats.

With the introduction of L-NAME and DUPC in serum observed similar changes in the form of lower levels of total nitrate and nitrite, increasing free radical processes. Activity of peritoneal macrophages varies in the opposite way – L-NAME significantly increases her, and DUPC - decreases. When combined action of increased production of nitric oxide formation and nitrotyrosine that under these conditions plays a protective role by providing adaptation impaired fetoplacental blood flow to the needs of the fetus, the activity of macrophages corresponds to the intact rats.

Key words: nitric oxide, pregnancy, peritoneal macrophages and fetal hypoxia.

Деструкция клеток лимфосаркомы Плисса после воздействия на нее низкоинтенсивным лазерным излучением в диапазоне синего света

К.В. Кулакова¹, Т.Г. Щербатюк², В.В. Чернов³

¹ — Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, Минздравсоцразвития РФ, Нижний Новгород

² — Нижегородская государственная медицинская академия, Минздравсоцразвития РФ, Нижний Новгород

³ — Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Контактная информация: к.б.н. Кулакова Ксения Владимировна kulakova-k@yandex.ru

В экспериментах *in vivo* на крысах продемонстрирована возможность индуцирования низкоинтенсивным лазерным излучением в диапазоне синего света (длина волны 460–475 нм) дегенеративных изменений лимфосаркомы Плисса и торможения роста опухоли.

Ключевые слова: лимфосаркома Плисса, низкоинтенсивное лазерное излучение, кариорексис.

В настоящее время в различных областях биомедицины широко применяется низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Этому способствуют многочисленные экспериментально-клинические данные, свидетельствующие о высокой терапевтической эффективности, отсутствии осложнений и побочных эффектов [16]. Низкоинтенсивное лазерное облучение вызывает в тканях и органах различные эффекты, связанные с непосредственным и опосредованным действием электромагнитных волн оптического диапазона. Терапевтический эффект может наблюдаться также и при облучении нелазерными источниками света на ряде длин волн в диапазоне 400–850 нм, однако лазеры, благодаря уникальным характеристикам излучения, оказываются более удобным и эффективным инструментом [12]. Основной чертой воздействия неионизирующих оптических излучений является острорезонансный характер биологического отклика организма: чем

более узким спектром осуществляется воздействие, тем более ярко выражен эффект [2]. Принятый в фотобиологии термин «ответы на синий свет» объединяет группу разнообразных по физиологическим проявлениям фоторегуляторных процессов, индуцируемых синим участком спектра [13]. В современной экспериментальной онкологии практическое использование монохроматического НИЛИ ограничено отсутствием сведений, четко определяющих механизмы действия, эффективные длины волн и режимы облучения. Имеющиеся литературные данные о воздействии лазерного излучения на опухолевый процесс недостаточны и противоречивы. В экспериментах на крысах с лимфосаркомой Плисса при облучении лазером с длиной волны 510 нм было получено торможение метастазирования, однако существенного влияния на рост опухоли это излучение не оказывало [11]. Установлено, что многократное облучение области пере-

вивки опухоли УФ-экимерным лазером (длина волны 308 нм) вызывает торможение развития лимфосаркомы Плисса. При этом авторы указывают на то, что облучение опухоли гелий-неоновым лазером (длина волны 633 нм) приводит к стимуляции опухолевого роста [4].

Данных о влиянии НИЛИ в диапазоне синего света на опухолевый рост в доступной литературе не обнаружено. Таким образом, представляет интерес исследование влияния низкоинтенсивного излучения лазерного источника, работающего в синей области спектра, на прогрессию экспериментальной опухоли.

Целью данного исследования стала разработка нового метода воздействия на опухоль низкоинтенсивным лазерным излучением в диапазоне синего света для подавления ее дальнейшего роста без использования фармацевтических средств.

В рамках поставленной цели решалась задача — исследовать влияние низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 460–475 нм на лимфосаркому Плисса в разные сроки после перевивки и определить оптимальное время воздействия НИЛИ на опухоль.

Материалы и методы

Исследование выполнено на белых нелинейных крысах-самцах, массой 200 ± 50 г, в возрасте 3-х мес., полученных из Центрального питомника лабораторных животных РАМН («Андреевка»). Животных содержали в стандартных условиях вивария; все манипуляции проводили в соответствии с приказом Минвуза СССР № 742 от 13.11.84 «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 «О контроле за проведением работ с использо-

ванием экспериментальных животных». В работе использована лимфосаркома (ЛФС) Плисса — экспериментальная опухоль, полученная в 1958 г. после подкожной перевивки опухоли, возникшей у крысы, получавшей 3,3-дихлорбензидин [17]. Штамм ЛФС, приобретенный в НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва), пассировали на крысах в возрасте 3 мес. Опухолевую ткань для инокуляции крысам-реципиентам забирали на 14-е сутки после трансплантации. Гомогенат опухолевых клеток в физиологическом растворе объемом 0,5 мл вводили подкожно в область правого бедра. Перевиваемость животным опухоли составила 100%.

В работе использован светодиодный источник излучения со следующими параметрами: длина волны 460–475 нм, мощность 10 мВт.

Было выполнено 2 серии экспериментов, в которых варьировали режим воздействия лазерным излучением.

В первой серии эксперимента животные были распределены на группы следующим образом:

1 группа (8 крыс) — контрольная: животным была трансплантирована ЛФС Плисса, однако облучению НИЛИ впоследствии они не подвергались. Срок роста опухоли к моменту декапитации крыс под эфирным наркозом составлял 14 суток.

2 группа (8 крыс) — опытная: животные с ЛФС Плисса. Начиная с 5-ых суток после инокуляции, область ЛФС, предварительно освобожденную от шерсти, облучали НИЛИ в диапазоне синего света в течение 1 мин на протяжении 10 дней для оценки действия на опухолевую прогрессию. Срок роста опухоли к моменту декапитации крыс под эфирным нарко-

зом составлял 14 дней. Курс воздействия НИЛИ — 10 сеансов облучения общей продолжительностью 10 мин.

Животные, сформировавшие вторую серию эксперимента, были распределены на группы следующим образом:

1 группа (7 крыс) — контрольная: животным была трансплантирована ЛФС Плисса, однако облучению НИЛИ впоследствии они не подвергались. Срок роста опухоли к моменту декапитации под эфирным наркозом составлял 14 дней.

2 группа (7 крыс) — опытная: животные с ЛФС Плисса. Область растущей опухоли, начиная со вторых суток после её трансплантации животным, облучали НИЛИ в диапазоне синего света по 15 мин ежедневно общим курсом 14 сеансов. Взятие образцов опухолевой ткани для гистологического и морфометрического исследования осуществлялось на 14-е сутки после трансплантации; курс составлял 14 сеансов облучения общей продолжительностью 210 мин.

Согласно экспериментальным данным В.А. Горькова и Л.С. Васильевой (1973), кинетика развития ЛФС Плисса имеет следующие стадии: начальная нестационарная фаза начинается латентным периодом до 3 суток и продолжается до 9 суток, затем наступает линейная фаза роста опухоли [9]. Таким образом, начало воздействия НИЛИ с длиной волны 475 нм на опухоль совпадало с начальной фазой роста ЛФС Плисса, а взятие опухолевой ткани для гистологического исследования осуществляли на поздней стадии опухолевой прогрессии.

Образцы опухолевой ткани для гистологического исследования фиксировали в 10% забуференном водном растворе нейтрального формалина, проводили через спирты восходящей крепости и две порции хлороформа, затем заливали в

парафин. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином [1, 6]. Подсчет опухолевых клеток с помощью бинокулярного микроскопа с увеличением 600х (объектив — 40, окуляр — 15) выполняли по стандартной методике с использованием сетки С.Б. Стефанова [19]. В препаратах ткани ЛФС Плисса на площади, ограниченной сеткой, подсчитывали общее количество клеток, количество активных и погибающих клеток опухоли. К погибающим относили клетки с лизирующимися ядрами, а также в состоянии кариорексиса и кариопикноза.

Степень торможения роста ЛФС Плисса определяли по окончании опыта после эвтаназии всех животных под эфирным наркозом. Вычислялась разность между средним показателем массы опухоли в контрольной и опытной группах, она делилась на средний показатель массы опухоли в контроле, и полученное значение умножалось на 100% [20].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. (Windows XP). Вид распределения полученных данных не соответствовал нормальному, что оценивали по W-критерию Шапиро-Уилка. В связи с этим, результаты обрабатывали с применением непараметрической статистики: парные межгрупповые сравнения несвязанных выборок проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни; при $p < 0,05$ контрольные и опытные группы считали статистически значимо отличающимися друг от друга [8, 18].

Результаты и их обсуждение

В первой серии эксперимента была поставлена задача — изучить действие малого времени воздействия НИЛИ с длиной волны 460–475 нм на рост экс-

периментальной опухоли. В результате было установлено, что при выбранном режиме воздействия (ежедневный сеанс продолжительностью 1 мин в течение 10 дней) в опытной группе наблюдается торможение роста лимфосаркомы Плисса по сравнению с контролем: на 14 сутки эксперимента оно составило 29,6% (отличие от контроля статистически значимо; $p < 0,05$).

В связи с установленным влиянием НИЛИ на рост ЛФС Плисса, возникло предположение о возможном изменении морфологической структуры опухолевой ткани под действием облучения. Было принято решение о воздействии на опухоль в более ранние сроки (через сутки после её трансплантации животным) и увеличении времени ежедневного воздействия до 15 мин. Выбор продолжительности воздействия был основан на данных предварительных экспериментов *in vitro*, в которых методом индуцированной хемилюминесценции [15] нами было показано, что облучение образцов биологических жидкостей НИЛИ в течение 15 мин приводит к максимальному повышению в них значений свободнорадикального окисления (были проведены эксперименты со следующими экспозициями НИЛИ: 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин).

Анализ массы опухолей у животных контрольной и опытной групп не оправдал предположения, что увеличение экспозиции НИЛИ и начало воздействия в более ранние сроки после её трансплантации крысам могут привести к более значительному влиянию на опухолевую прогрессию, по сравнению с предыдущей серией. Тем не менее, сам факт влияния на опухоль НИЛИ подтвердился — при выбранном режиме воздействия в опытной группе животных с ЛФС наблюдалось торможение роста опухоли на 18%

(отличие от контроля статистически значимо; $p < 0,05$).

В результате исследования препаратов ЛФС животных контрольной группы методом световой микроскопии было установлено, что гистологическая картина опухолевой ткани представляет собой скопления клеток округлой формы, большая часть которых занята крупным ядром. Хроматин располагается главным образом в периферической зоне ядра. Ядрышки крупные, гиперхромные. Цитоплазма опухолевых клеток отличается умеренной базофилией. Строма опухоли скудная, с наличием полнокровия, отека, кровоизлияний. В некоторых участках опухолевой ткани имеются очаги некроза. Опухоль обладает выраженным инфильтративным ростом в мышечные слои и подкожно-жировую клетчатку.

Морфологическое исследование опухолевой ткани животных опытной группы, подверженной действию НИЛИ с длиной волны 460–475 нм, выявило значительные дистрофические и некротические изменения клеток ЛФС Плисса. Морфометрический анализ показал, что доля таких клеток в препарате опухоли, подверженной воздействию НИЛИ, составляет 55,9% от общего числа клеток, а в опухолевой ткани без воздействия — 7,1%. При этом 90% от числа клеток опухоли, находящихся в состоянии дистрофии и некроза, составляют клетки с кариорексисом. Среднее количество клеток с кариорексисом по 10 измерениям составляет $8,1 \pm 1,2$, в то время как в опухолевой ткани животных контрольной группы результаты подсчета клеток с кариорексисом соответствуют значениям $0,1 \pm 0,24$.

Представляется возможным использовать феномен кариорексиса, сопровождающийся разрушением ядерной обо-

лочки и выходом нуклеиновых кислот в виде отдельных глыбок в цитоплазму, в качестве одного из критериев оценки некротических изменений в клетках опухоли. В связи с этим, увеличение количества клеток с разрушенными ядрами целесообразно считать показателем повреждающего действия исследуемого излучения на опухоль. Так, в работе Gitelman D.S. [21] дистрофические изменения в опухолевой ткани приводятся в качестве критерия оценки противоопухолевой эффективности препарата ЭВР-А на мышцах линии BALB/C (штамм аденокарциномы тонкого кишечника). Авторами показано, что по состоянию хроматина ядер опухолевых клеток опытной группы можно судить о дистрофических и некротических изменениях, приводящих к гибели клеток. В исследовании Галоян А.А. с соавт. [7] уровень кариорексиса рассматривается в качестве показателя повреждающего действия на опухолевую ткань пролин-богатых полипептидов, выделенных из нейросекреторных гранул гипоталамуса.

Брилль Г.Е. и Панина Н.П. указывают на то, что молекулярные механизмы, определяющие отклик организма на НИЛИ, весьма сложны и включают первичную активацию нескольких фоточувствительных молекул с последующей передачей фотосигнала по цепям внутриклеточного сопряжения [3]. Весьма существенно, что фотосигнал в той или иной форме поступает в клеточное ядро и достигает генетического аппарата.

Мы полагаем, что деструкция опухолевых клеток связана с тем, что под воздействием НИЛИ с длиной волны 460–475 нм происходит повышенное образование активных форм кислорода, которые стимулируют процессы пероксидации непосредственно в опухолевой

ткани, нарушая условия опухолевой прогрессии [5, 14, 22]. В итоге опухоль оказывается не в состоянии сдерживать усиленное свободнорадикальное окисление, продукты которого, повреждая митотическое веретено деления, не только затормаживают клеточную пролиферацию, но и приводят к очаговому некрозу опухолевой ткани.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод о том, что низкоинтенсивное лазерное излучение в диапазоне синего света в выбранных режимах воздействия способно влиять на прогрессию лимфосаркомы Плисса, стимулируя дистрофические и некротические изменения в опухолевых клетках. Преимуществом данного метода является его неинвазивность. Кроме того, данный способ воздействия на опухоль представляет собой монотерапию и не предполагает введения в организм экспериментальных животных каких-либо дополнительных веществ, что позволяет сделать вывод о возможности расширения с помощью данного способа арсенала действующих средств. Низкоинтенсивное лазерное излучение в диапазоне синего света, несомненно, представляет интерес не только в плане разработки новых подходов в экспериментальной онкологии, но и в качестве возможного дополнения к существующим методам лечения онкологических заболеваний.

Список литературы

1. *Автандилов Г.Г.* Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина. 1980. 216 с.
2. *Байбеков И.М., Касымов А.Х., Козлов В.И.* Морфологические основы низкоинтенсивной лазеротерапии. Ташкент. 1991. 223 с.

3. **Брилль Г.Е., Панина Н.П.** Влияние низкоинтенсивного лазерного облучения на генетический аппарат клетки: учебное пособие. Саратов. 2000. 86 с.
4. **Васильев Н.В., Тарасенко Т.И., Богдашин И.В., Полушина О.А.** Влияние лазерного излучения на некоторые показатели противоопухолевой резистентности и общего иммунитета // Лазеры в онкологии: Сборник научных трудов. 1987. 17 с.
5. **Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П.** Хемиллюминесценция клеток животных. М.: ВИНТИ. 1989. 170 с.
6. **Волкова О.В., Елецкий Ю.К.** Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. 1971. 272 с.
7. **Галоян А.А., Шахламов В.А., Кондакова Л.И. и др.** Анализ влияния нового нейросекреторного пролин-богатого полипептида гипоталамуса на морфологию и митотическую активность опухолевых клеток невриноом Гассерова узла крысы (электронно-микроскопические исследования). — URL: http://elib.sci.am/2001_3/12/12r.htm
8. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 1998. 459 с.
9. **Горьков В.А., Васильева Л.С.** Кинетический анализ роста лимфосаркомы Плисса // Вопросы онкологии. 1973. Том 19. № 7. С. 91–93.
10. **Димант И.Н., Ботвинников И.Я.** Энзиматические реакции в биомеханизме антибластического действия гелий-неонового лазера // Лазеры в онкологии: Сборник научных трудов. 1987. 8 с.
11. **Зарянов Б.Н., Цукерман И.Я., Гаман А.В. и др.** Использование излучения неповреждающей интенсивности лазера на парах меди в клинической онкологии и эксперименте // Лазеры в онкологии: Сборник научных трудов. 1987. 3 с.
12. **Инюшин В.М., Чекуров П.Р.** Биостимуляция лучом лазера и биоплазма. — Алма-Ата: Казахстан. 1975. 120 с.
13. **Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Корнеев А.А. и др.** Ответы на синий свет у человека // Бюллетень экспериментальной биологии. 2000. № 2. С. 217–221.
14. **Козлов Ю.П.** Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М.: МГУ. 1973. 175 с.
15. **Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К.** Применение индуцированной хемиллюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах // Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький. 1983. С. 179–183.
16. **Москвин С.В.** Лазерная терапия как современный этап развития гелиотерапии // Лазерная медицина. 1997. Т. 1. вып. 1. С. 45–49.
17. **Плисс Г.Б.** Онкологическая характеристика нового штамма лимфосаркомы крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1961. № 2. С. 95–99.
18. **Реброва О.Ю.** Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера. 2002. 312 с.
19. **Стефанов С.Б.** Окулярная вставка для полных стереологических измерений микроскопических объектов // Цитология. 1974. Т. 16. № 11. С. 1439–1442.
20. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в России и США / Под ред. **З.П. Софьиной, А.Б.**

Сыркина, А.Голдина и др. М.: Медицина. 1980. 295 с.

21. *Gitelman D.S.* Экспериментальные исследования противоопухолевой активности электроактивированно-

го раствора анолита (ЭВР-А). URL: <http://ikar.udm.ru/sb36-1.htm>

22. *Karu T.I.* Photobiology of low power laser therapy. Chur, L.: Harwood Acad. Publ. 1989.

Destruction of Pliss's lymphosarcoma cells after being treated by low intensity laser radiation in the range of dark blue light

K.V. Kulakova, T.G. Sherbatyuk, V.V. Chernov

In vivo experiments, carried out on rats, demonstrated a possibility of degenerative changes in Pliss's lymphosarcoma and tumor growth decrease under the influence of low-intensity laser radiation in the blue light range (460-475 nm wavelength).

Key words: Pliss's lymphosarcoma, low intensity laser radiation, karyorhexis.

Гистологическое изучение сравнительной эффективности раздельного применения остеоматериалов (наноструктурированных гидроксиапатита и β -трикальцийфосфатной керамики) и их комбинации с траумель С

Р.В. Мартиросян¹, Г.Д. Капанадзе², Е.В. Зорян³, А.Б. Шехтер³,
В.Н. Балин¹, М.А. Саркисян⁴, И.Н. Дорель¹

¹ — Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И.Пирогова, Минздравсоцразвития РФ, Москва

² — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

³ — Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Минздравсоцразвития РФ, Москва

⁴ — Московский государственный медико-стоматологический университет, Минздравсоцразвития РФ, Москва

Контактная информация: Мартиросян Роберт Владимирович MRV.SURG@yandex.ru

Проводили гистологическое изучение в динамике эффективности применения комбинации остеоматериалов с жидким раствором траумель С для заживления костных дефектов с целью оптимизации и ускорения физиологического и репаративного остеогенеза.

Ключевые слова: оптимизация физиологического и репаративного остеогенеза, остеоматериал, траумель С.

В практике хирурга-стоматолога большинство оперативных вмешательств осуществляются в области альвеолярных дуг челюстей (удаление зубов, цистэктомии, различные зубосохраняющие операции, имплантация, операции направленной регенерации тканей с целью увеличения объема костной ткани и др.), после которых образуются костные дефекты разного размера, в зависимости от объема необходимого хирургического вмешательства, исходя из данной клинической ситуации [4]. Костные дефекты по показаниям заполняются различными остеоматериалами ксеногенного и синтетического происхождения, для ускорения остеогенеза [7]. В современной хирургической стоматологии постоянно происходит поиск

новых и совершенствование существующих материалов и методов репаративного остеогенеза, направленных на улучшение и сокращение сроков заживления костных ран [3]. Совершенствование методов терапии воспалительных осложнений, возникающих после хирургических вмешательств, и создание прогнозируемой регенерации костной и мягких тканей в области оперативного вмешательства является актуальной проблемой в хирургической стоматологии [2].

Целью исследования является гистологическое изучение в динамике эффективности применения комбинации остеоматериалов с жидким раствором траумель С для заживления костных дефектов, что необхо-

димо для оптимизации и ускорения физиологического и репаративного остеогенеза.

Изучали в эксперименте на животных сравнительную эффективность раздельного применения остеоматериалов (наноструктурированных гидроксипатита и β -трикальцийфосфатной керамики) и при их комбинации с гомеопатическим комплексным препаратом траумель С [1].

Материалы и методы

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ) и в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Исследования выполнялись согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами (СОП) исследователя, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ РАМН.

В эксперименте использовали 6 самцов кроликов породы советская шиншилла в возрасте 6 мес., живой массой $4,5 \pm 0,2$ кг. Кролики содержались в индивидуальных клетках батарейного типа на решетчатых полах в виварии НЦБМТ РАМН. Для кормления использовали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для кроликов. Водопроводная очищенная

вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18–22°C и относительная влажность 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

В каждой группе материал для гистологического исследования забирали через 1 и 2 мес. Костные фрагменты альвеолярных дуг с участком дефекта фиксировались в нейтральном формалине, подвергались декальцинации с помощью препарата «Биодек», заливались в парафин, срезы толщиной 4–5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, просматривались на микроскопе Олимпус ВХ 51, фотографировались с помощью камеры Sony и программы Launch Cam_View.

Для заполнения костных дефектов в качестве остеоматериалов использовали синтетические, наноструктурированные гидроксипатит и β -трикальцийфосфатную керамику российского производства, которые, благодаря наноструктурности, обладают более выраженными остеоиндуктивными и остеоиндуктивными свойствами.

Применяли комплексный гомеопатический препарат Траумель С (использовали жидкую форму выпуска, т.к. она хорошо диффундирует в костную ткань в течение короткого промежутка времени). Препарат содержит 14 компонентов натурального происхождения, действующих на различные проявления воспалительного процесса [5], обладает синергическим действием, ускоряющим процесс выздоровления [6]. Содержит микроэлементы, обладает широким спектром фармакологического действия [2].

Из 6-ти животных было сформировано 3 группы, по 2 кролика в каждой груп-

пе. В качестве наркоза применяли ветеринарный препарат «Золетил 100», вводили в дозе 15 мг/кг в ушную вену (рис. 1, рис. 2). Под общей анестезией делался наружный разрез длиной 2 см в средней части нижней челюсти с одной стороны, отслаивались мягкие ткани (рис. 3). Шаровидной фрезой, при помощи хирургического физиодиспенсера, формировали костный округлый несквозной дефект диаметром 0,5 см и глубиной 3–4 мм.



Рис. 1. Обезболивание, подготовка к операции.

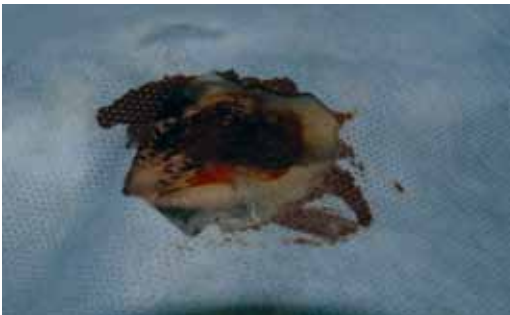


Рис. 2. Изоляция, антисептическая обработка операционного поля йодсодержащим р-ром.



Рис. 3. Обнажена средняя часть челюсти.

В зависимости от того, чем заполнялись костные дефекты, были сформированы 3 группы исследования, по 2 кролика в каждой группе.

I группа. Контрольная (заполнение кровяным сгустком) (рис. 4).



Рис. 4. Костный дефект заполнен сформированным кровяным сгустком.

II группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированных β -трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50 (рис. 5).

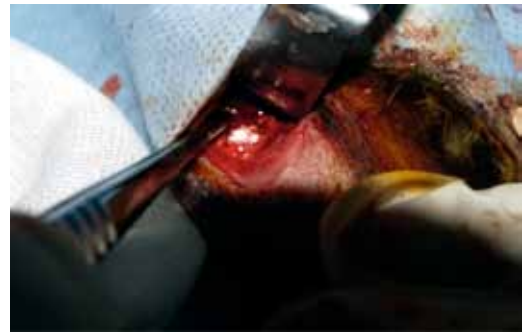


Рис. 5. Костный дефект заполнен гранулами гидроксиапатита и β -трикальцийфосфатной керамики.

III группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированных β -трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50, а также жидким раствором траумель С (рис. 6).



Рис. 6. Костный дефект заполнен гранулами гидроксиапатита, β -трикальцийфосфатной керамикой и Траумель С.

Результаты гистологического исследования

II группа. β -трикальцийфосфатная керамика+гидроксиапатит.

1-й мес. после операции

Костная полость заполнена, в основном, новообразованными созревающими костными балками и, в меньшей степени, грубоволокнистой соединительной тканью. Отмечаются также участки кровоизлияний (рис. 7).

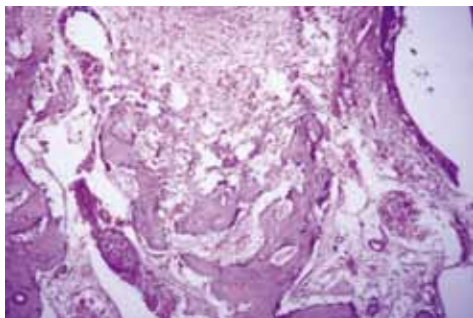


Рис. 7. Вверху — участки грубоволокнистой соединительной ткани, внизу — формирующиеся новообразованные костные балки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$.

2-й мес. после операции

Костный дефект, в основном, заполнен относительно зрелой новообразованной костной тканью, в которой костные балки компактизируются, но, в отличие от интактной кости, она богата клеточными элементами (остеоцитами).

В соединительной ткани на краю дефекта видны резко уменьшившиеся в размере гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой (рис. 8).

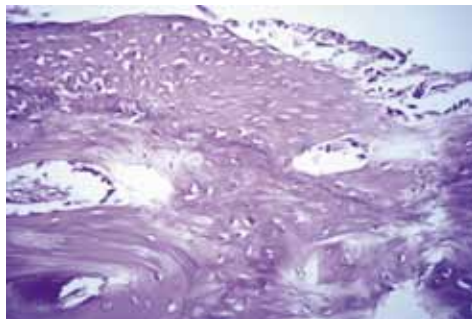


Рис. 8. Новообразованная компактизирующаяся костная ткань в дефекте с увеличенным количеством остеоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

III группа. β -трикальцийфосфатная керамика+гидроксиапатит+траумель С.

1-й мес. после операции

Костный дефект заполнен частично фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью, но, в основном, зрелой компактизирующейся костной тканью. В кости гранулы ГАП отсутствуют. В фиброзной ткани остаются гранулы, окружённые соединительнотканной капсулой (рис. 9).

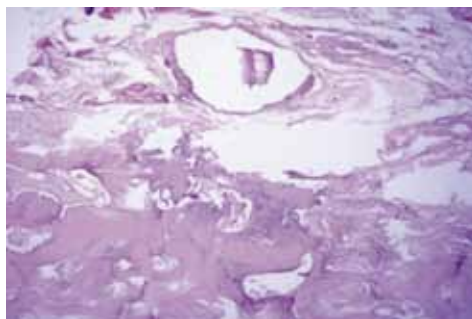


Рис. 9. Вверху — гранулы ГАП, видна лишь частично в полости, окружённой соединительнотканной капсулой. Внизу — созревающая и компактизирующаяся костная ткань. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$.

2-й мес. после операции

Большая часть полости замещена компактизирующейся зрелой костной тканью (рис. 10).

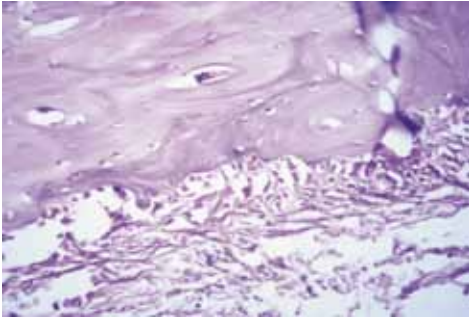


Рис. 10. Вверху — зрелая компактная костная ткань с типичной структурой гаверсовых каналов. Внизу — грубоволокнистая соединительная ткань. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

Выводы

Проведённые гистологические исследования показали, что сочетание наноструктурированных остеоматериалов (β -трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатита) с Траумель С (3 группа исследования) ускоряет остеогенез в дефекте кости как на 1-й, так и на 2-й мес. опыта, в сравнении с 1-ой контрольной группой (кровяной сгусток) и 2-ой группой (β -трикальцийфосфатная керамика и гидроксиапатит).

Список литературы

1. **Зорян Е.В.** Очерки по гомеопатии для стоматологов. М. Арнебия. 2005. 160 с.
2. **Зорян Е.В., Зорян А.В.** Гомеопатический метод лечения и возможность его использования в стоматологической практике // Клиническая стоматология. 2002. № 3. С. 48–52.
3. **Панин А.М.** Новое поколение остеопластических материалов (разработка, лабораторно-клиническое обоснование, клиническое внедрение): Дисс. докт. мед. наук. М. 2004. 162 с.
4. **Федурченко А.В.** Клинико-экспериментальное обоснование выбора остеопластического материала для замещения костных дефектов челюстей: Дис...канд. мед. наук. М. 2009. 68 с.
5. **Bahr R.** Sports medicine. BMJ 2001; 323 (7308): 328–331.
6. **Speed CA.** Corticosteroid injections in tendon lesions. BMJ 2001; 323 (7309): 382–386.
7. **Yeung R.W., Jin L.J., Pang M., Pow E.** Human histologic and electro-microscopic analysis with synthetic peptide enhanced hydroxyapatite in the maxillary sinus elevation procedure: a case report. Implant Dent. 2005 Sep;14(3):237–41.

Histologic study of comparative efficacy of separate application of osteomaterials (nanostructured hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics) and combination with Traumel C

R.V. Martirosyan, G.D. Kapanadze, E.V. Zoryan, A.B. Shehter, V.N. Balin, M.A. Sarkisyan, I.N. Dorel

The aim of the research was histologic study of efficacy in the dynamics, combination of osteomaterials with liquid solution of Traumel C, for healing of bone defect for the purpose of the optimization and acceleration of physiologic and reparative osteogenesis.

Key words: optimization of physiologic and reparative osteogenesis, osteomaterial, Traumel C.

Регистрация и анализ тремора с помощью детектора движения на основе веб-камеры

С.В. Фролов, А.В. Горбунов, А.Ю. Потлов

Тамбовский Государственный Технический Университет, Тамбов

*Контактная информация: д.т.н., профессор Фролов Сергей Владимирович
sergej.frolov@gmail.com*

В статье предлагается авторский метод визуализации тремора — «Видеовизуализация тремора», основанный на использовании веб-камеры и специальной компьютерной программы, с целью повышения эффективности диагностики и контроля над лечением ряда заболеваний центральной нервной системы.

Ключевые слова: визуализация, тремор, детектор движения, веб-камера, график интенсивности.

Тремор — это произвольные ритмичные движения конечностей, головы, языка и других частей тела, возникающие вследствие поочередного сокращения мышц-агонистов и мышц-антагонистов. Структуры нервной системы, ответственные за возникновение тремора, недостаточно изучены [1, 2]. Выделяют два основных вида тремора — физиологический и патологический. Физиологический тремор существует у каждого здорового человека. Его амплитуда столь мала, что он обычно незаметен. Патологический тремор — тремор, возникающий при различных заболеваниях, видимый невооруженным глазом и имеющий ряд клинических и электрофизиологических характеристик, отличных от физиологического тремора [6]. Патологический тремор в основном имеет место при наследственных или приобретенных заболеваниях центральной нервной системы: болезнь Паркинсона, мультисистемная атрофия, эссенциальный тремор и отравлениях, например, марганцем [3].

Таким образом, тремор служит основной и неотъемлемой частью многих

заболеваний, и его диагностика является важной задачей медицины. Современные методы регистрации параметров тремора основаны на преобразовании смещения объекта различного рода датчиками в выходной электрический сигнал, его предварительной обработке, преобразовании в форму, удобную для хранения и последующего математического анализа. Используются датчики, основанные на принципе тензометрии, где регистрируется прикладываемое усилие; емкостные датчики, регистрирующие изменение магнитного поля при движении конечности; акселерометрические датчики, основанные на регистрации ускорения движения. Однако методики регистрации движения с использованием датчиков имеют и свои достоинства, и недостатки. Большинство датчиков имеют проводную электрическую связь с оборудованием для регистрации сигнала, являются «контактными», т.е. крепятся на определенном участке тела, имеют определенные физические параметры (объем, вес), что не может не влиять на полученные результаты. Проблемным остается вопрос воспроизводимости данных, реги-

страция которых зависит от исходного положения конечности [2]. Высокая стоимость тоже является явным недостатком подобных методов.

Цель. Разработать максимально эффективный, удобный и недорогой метод регистрации и анализа тремора.

Материалы и методы

В основе нашего метода лежит тот факт, что тремор можно зафиксировать с помощью детектора движения, основанного на сравнении кадров путём вычитания из последующего кадра предыдущего [5].

При работе нами используется:

Веб-камера iSlim 321R;

Персональный компьютер с операционной системой Windows XP\ Vista\7.

Использование определённой веб-камеры объясняется тем, что для неё заранее известны разрешение, число кадров в секунду, интерфейс, системные требования и т.п.

Камера iSlim 321R при хорошей освещённости работает со скоростью 30 кадров в секунду [7] (т.е. одна секунда видео состоит из 30 изображений). Тремор, как и любое другое движение, определяется как разность между двумя соседними кадрами. Таким образом, последовательно сравнивая 30 изображений в секунду, можно фиксировать движения (в данном случае — тремор) до 30 раз в секунду, т.е. с частотой 30 Гц. Частоты патологического тремора редко превышают 12 Гц, а усиленного физиологического — 18 Гц. Таким образом, метод позволяет в полной мере регистрировать тремор и анализировать его частоту.

Не следует забывать, что тремор и любые движения, регистрируемые веб-камерой, — это не одно и то же, и поэто-

му необходим ряд стандартных условий для работы:

Фиксированное расстояние. Очевидно, что чем дальше от камеры объект, тем меньше пикселей на изображении он занимает. Поэтому его движения становятся менее значительными, и для адекватности метода необходимо выбрать четкое расстояние от руки пациента до веб-камеры. Наиболее оптимальным является расстояние 50 см.

Нулевой уклон. Большинство современных веб-камер (и в т.ч. iSlim 321R) имеют возможность регулирования угла обзора. Для точности измерений камера должна смотреть на руку в профиль с нулевым уклоном.

Адекватное расположение руки. Очевидно, что если в обзор камеры будет попадать рука вместе с одеждой, то работа программы будет неадекватной. Идеальным является следующее расположение руки в обзоре камеры: рука выровнена по ширине так, что кончики пальцев не достают 1–2 см до правого края обзорного изображения камеры, а по высоте находится посередине.

Специальный фон. Желательно использовать однородный белый, черный и т.п. фон. Ведь программа не может отличить пиксель с руки и с фона на их границе, если они абсолютно одинакового цвета. Если тест на тремор проводить на фоне очень близком по цвету с рукой человека, то движения будут фиксироваться хуже, в такой ситуации всё зависит от освещённости.

Порог тремора. Так как размеры изображения с камеры iSlim 321R - 640x480 точек, то получается, что в одном кадре 307200 точек, и, соответственно, можно зафиксировать даже небольшое движение (разница между двумя изображениями в 50 и более пикселей). Но если разли-

ца составляет всего несколько пикселей, то очевидно, что это ошибка, ведь размеры руки несоизмеримо больше, чем 1–2 точки. С другой стороны, если разница между 2-мя кадрами — 200000 точек, то очевидно, что это тоже какая-то ошибка: например, произошёл сдвиг самой камеры. Поэтому для визуализации тремора устанавливают минимальный и максимальный порог движения. Слишком слабые и слишком сильные движения отбрасываются как помехи.

Хорошая освещённость. Большинство современных веб-камер (в т.ч. iSlim 321R) автоматически настраивают количество кадров под освещённость от 8 (в полной темноте) до 30 (при средней и хорошей освещённости). Поэтому освещённость должна быть дневной — тогда количество кадров будет 30 в секунду, т.е. постоянным значением, вполне достаточным для нормальной работы.

Результаты и их обсуждение

На основе вышесказанного, авторами была предложена и реализована в виде компьютерной программы (рис. 1) специальная методика регистрации тремора — «Видеовизуализация тремора». В ка-

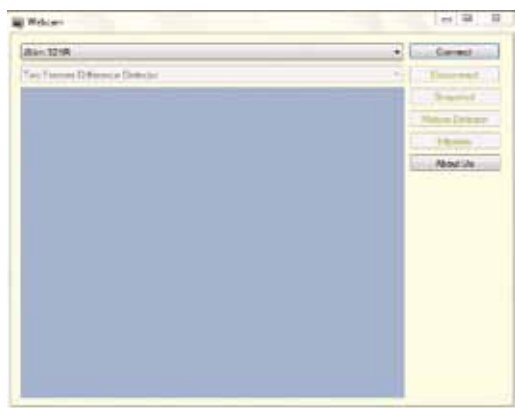


Рис. 1. Программа «Видеовизуализация тремора».

честве языка программирования использовался Microsoft Visual C# 2005 Express.

Для визуализации тремора пациенту предлагают пройти экспресс-тест. Он вытягивает руку и держит её так ровно, как сможет, в течение одной минуты, строго на расстоянии 50 см в центре обзора веб-камеры, на фоне, резко контрастирующем с рукой. Для визуализации движения (рис. 2) в течение экспресс-теста используют:

- выделение выбранным цветом;
- график интенсивности;
- рассчитываемая в реальном времени частота тремора.

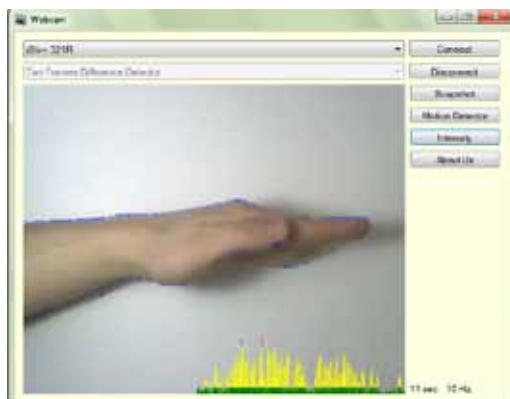


Рис. 2. Экспресс-тест тремора.

График интенсивности показывает в виде столбцов интенсивность тремора: чем выше столбец, тем больше была разница между двумя кадрами. Этот график строится в реальном времени. Низкая интенсивность тремора на нём указывается зелёным цветом, средняя — желтым и высокая — красным. Расчёт частоты тремора проводится ежесекундно, на основе данных с внутреннего таймера программы и данных по количеству колебаний со средней амплитудой.

Для удобства анализа экспресс-тест

сопровождается записью видео, необходимого для истории болезни.

Следует отметить, что данный метод прост и достаточно удобен в использовании. Компьютерная программа работает на обычных компьютерах с операционной системой Windows XP/Vista/7, программной платформой Microsoft.NET Framework версии 2.0 или выше и видекодеком DivX 3. При этом наш метод принципиально отличается от существующих на данный момент видеорегистрации тремора тем, что в нем оценивается движение самой руки, а не специального маркера, приклеенного на руку [4]. Таким образом, анализируется тремор всей части руки, попавшей в обзор камеры, а не только тремор маркера.

Выводы

В статье предложена авторская методика визуализации тремора, основанная на использовании компьютерной программы детектора движения, с целью повышения эффективности диагностики и лечения ряда заболеваний центральной нервной системы.

Список литературы

1. Веб-студия «б» Электронный медицинский справочник - «МоноМед».
2. *Горбунов А.В., Антонюк С.Д.* Варианты и аномалии развития артерий головного мозга в постнатальном онтогенезе человека по данным магнитно-резонансной ангиографии // «Вестник Тамбовского государственного университета». 2006. т. 11. Вып. 2. С. 174–176.
3. *Горбунов А.В.* Варианты развития артерий головного мозга человека и цереброваскулярные нарушения // Тамбов: Изд-во Першина Р.В. 2009.
4. *Лихачев С.А., Вацилин В.В., Дик С.К.* Тремор: феноменология и способы регистрации // Медицинский журнал: научно-практический рецензируемый журнал / учредитель: Белорусский государственный медицинский университет. 2010. № 2. С. 133–137.
5. <http://code.google.com/p/aforge/>
6. <http://society.parkinsonism.ru/?page=84>
7. <http://www.genius.ru/products.aspx?pnnum=20464>

Recording and analysis of tremor through motion detection based on the webcam

S.V. Frolov, A.V. Gorbunov, A.Yu. Potlov

The paper presents the author's method of visualization of the tremor — “Videovizualization of the tremor” based on the use of Webcams and special computer programs to improve the efficiency of diagnosis and control of the treatment of diseases of the central nervous system.

Key words: visualization, tremor, motion detection, webcam, the graph of the intensity.

Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения на вокализацию крыс в ультразвуке

Ю.В. Фокин

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Фокин Юрий Владимирович fokin-yuri@yandex.ru

Ультразвуковая вокализация крыс отражает различные психоэмоциональные состояния – как позитивные, так и негативные (тревога, страх, стресс). Преобладание спектральной мощности в диапазоне 20–30 кГц характеризует тревожность, а диапазон 35–45 кГц соответствует комфортному состоянию.

Пептиды и низкомолекулярные белки природного происхождения оказывают анксиолитическое, антифобическое, седативное действия на крыс. Эффект наблюдается уже после недели введения и сохраняется, по крайней мере, в течение 21 дня инъекций препаратов.

Предложенная модель исследования эмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуке может быть использована в доклинических испытаниях препаратов аналогичного действия.

Ключевые слова: низкомолекулярные природные белки и пептиды; ультразвуковая вокализация (УЗВ) крыс; спектральная плотность мощности УЗВ; тревожность; стресс; анксиолитический, антифобический и седативный эффекты; доклинические испытания.

В наших предыдущих работах по данной тематике мы обнаружили высокую информативность генерируемого крысами и другими лабораторными животными ультразвука в разных функциональных состояниях [11, 13, 14], а также при действии различных фармакологических препаратов, изменяющих функции основных нейромедиаторных систем мозга [6]. Однако было бы ошибочным не коснуться такой важной группы веществ как нейропептиды, которые, безусловно, должны оказывать влияние на высшую нервную систему и общее состояние животных.

Особый интерес представляет информация о том, что, по крайней мере, три важные группы лекарственных средств взаимодействуют не только с нейронами, но и с астроцитами. Известно, что к нейролептикам, барбитуратам и бензодиазепинам на клетках астроглии имеются

соответствующие рецепторы [4]. Полагают, что один из этих рецепторов обеспечивает анксиолитические эффекты бензодиазепинов, а другой — седативное действие [3, 8, 9, 10]. Резюмируя общие представления об унитропных рецепторах, следует в первую очередь выделить существование ряда рецепторных белков, с возможностью локализации рецепторов на клетках нейроглии [12]. Однако в настоящее время неизвестно, какой из типов бензодиазепиновых рецепторов связан с плазмолеммой астроцитов, и как они изменяются под влиянием нейролептиков, антидепрессантов и психостимуляторов [2].

Изучение физико-химических свойств, локализации в отделах мозга, клетках и субклеточных структурах нервной ткани, особенностей метаболизма нейроспецифических белков или сроков появления их в процессе онтогенеза позволяет прибли-

зиться к пониманию фундаментальных механизмов функционирования мозга. Установлена связь между наличием нейроспецифических белков с некоторыми патологическими состояниями организма, главным образом — с развитием невропсихических заболеваний [5, 1].

Цель исследования — изучить вокализацию крыс в ультразвуковом диапазоне на фоне действия пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения и по полученным данным оценить их влияние на психоэмоциональное состояние животных.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в НЦБМТ РАМН. Тестировались самки крыс линии WAG/GY в возрасте 3 мес., по 9 особей в каждой группе.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руковод-

ством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [7]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ РАМН.

Дизайн и организация исследования направлены на определение УЗВ-параметров и выявление их взаимосвязи с психоэмоциональным состоянием животных. Количество объектов, принимающих участие в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемого эффекта.

Крыс содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 5 особей. Животные соответствовали категории SPF. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма — стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18–22°C и относительная влажность 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Исследуемые вещества — препараты пептидного происхождения и низкомолекулярные белки, полученные из мозга крупных сельскохозяйственных животных и свиней, под кодовыми названиями «К», «М» и «Р» (молекулярная масса — не выше 50 кД), использовавшиеся отдельно и в комплексе с препаратом «G» (молекулярная масса — до 5 кД). Введение всех препаратов осуществлялось инъекционно, внутривентриально, еже-

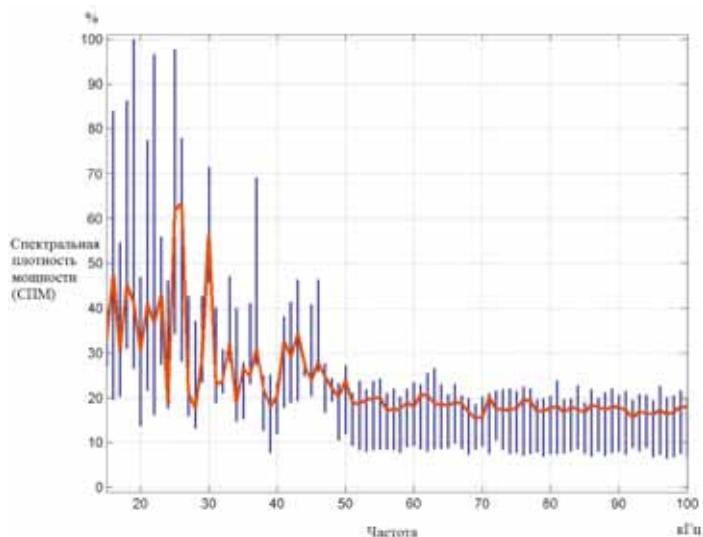


Рис. 1. УЗВ контрольной группы на 7-й день исследования. По оси абсцисс — частота (кГц), по оси ординат — спектральная плотность мощности (%). Красная кривая — медианы частот, синие линии — 95% доверительный интервал. Площадь под кривой — 1991 мм².

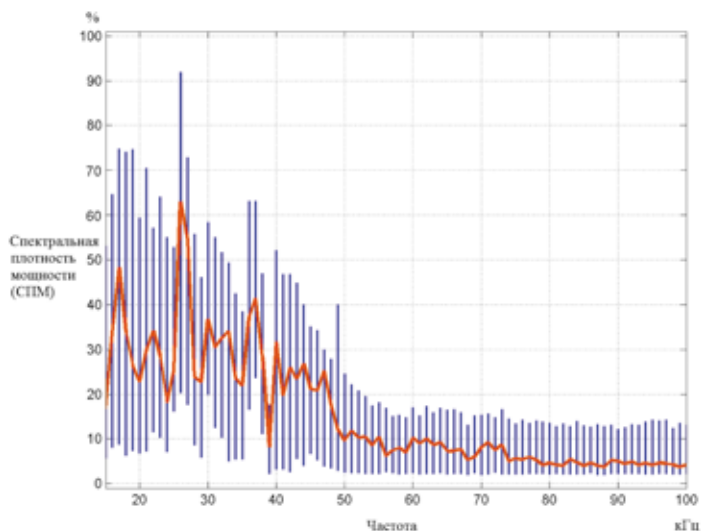


Рис. 2. УЗВ контрольной группы на 21-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 1. Площадь под кривой — 1320 мм².

дневно, в течение 21 суток. Контрольной группе животных в аналогичном режиме вводился физ. раствор.

Регистрация УЗВ. Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды). Микрофоны

устанавливались дистантно, на расстоянии 20–25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрацию ультразвуковых колебаний (в течение 30 мин) у каждого животного сначала осуществляли в состоянии по-

коя (фоновые данные), затем — через 7, 14 и 21 суток после введения препарата. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье — 2000 интервалов. В ходе анализа спектральную плотность мощности ультразвука (СПМ), излучаемого каждым животным, нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения изменяли пропорционально максимуму. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам. Ввиду того, что в разные периоды регистрации не все животные излучали ультразвуковые колебания (число N варьировалось), для оценки статистической значимости изменений по сравнению с фоновыми данными был применен анализ ANOVA для несвязанных групп. Учитывали только достоверные изменения СПМ ($p < 0,01$).

Перед исследованиями все животные подвергались стрессовым условиям посредством прохождения теста вынужденного плавания с грузом.

Результаты и их обсуждение

Анализ УЗВ крыс в фоновых измерениях обнаружил наибольшую мощность пиков в диапазоне 20–30 кГц, с максимумом в области ~25 кГц. Аналогичной картина УЗВ была в группе контроля — до начала эксперимента, на 7-й, 14-й и 21-й день, однако с каждой неделей на-

блюдалось возрастание мощности в сторону диапазона выше 30 кГц (рис. 1 и 2).

Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее [11], и говорят о том, что частотная полоса 20–30 кГц является показателем тревожности и беспокойства у крыс, а полоса 35–45 кГц — показателем комфортного состояния. Косвенно это подтверждает и смещение наибольшей мощности в сторону диапазона от 30 кГц и выше на протяжении эксперимента, что, вероятно, связано с привыканием животных к новым условиям клетки, в которой происходило исследование.

В опытных группах картина УЗВ оказалась отличной от контроля уже на первом этапе исследования, т. е. через 7 дней после введения препаратов. Например, на рис. 3 отчётливо видно, что наибольшая мощность (~70%) приходится на диапазон 37–42 кГц. СПМ в диапазоне 20–30 кГц существенно снижена по сравнению с фоновыми данными (почти на 30%).

Таким образом, снижение СПМ в «диапазоне тревоги» и повышение её в «диапазоне комфорта» позволяет судить о том, что данный препарат обладает анксиолитическим, антифобическим действием на крыс.

Довольно схожая картина УЗВ наблюдалась на данном этапе исследования в группе препарата «Р», вводимого в комплексе с «G» (рис. 4).

Из графика видно, что наибольшая мощность УЗВ также наблюдается в «диапазоне покоя» (на частоте около 33 кГц), а в «диапазоне тревоги» СПМ достоверно снижена почти на 50% по сравнению с фоновыми данными. В целом, действие препарата на данном этапе характеризует значительное снижение спектральной мощности по отношению к фону на всём анализируемом промежут-

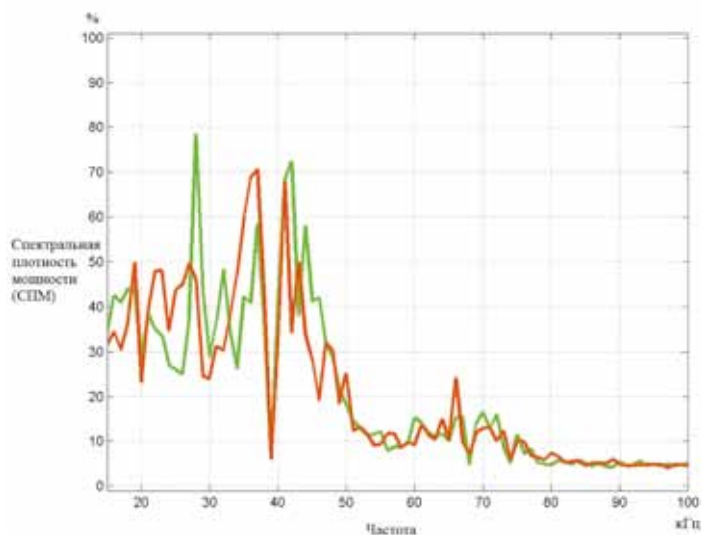


Рис. 3. УЗВ группы препарата «Р» на 7-й день исследования. По оси абсцисс — частота (кГц), по оси ординат — спектральная плотность мощности (%). Зелёная кривая — медианы частот в фоновых измерениях, красная кривая — медианы частот в опытной группе.

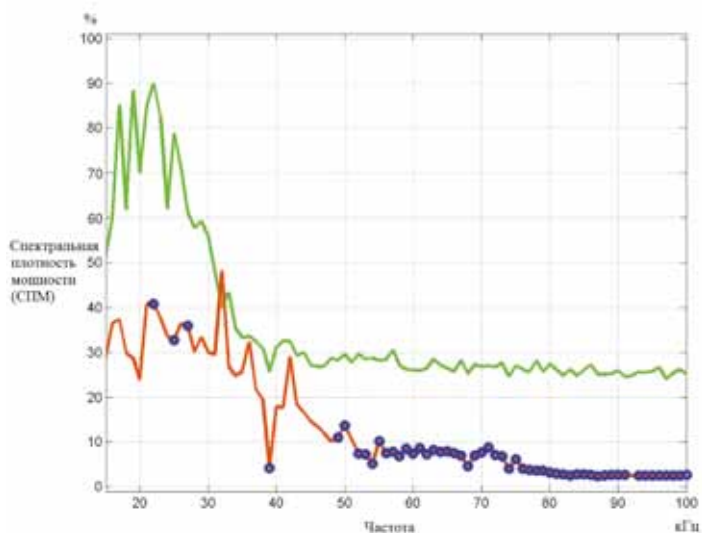


Рис. 4. УЗВ группы «Р+G» на 7-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 3. Синие кружочки — $p < 0,01$ (ANOVA).

ке (в диапазоне 50–100 кГц — разница достоверна). Вероятнее всего, данный эффект связан с расслаблением голосовых связок и миорелаксацией, что позволяет сделать вывод об успокаивающем, седативном действии комплекса «Р+G».

Аналогичные графики наблюдались в

исследовании УЗВ на 7-й день эксперимента и в остальных группах препаратов.

Исследование вокализации на 14-й день эксперимента явило, в целом, схожие, но более ярко выраженные результаты. Например, из рис. 5 видно, что основной, «главный» пик мощности (100%)

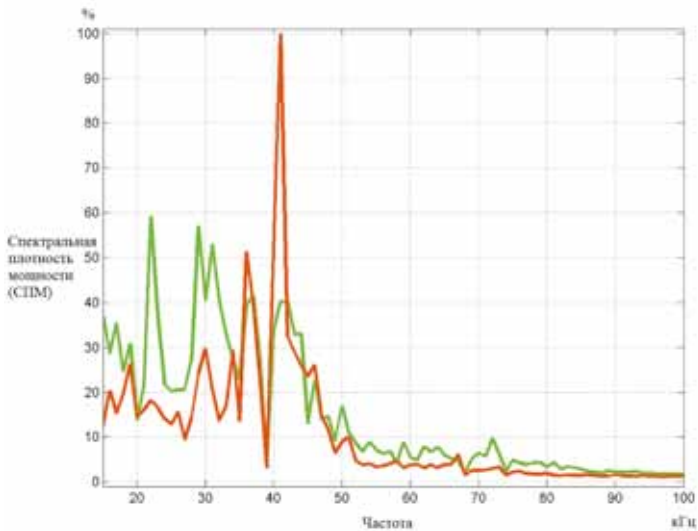


Рис. 5. УЗВ группы «М» на 14-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 3.

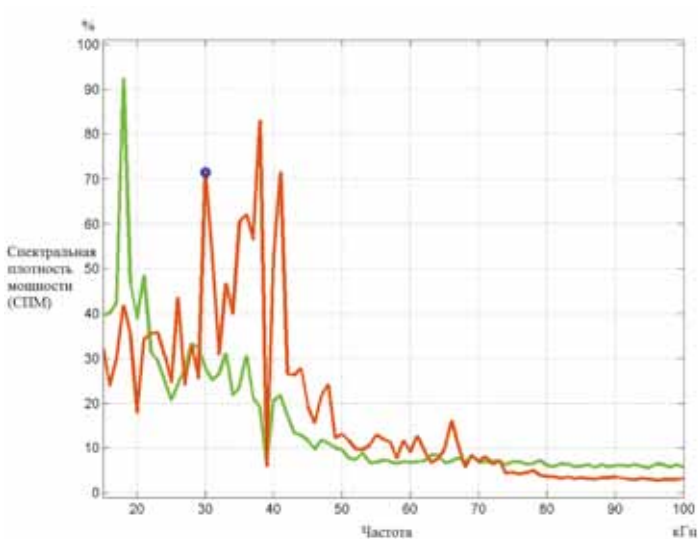


Рис. 6. УЗВ группы «K+G» на 21-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 3. Синие кружочки — $p < 0,01$ (ANOVA).

приходится на частоту ~ 41 кГц, а в диапазоне 20–30 кГц СПМ снижена по сравнению с фоном приблизительно на 40%.

Т.е. по истечении 14 дней введения данного препарата у крыс наблюдается анксиолитический, антифобический и частично седативный эффект. Схожая

картина УЗВ на данном этапе исследования наблюдалась и в остальных группах препаратов.

По истечении курса введения тестируемых веществ (на 21-й день эксперимента) было сделано заключительное исследование УЗВ, отразившее стабиль-

ность наблюдаемой тенденции. В доказательство этому приведён рис. 6.

Из рисунка видно, что основная мощность издаваемых сигналов приходится на диапазон 30–42 кГц, т.е. отражает позитивное, комфортное состояние животных. Следовательно, данный комплекс анализируемых препаратов на этом этапе исследования по-прежнему характеризуется антитревожным, противострессорным действием. Такое заключение применимо и ко всем остальным используемым в эксперименте фармакологическим веществам.

Выводы

1. Настоящей работой подтверждено, что УЗВ крыс отражает различные психоэмоциональные состояния — как отрицательные (тревога, страх, стресс), так и положительные (комфорт, спокойное бодрствование). Показателем тревожности является преобладание спектральной мощности в диапазоне 20–30 кГц, а показателем комфорта — диапазон около 35–45 кГц.

2. Пептиды и низкомолекулярные белки природного происхождения способны оказывать позитивное (анксиолитическое, антифобическое, седативное) действие на крыс, которое наблюдается уже после недели введения и сохраняется, по крайней мере, в течение 21 дня инъекций препаратов. Пик указанного действия приходится, вероятнее всего, на 14-е сутки курса введения.

3. Предложенная модель исследования эмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуке может быть использована в доклинических испытаниях препаратов аналогичного действия.

Список литературы

1. Биохимия мозга: Учеб. пособие / Под ред. **И.П. Ашмарина, П.В. Стукалова, Н.Д. Ещенко**. — СПб.: Издательство С.-Петербургского университета. 1999. 57 с.
2. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фарматоксикологии. М.: Изд-во ВПК. 2007. С. 249–250.
3. **Каркищенко Н.Н., Омельченко В.П.** Катехоламинергическая регуляция экспрессивного поведения // Катехоламинергические нейроны. М. Наука. 1979. 94 с.
4. **Каркищенко Н.Н., Омельченко В.П.** Моноаминергические механизмы интрацентральных процессов интеграции // Катехоламинергические нейроны. М. Наука. 1979. 75 с.
5. **Каркищенко Н.Н.** Психофармакологическое исследование некоторых элементов поведения и памяти животных и человека // Память и следовые процессы. Пущино. 1979. 71 с.
6. **Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Сахаров Д.С., Алимкина О.В.** Роль нейромедиаторных систем мозга в генерации ультразвуковой вокализации и её корреляции с поведением животных // Биомедицина. № 4. 2011. С. 8–18.
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. **Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева**. М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
8. **Каркищенко Н.Н.** Ультраструктурные изменения головного мозга под действием синтетических аналогов энкефалинов // Сб.: «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии». Томск. 1985. 62 с.

9. Каркищенко Н.Н., Солодилов В.В., Бардахчян Э.А. Ультрасруктурные основы биологического действия синтетических аналогов энкефалинов. Сообщение I. Роль окаймлённых везикул // Известия СКНЦ ВШ, Естественные науки. 1988. № 2. 122 с.
10. Каркищенко Н.Н., Солодилов В.В., Бардахчян Э.А. Ультрасруктурные основы биологического действия синтетических аналогов энкефалинов. Сообщение II. Роль субповерхностных цистерн // Известия СКНЦ ВШ, Естественные науки. 1988. № 2. 201 с.
11. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и её информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. 2011. № 1. С. 4–23.
12. Каркищенко Н.Н., Макляков Ю.С., Солодилов В.В., Спиглазов В.И. Фармакологический скрининг биологически активных соединений пептидной природы // Сб.: «Проблемы клинич. фармакологии». Ростов-н-Д. 1981. 9 с.
13. Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н. Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. 2010. № 5. С. 17–21.
14. Фокин Ю.В., Сахаров Д.С. Сравнительная характеристика и возможность использования наркотизирующих препаратов Золетил 100 и диэтиловый эфир при проведении операция по вживлению ЭЭГ-электродов на крысах // Биомедицина. 2011. № 1. С. 84–89.

Influence of peptides and low-molecular proteins of a natural origin on vocalization of rats in ultrasound

Yu.V. Fokin

Ultrasonic vocalization of rats reflects various psychoemotional conditions — both positive, and negative (alarm, fear, a stress). Prevalence of spectral power in a range of 20–30 kHz characterizes uneasiness, and the range of 35–45 kHz corresponds to a comfortable condition.

Peptides and low-molecular proteins of a natural origin render anxiolytical, antiphobical, sedative actions on rats. The effect is observed after a week of introduction and remains, at least, within 21 days of injections of preparations.

The offered model of research of an emotional condition on vocalization of rats in ultrasound can be used in nonclinical tests of preparations of similar action.

Key words: low-molecular natural proteins and peptides; ultrasonic vocalization (USV) of rats; spectral power density of USV; uneasiness; stress; anxiolytical, antiphobical and sedative effects; nonclinical tests.

Пептидная регуляция системного поведения крыс

Ю.В. Фокин

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Фокин Юрий Владимирович fokin-yuri@yandex.ru

Пептиды и низкомолекулярные белки природного происхождения влияют на системное поведение крыс. В течение эксперимента неподвижность планомерно уменьшается по сравнению с контролем, но возрастает «по отношению к себе». Несколько снижается длительность умывания на 7-й и 21-й день. Горизонтальная активность остаётся практически неизменной. Наблюдаемые эффекты (снижение длительности «замирания»), видимо, связаны с антитревожным действием препаратов, что подтвердило исследование ультразвуковой вокализации крыс на фоне введения тех же фармакологических средств.

Ключевые слова: низкомолекулярные природные белки и пептиды; системное поведение крыс; неподвижность (иммобилизация), горизонтальная активность (локомоции), вертикальная активность (стойки), умывание (груминг); анксиолитическое, антифобическое и седативное действие; корреляция с УЗВ.

В наших предыдущих работах мы оценивали поведение различных линий и популяций крыс [1], а также при действии фармакологических средств, изменяющих функции основных нейромедиаторных систем мозга [3]. Недавно нами также была исследована ещё одна не менее важная группа веществ — нейропептиды, которые обнаружили влияние на ультразвуковую вокализацию крыс [6]. Но в изучении механизмов действия фармакологических веществ необходимым компонентом является оценка их влияния на характеристики поведения животных.

Как правило, ориентировочно-исследовательская реакция крыс оценивается в тесте «Открытое поле», по горизонтальной и вертикальной двигательной активности, времени реакции обнюхивания. Эмоциональный статус животного оценивают по числу болюсов, уринаций, груминговой активности, времени выхода из центра и времени замирания [2]. Все эти показатели изменяются при введении в организм различных фармакологиче-

ских препаратов, а также при действии физических и социальных факторов [5, 6]. Следовательно, исключением не должны быть и низкомолекулярные белки природного происхождения, являющиеся объектом внимания нашей нынешней работы.

Цель исследования — изучить системное поведение крыс на фоне действия пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения и проанализировать их влияние на психоэмоциональное состояние животных.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в НЦБМТ РАМН. Тестировались самки крыс линии WAG/GY в возрасте 3 мес., по 9 особей в каждой группе.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ «Об обращении

лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [4]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ РАМН.

Дизайн и организация исследования направлены на исследование поведенческих форм животных и выявление их взаимосвязи с психоэмоциональным состоянием. Количество объектов, принимающих участие в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемого эффекта.

Крыс содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 5 особей. Животные соответствовали категории SPF. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма — стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей

среды: температура воздуха 18–22°C и относительная влажность 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Исследуемые вещества — препараты пептидного происхождения и низкомолекулярные белки, полученные из мозга крупных сельскохозяйственных животных и свиней, под кодовыми названиями «К», «М» и «Р» (молекулярная масса — не выше 50 кД), использовавшиеся отдельно и в комплексе с препаратом «G» (молекулярная масса — до 5 кД). Введение всех препаратов осуществлялось инъекционно, внутривентриально, ежедневно, в течение 21 суток. Контрольной группе животных в аналогичном режиме вводился физ. раствор.

Регистрация поведенческих компонентов происходила с применением компьютерной системы Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая позволяла вычислять длительность таких форм поведения как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность (иммобилизация), стойки (вертикальная активность), умывание (груминг). Кроме того, оценивалось время так называемых нераспознанных системой Laboras движений. Эпоха анализа составляла 30 мин. За каждый временной промежуток (через 7, 14 и 21 день введения препаратов) по каждому животному определяли процент каждой формы поведения. Полученные данные группировали в зависимости от тестируемого препарата, временного промежутка и формы поведения. Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ MATLAB путём вычисления медиан по всем животным, после чего строили гистограммы распределения форм поведения для каждого временного промежутка. Оценку

достоверности проводили с помощью указанных на гистограммах верхних и нижних границ доверительных интервалов, в качестве которых использовали значения 25-й и 75-й перцентилей соответственно.

Результаты и их обсуждение

Оценка элементарных форм поведения контрольной группы животных (рис. 1) показала снижение вертикальной активности (вставания на задние лапы) и возрастание времени неподвижности в период исследования. Уровень горизонтальной активности практически не менялся в течение эксперимента, а длительность умывания, снизившись к 14-му дню, снова повысилась к 21-му, почти до показателя 7-го дня с момента начала введения препаратов.

Исследование поведения опытных групп животных на 7-й день введения

(рис. 2) выявило следующие результаты:

1) показатели длительности иммобилизации, в среднем, оказались ниже, чем в контроле, и составили около 10% (наибольшее значение зафиксировано на препарате «Р»);

2) показатели вертикальной активности — аналогичны контролю (~23%);

3) длительность умывания — чуть ниже, чем в контроле (около 26 и 29% соответственно), но данной разницей можно пренебречь;

4) показатели горизонтальной активности соответствуют таковым в контроле (3–5%).

Результаты оценки поведения на фоне 14-ти дней введения препаратов представлены на рис. 3:

1) показатели длительности иммобилизации, в среднем, оказались ниже, чем

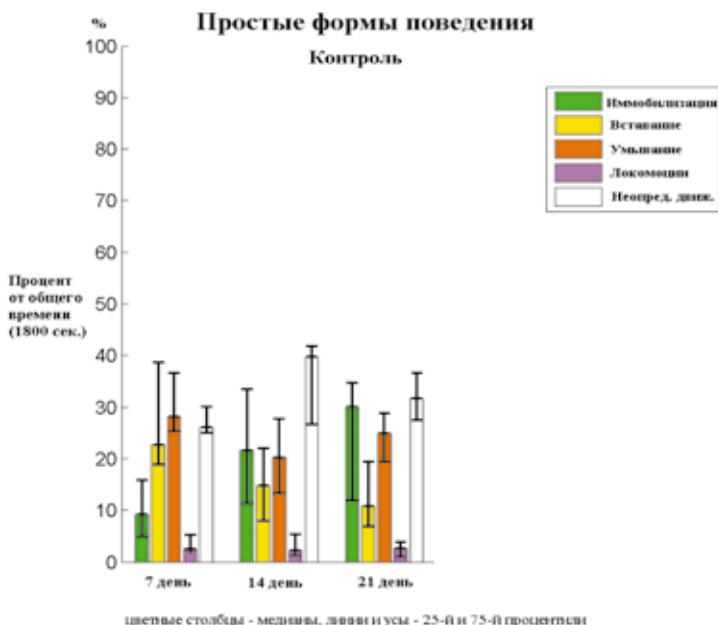


Рис. 1. Оценка системного поведения контрольной группы за весь период исследования. По оси абсцисс – временные интервалы исследования, внутри каждого – простые формы поведения: зелёный цвет – неподвижность, жёлтый – вертикальная активность, оранжевый – умывание, розовый – горизонтальная активность, белый – нераспознанные движения. По оси ординат – процент представленности каждой формы поведения за временной промежуток (900 сек.). Усы указывают на верхнюю и нижнюю границы доверительных интервалов (25-ый и 75-ый перцентили).

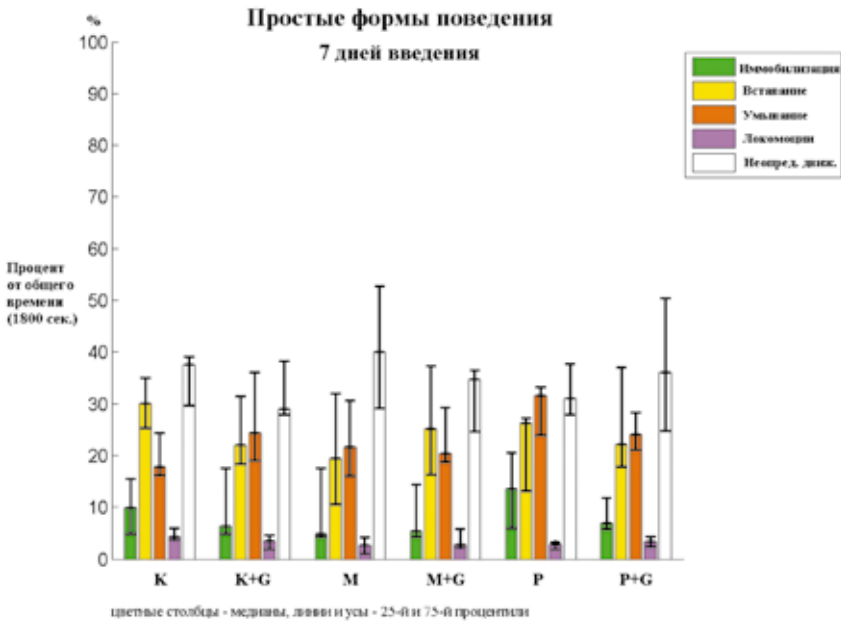


Рис. 2. Оценка системного поведения опытных групп на 7-й день исследования. По оси абсцисс – опытные группы, внутри каждой – простые формы поведения. Цвета и проч. обозначения – как на рис. 1.

в контроле (~16% по сравнению с ~23%), но повысились по сравнению с 7-м днём;

2) показатели вертикальной активности — выше, чем в контроле (~20% и ~16% соответственно), но чуть ниже, чем на 7-й день исследования;

3) длительность умывания — соответствует контрольным показателям (22–23%), но немного снижена по сравнению с 7-м днём;

4) горизонтальная активность — аналогична контролю и 7-му дню эксперимента.

Данные заключительного исследования системного поведения (на 21-й день введения) отражены на рис. 4:

1) показатели длительности иммобилизации — несколько меньше, в среднем, чем в контроле (~27% и ~32% соответственно), но существенно выше, чем на 7-й и 14-й дни;

2) вертикальная активность — анало-

гична контролю (13–14%), но несколько ниже, чем на 7-й и 14-й дни;

3) длительность умывания — значительно меньше, чем в контроле (~18% и ~27% соответственно), самый низкий показатель — в группе «Р»;

4) горизонтальная активность — приблизительно соответствует аналогичным значениям контрольной группы, 7-му и 14-му дням эксперимента.

Выводы

1. Пептиды и низкомолекулярные белки природного происхождения оказывают влияние на системное поведение животных.

2. В течение эксперимента происходит планомерное снижение длительности неподвижности (иммобилизации) по сравнению с контролем и возрастание данного показателя на каждом следующем этапе исследования по отношению к каждому

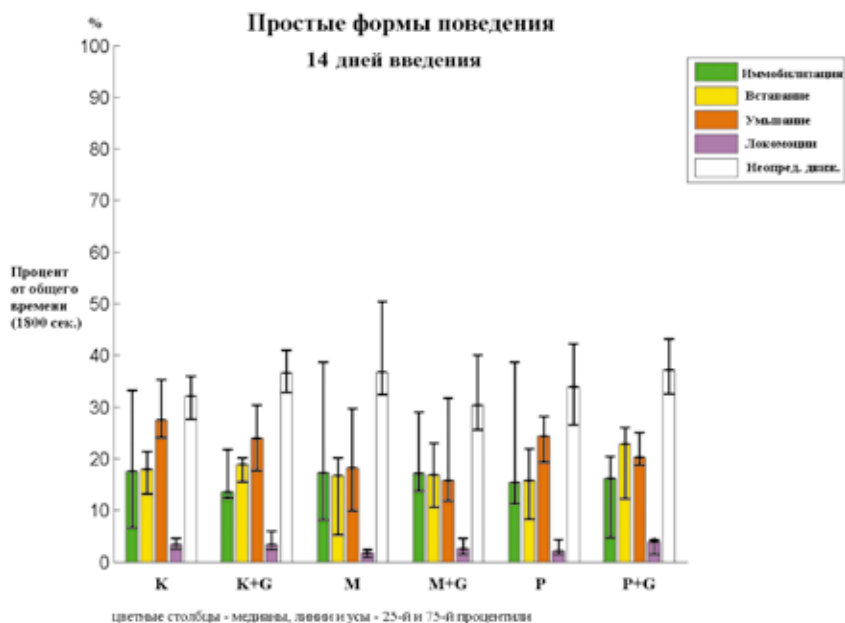


Рис. 3. Оценка системного поведения опытных групп на 14-й день исследования. Все обозначения – как на рис. 2.

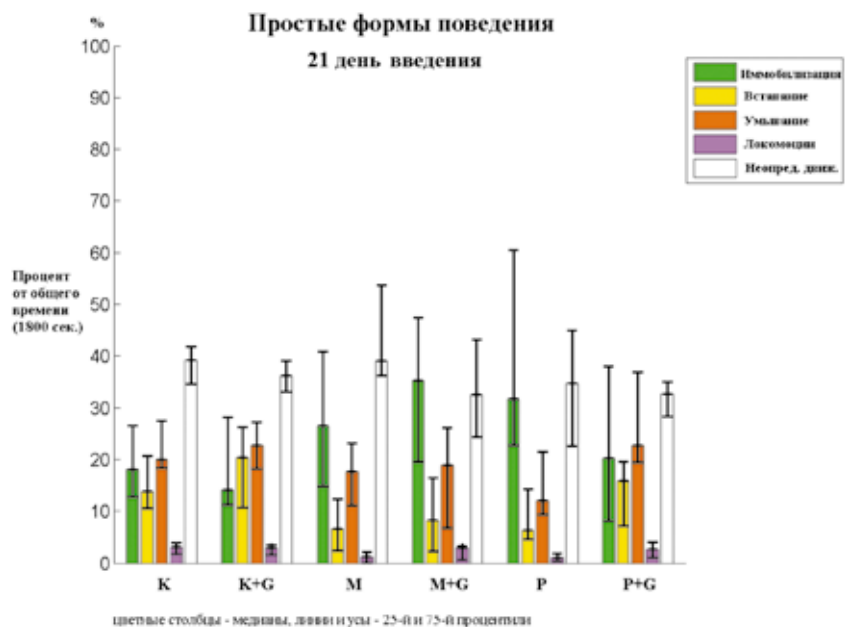


Рис. 4. Оценка системного поведения опытных групп на 21-й день исследования. Все обозначения – как на рис. 2.

предыдущему. Несколько снижается длительность умыывания на 7-й и 21-й день. Длительность горизонтальной активности (локомоций) остаётся неизменной на всём протяжении эксперимента.

3. Уменьшение иммобилизации (можно сказать — «замирания») крыс в течение эксперимента, вероятно, связано с антитревожным эффектом тестируемых фарм. средств, и данный результат согласуется с ранее проведённым исследованием УЗВ при действии тех же препаратов.

4. На фоне введения исследуемых веществ отмечено увеличение двигательной активности, что может трактоваться как результат повышения работоспособности и выносливости организма. Таким образом, данные препараты могут быть рекомендованы в качестве средств стимулирующего действия при работе в экстремальных ситуациях и в условиях высокой физической нагрузки.

Список литературы

1. *Беляев Д.А., Пекелис М.М., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х.* Анализ некоторых физиологических и этологических характеристик бесшёрстных крыс как новая модель биомедицин-
- ских исследований // Биомедицина. 2012. № 1. С. 29–36.
2. *Буреш Ян, Бурешова О., Хьюстон Дж.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Наука. 1991. 250 с.
3. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Сахаров Д.С., Алимкина О.В.* Роль нейромедиаторных систем мозга в генерации ультразвуковой вокализации и её корреляции с поведением животных // Биомедицина. 2011. № 4. С. 8–18.
4. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. *Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева.* М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
5. *Каркищенко Н.Н.* Фармакология процессов адаптации и переносимости предельных нагрузок в спорте и режимах работы «до отказа»: второй тайм для дженериков // Биомедицина. 2010. № 4. С. 6–23.
6. *Подковкин В.Г., Иванов Д.Г.* Влияние краткосрочной изоляции на поведение крыс в тесте «Открытое поле» // Успехи современного естествознания. 2009. № 6. С. 12–16.

Peptide regulation of rats system behaviour

Yu.V. Fokin

Peptides and low-molecular proteins of a natural origin influence system behaviour of rats. During experiment the immobility systematically decreases in comparison with control, but increases «in relation to itself». Duration of grooming for the 7th and 21st day a little decreases. Horizontal activity (locomotion) remains almost invariable. Observable effects (decrease in duration of «dying down») are probably connected with anxiolitical action of preparations that confirmed research of ultrasonic vocalization of rats against introduction of the same pharmacological means.

Key words: low-molecular natural proteins and peptides; system behaviour of rats; immobility, locomotion, rearing, grooming; anxiolitical, antiphobical and sedative effects; correlation with USV.



Исследование сравнительной фармакокинетики широко применяемых гиполипидемических препаратов из группы статинов

А.С. Сивков

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Минздравсоцразвития РФ, Москва

Контактная информация: к.м.н., доцент Сивков Андрей Сергеевич assivkov2010@mail.ru

У 54 здоровых испытуемых исследована сравнительная фармакокинетика широко применяемых гиполипидемических средств из группы статинов. Концентрацию Аторвастатина, активных метаболитов Симвастатина и Ловастатина определяли в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектором.

Ключевые слова: фармакокинетика, гиперлипидемия.

В последние годы убедительно показано, что гиполипидемическая терапия существенно снижает не только риск таких осложнений атеросклероза как коронарная смерть, инфаркт миокарда и стенокардия, но и общую смертность [1, 2, 9]. Это стало возможным благодаря применению нового класса гиполипидемических препаратов-статинов, которые подавляют активность 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А-(ГМГ-КоА)-редуктазы, регулирующей скорость синтеза ХС. Вследствие этого снижается пул ХС в клетках печени, увеличивается экспрессия рецепторов к липопротеидам низкой плотности (ЛНП) на поверхности гепатоцитов, стимулируется захват ими частиц ЛНП и липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП) из плазмы крови [1–3, 9, 12, 13].

Сравнительные данные по клинической фармакокинетике статинов представлены в работах [4, 5, 7]. Симвастатин и Ловастатин назначаются в виде неактивных лактоновых форм и в организме гидролизуются с превращением в активные метаболиты. Остальные статины изначально представляют собой фармакологически активные препараты.

Все статины быстро всасываются после приема внутрь (от 30 до 98%), причем максимальная концентрация в крови наступает в пределах 0,5–4 ч. Прием пищи не оказывает существенного влияния на всасывание Симвастатина, увеличивает концентрацию Ловастатина в крови и снижает биодоступность других статинов. Гиполипидемическая активность статинов не зависит существенно от приема их с вечерней пищей или на ночь. После всасывания из же-

лудочно-кишечного тракта до 85% препарата захватывается печенью и лишь 5% активных метаболитов попадает в системный кровоток. Гипохолестеринемический эффект появляется уже через 3 дня после начала лечения, когда устанавливается стабильная концентрация препарата в крови. Максимальный эффект достигается через 4–6 недель. Общий холестерин (ХС) плазмы крови возвращается к исходному уровню через 1 мес. после отмены максимальных доз препарата. Терапевтический эффект довольно стабилен, явлений тахифилаксии при длительном лечении не наблюдается.

Несмотря на уменьшение площади под кривой «концентрация-время» (AUC) при сочетании статинов и секвестрантов желчных кислот (холестирамина или колестипола), эффект такой комбинации препаратов не снижается. Комбинация статинов с холестираминам теоретически обоснована и дает выраженный гиполипидемический эффект даже у больных с тяжелой наследственной гиперхолестеринемией. Некоторые авторы рекомендуют принимать статины по меньшей мере через 4 ч после приема холестирамина или пищевых добавок с богатым содержанием нерастворимых волокон (пектины, овсяные отруби) во избежание фармакокинетического взаимодействия на этапе кишечного всасывания [8, 10, 11]. Не отмечено существенного влияния ощелачивающих препаратов и блокаторов H_2 -рецепторов, назначаемых при повышенной кислотности желудочного сока, на фармакокинетику Аторвастатина [10, 11]. За исключением Правастатина, все статины почти полностью связываются с белками плазмы — в основном, с альбумином. Поэтому воздействие

активных, не связанных форм статинов на периферические ткани чрезвычайно мало. Печеночная экстракция статинов — более 70%. Лекарственные взаимодействия, обусловленные вытеснением статинов из связи с белками, имеют ограниченное значение. Действие статинов развивается медленно, поэтому временные колебания концентрации несвязанных форм не имеют существенного значения [6, 14].

Целью настоящего исследования являлось проведение сравнительной фармакокинетики этих препаратов на здоровых добровольцах.

Материалы и методы

В качестве исследуемых гиполипидемических препаратов из группы статинов были Аторвастатин, Ловастатин, Симвастатин.

Для проведения сравнительной фармакокинетики в исследование было включено 54 здоровых испытуемых в возрасте от 18 до 45 лет, которые составили III группы. I группа (18 человек) принимала таблетки Липримар 20 мг («Пфайзер», Германия); II группа (18 человек) — Зокор 10 мг («Мерк Шарп Доум», Нидерланды); III группа — Мевакор 20 мг («Мерк Шарп Доум», Нидерланды).

Все добровольцы в период за 1–14 дней до исследования проходили углубленное врачебное исследование (сбор анамнеза, врачебный осмотр, биохимическое исследование крови, общий анализ крови и мочи).

Прием препаратов осуществлялся *per os* утром в 8:00 в дозе 80 мг (4 таблетки по 20 мг Липримара или Мевакора, 4 таблетки по 10 мг для Зокора). Отбор крови производился из кубитальной вены

в количестве 5 мл, в стеклянные гепаринизированные пробирки, до и спустя 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12 и 24 ч после приема изучаемых препаратов.

Концентрацию Липримара и активных метаболитов Зокора и Мевакора в плазме крови добровольцев определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программы Kinetica™2000 модельно-независимым методом. Рассчитывались следующие параметры: максимальная концентрация C_{max} — максимальное значение из измеренных; время ее достижения T_{max} — время, при котором измерялась мак-

симальная концентрация; площадь под фармакокинетической кривой — в пределах длительности наблюдений (AUC_{0-t}) рассчитывали методом трапеций; соотношение C_{max}/AUC_{0-t} .

Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны с помощью пакета Systatw5. Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение (Mean), среднее геометрическое значение (GMean), стандартное отклонение среднего результата (SD), стандартная ошибка (SE), коэффициент вариации (CV), медиана (Median). Достоверность различий оценивали при доверительной вероятности 95%.

Таблица 1

Динамика концентрации и фармакокинетические параметры Аторвастатина в плазме крови после приема препарата

Максимальная концентрация, нг/мл // Время определения макс. концентрации после приема препарата, ч	Показатель						
	Mean	GMean	SD	CV	Median	L-95%	Up-95%
1	26,3	25,1	8,2	31	25,6	-	-
1,5	26,7	25,8	7,1	27	26,05	-	-
2	24,8	23,9	7	28	23,95	-	-
4	19,5	18,7	5,5	28	18,6	-	-
6	16,2	15,7	4	25	16	-	-
8	13,3	12,9	3,3	25	12,7	-	-
12	6,6	-	5,2	78	8,5	-	-
Фармакокинетические параметры							
С _{max} , нг/мл	28,4	27,5	7,5	-	27,4	24,6	84,5
T _{max} , ч	1,3	1,3	0,3	-	1,5	1,2	1,5
AUC _{0-t} , нг*ч/мл	228,8	216	78,6	-	220,1	189,7	267,9
C _{max} /AUC _{0-t}	0,13	0,127	0,028	-	0,119	0,116	0,144

Таблица 2

Динамика концентрации метаболита Симвастатина в плазме крови и фармакокинетические параметры после приема препарата добровольцами II группы

Максимальная концентрация, нг/мл // Время определения макс. концентрации после приема препарата, ч	Показатель						
	Mean	GMean	SD	CV	Median	L-95%	Up-95%
1	9,6	-	7	73	10,9	-	-
1,5	16,9	-	7,1	42	18,1	-	-
2	20,8	20	5,9	29	20	-	-
4	17,3	16,6	5,2	30	17,8	-	-
6	11,6	11,1	3,5	31	12	-	-
8	7,6	-	3,7	48	8,3	-	-
12	3,6	-	3,7	104	3,9	-	-
Фармакокинетические параметры							
С _{max} , нг/мл	22,8	22,2	4,9	-	23	20,3	68,5
T _{max} , ч	2,3	2,2	0,8	-	2	1,9	2,7
AUC _{0-t} , нг*ч/мл	114	110,2	29,7	-	114,8	99,3	128,8
C _{max} /AUC _{0-t}	0,205	0,201	0,04	-	0,19	0,185	0,225

Результаты и их обсуждение

Динамика концентрации Аторвастатина в плазме крови и фармакокинетические параметры Аторвастатина после приема препарата, принимаемого добровольцами I группы, представлена в табл. 1 и на рис.

Как видно из представленных данных, после приема Аторвастатина концентрация препарата достигла максимума через 1,5 ч (26,71±7,1 нг/мл).

Фармакокинетические параметры после приема добровольцами таблеток Аторвастатина были:

C_{max} — 28,4±0,3 нг/мл; T — 1,3±0,3 ч;
AUC_{0-t} — 216,0±78,6 нг*ч/мл;

C_{max}/AUC_{0-T} — 0,130±0,028.

Динамика концентрации метаболита Симвастатина в плазме крови и фармакокинетические параметры после приема препарата добровольцами II группы представлена в табл. 2 и на рис.

После приема Симвастатина концентрация метаболита достигла максимума через 2 ч и составила 20,8±5,9 нг/мл. Фармакокинетические параметры после приема добровольцами таблеток Симвастатина были: C_{max} — 22,8±4,9 нг/мл; T — 2,3±0,8 ч; AUC_{0-t} — 114,0±29,7 нг*ч/мл; C_{max}/AUC_{0-T} — 0,205±0,040.

Динамика концентрации метаболита в плазме крови Ловастатина и фармакоки-

Динамика концентрации метаболита Ловастатина в плазме крови и фармакокинетические параметры после приема препарата добровольцами III группы

Максимальная концентрация, нг/мл // Время определения макс. концентрации после приема препарата, ч	Показатель						
	Mean	GMean	SD	CV	Median	L-95%	Up-95%
1	1	21,3	20,9	4,5	20,4	-	-
1,5	1,5	24,9	24,7	3,9	24,8	-	-
2	2	28	27,7	4,7	27,55	-	-
4	4	28,8	28,5	4,1	28,6	-	-
6	6	25,8	25,5	4,4	25,9	-	-
8	8	22,3	22	4,1	22,25	-	-
12	12	12	11,9	1,5	12,05	-	-
Фармакокинетические параметры							
C_{max} , нг/мл	29,6	29,3	4,5	-	29,45	26,8	32,4
T_{max} , ч	3,6	3,4	0,9	-	4	3	4,1
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	254,9	250,2	49,8	-	253	224,7	285,2
C_{max}/AUC_{0-t}	0,117	0,117	0,011	-	0,116	0,111	0,124

нетические параметры после приема препарата добровольцами II группы представлены в табл. 3 и на рис.

После приема Ловастатина концентрация метаболита достигла максимума через 4 ч и составила $28,8 \pm 4,1$ нг/мл. Фармакокинетические параметры после приема добровольцами таблеток Ловастатина были: C_{max} — $29,16 \pm 4,5$ нг/мл; T — $3,6 \pm 0,9$ ч; AUC_{0-t} — $254,9 \pm 49,8$ нг*ч/мл; C_{max}/AUC_{0-t} — $0,117 \pm 0,011$.

Выводы

Таким образом, при сравнительной оценке фармакокинетических параметров исследуемых препаратов уста-

новлено, что для Аторвастатина C_{max} составляет $28,4 \pm 0,3$ нг/мл, через T_{max} $1,3 \pm 0,3$ ч, при этом AUC_{0-t} составила $216,0 \pm 78,6$ нг*ч/мл. Для Симвастатина C_{max} составляет $22,8 \pm 4,9$ нг/мл, через T_{max} $2,3 \pm 0,8$ ч, при этом AUC_{0-t} составила $114,0 \pm 29,7$ нг*ч/мл. Для Ловастатина C_{max} составляет $29,16 \pm 4,5$ нг/мл, через T_{max} $3,6 \pm 0,9$ ч и при этом AUC_{0-t} составила $254,9 \pm 49,8$ нг*ч/мл.

Максимальные концентрации (C_{max}) исследуемых лекарственных препаратов практически не отличались друг от друга, в то время как наблюдалось различное максимальное время концентрации препаратов (T_{max}). Тем не менее, по дан-

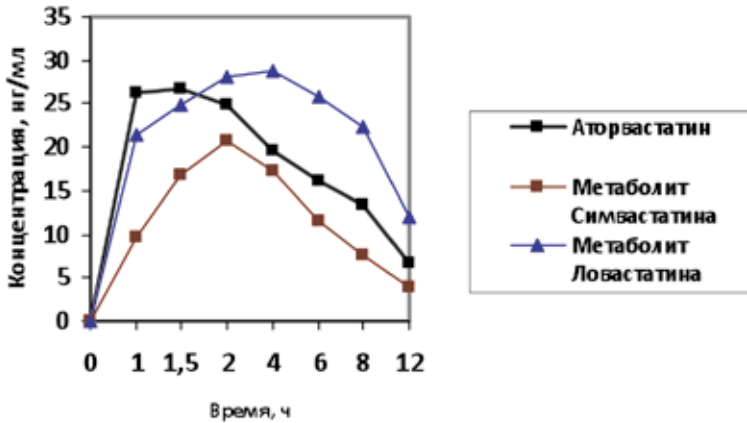


Рис. Концентрация препарата Аторвастатин и метаболитов Симвастатина и Ловастатина в плазме крови здоровых добровольцев.

ным авторов [10, 11], гиполипидемический эффект всех изучаемых препаратов у пациентов достаточно выраженный, с незначительным преобладанием его у препарата Аторвастатина.

Список литературы

1. **Кукес В.Г.** Клиническая фармакология. М: Гэотармед. 2008.
2. **Кукес В.Г.** Метаболизм лекарственных средств; клинико-фармакологические аспекты. М.: Рефарм. 2004.
3. **Ayanian J.Z., Fuchs C.S., Stone R.M.** Lovastatin and rhabdomyolysis. *Ann. Intern. Med.* 1988. 109: 682–683.
4. **Corsini A., Bellosa S., Baetta R. et al.** New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* 1999. 84: 413–428.
5. **Desager L.P., Horsmans Y.** Clinical pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 1996. 31: 348–341.
6. **Hamelin B.A., Turgeon J.** Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008. 19: 26–37.
7. **Kivisto K.T., Kantola T., Neuvonen P.J.** Different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fluvastatin and lovastatin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998. 46: 49–53.
8. **Lennernas H., Fager G.** Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 1997. 32: 403–425.
9. Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N. ENGL. J. MED.* 1998. 339: 1349–1357.
10. **Muck W.** Rational assessment of the interaction profile of atorvastatin supports its low propensity for drug interactions. *Drugs*, 1998, 56 (Suppl. 1): 15 – 23.
11. **Richter W.O., Jacob B.G., Schwandt P.** Interaction between fibre and lovas-

tatin. *Lancet*. 1991. 338: 706.

12. *Shepherd J., Cobble S.M., Ford J. et al.* Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 1995. 333: 1301–1307.

13. *Stern R.H., Gibson D.M., Whitfield L.R.* Cimetidine does not alter

atorvastatin pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1998. 53: 475–478.

14. *Wrighton S.A., Vandenbranden M., Ring B.J.* The human drug metabolizing cytochromes P450. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 1996. 24: 475–489.

Comparative study of the pharmacokinetics widely used lipid-lowering drugs of the statin

A.S. Sivkov

The comparative pharmacokinetics of commonly used lipid-lowering drugs of the statin was studied by 54 healthy persons. Concentration atorvastatin, the active metabolites of simvastatin and lovastatin in plasma by HPLC with UV-spectrophotometric detector were determined.

Key words: pharmacokinetics, hyperlipidemia.



Алгоритм построения проекций средних линий извилин головного мозга человека на поверхность скальпа

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

¹ – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

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

В статье описан алгоритм разработанной нами программы, находящий среднюю линию извилины по данным атласа Тайлераха и затем проецирующий полученную линию на поверхность скальпа. Кроме того, описанный в статье алгоритм позволяет определить толщину извилины в каждой точке средней линии.

Ключевые слова: извилины головного мозга, нейротерапия, транскраниальная нейростимуляция, стереотаксический атлас.

Методы нейростимуляции широко применяются в клинической практике для лечения различных заболеваний [1, 6]. Для осуществления нейростимуляции большую важность представляет задача наведения стимулирующих электродов на заданные структуры мозга — в частности, на извилины головного мозга. Для наиболее эффективной стимуляции ширина электродов также должна выбираться с учетом ширины извилины.

Решение данной задачи, кроме того, является важным промежуточным этапом верификации описанных нами в настоящей статье и ранее методов проецирования различных структур мозга на поверхность скальпа [2, 4]. Действительно, для такой верификации необходимо нанести на поверхность скальпа структуры головного мозга, которые будут затем

легко выделить на МРТ-изображении. К подобным структурам, в частности, относятся извилины коры головного мозга человека. Пометив в характерных точках извилин (например, в концах средних линий) контрастные маркеры, можно определить после МРТ-снимка отклонение расчетных и реальных проекций мозговых структур.

Целями данной работы являются: 1) построение проекций средних линий извилин головного мозга по данным атласа Тайлераха [7] на поверхность скальпа; 2) определение ширины извилины в каждой точке средней линии.

Метод расчета, предложенный нами в данной статье, позволяет рассчитать угловые координаты средней линии про-

екций извилин. Структурная схема алгоритма расчета представлена на рис.

Алгоритм нахождения границы выбранной извилины заключался в выборе таких точек по атласу Тайлераха, которые одновременно принадлежат заданной извилине и имеют хотя бы одну из 26 сопряженных точек, не принадлежащих выбираемой извилине. При этом перебор производился по всем точкам извилины.



Рис. Структурная схема алгоритма расчета.

Алгоритм построения нормали к поверхности извилины аналогичен описанному нами ранее алгоритму, применяемому для нахождения нормали к поверхности черепа [4].

Алгоритм проверки возможности сжатия определяет, на каком расстоянии от поверхности находится точка, полученная сдвигом на расстояние g вдоль построенной нормали к поверхности. Если расстояние менее чем $2/3 g$, то сжатие не происходит. Таким точкам присваивается индекс n — число, равное номеру шага алгоритма, на котором первый раз не произошло сжатие в этих точках. Эти точки — часть средней линии конечного результата работы алгоритма. Если после такой проверки мы не можем провести сжатие ни в одной из точек поверхности, то программа заканчивает работу.

Алгоритм сжатия области заключается в построении поля нормалей к по-

верхности границы и затем исключении точек, отстоящих на расстояние не более g от границы. Теоретически, оптимальное значение g определяется минимизацией среднего квадратичного отклонения реального расстояния сдвига границы множества по дискретной сетке от константы g при всевозможных углах расположения нормали в пространстве. С учетом результатов численных экспериментов, мы

приняли $g=2$ мм. Во время производства операции сжатия происходит проверка односвязности множества, т.е. того факта, что множество имеет ровно одну компоненту связности. Это реализовано в программе с использованием алгоритма поиска «в ширину» связанных компонентов ориентированного графа [5].

Результат расчета и его практическое применение

В результате расчета мы получили линии внутри извилин и множество индексов, каждый из которых соответствует точке на средней линии. Средняя линия характеризует геометрический «скелет» извилины как тела в пространстве, при этом она может разветвляться, т.е. представляет собой образ графа при непрерывном вложении в пространство. Количество шагов n , необходимых для локализации точки средней линии, ха-

рактизует «толщину» извилины в данной точке, которую с достаточной для практического применения точностью можно оценить по формуле:

$$D = 4 \cdot n \cdot r$$

В качестве системы координат средней линии удобно использовать угловые координаты, подробно описанные нами ранее [4]. Тогда результат будет в доста-

точной степени инвариантен к размерам головы [3, 4].

Для иллюстрации работы написанной нами программы приводим результаты расчета проекции средней линии нижней височной извилины (табл.). Вследствие значительного объема данных, результаты расчета для других извилин будут опубликованы нами препринтом НИЦ «Курчатовский институт».

Таблица

Результат расчета средней линии для нижней височной извилины

N точки	1-й угол	2-й угол	N точки	1-й угол	2-й угол	N точки	1-й угол	2-й угол	N точки	1-й угол	2-й угол
1	106	58	13	78	127	26	80	116	38	75	90
2	104	59	14	96	73	27	77	117	39	83	93
3	117	110	15	80	123	28	76	117	40	83	92
4	103	57	17	83	115	29	75	116	41	82	86
5	110	55	18	87	114	30	77	116	42	74	82
6	118	107	19	75	91	31	77	115	43	81	85
7	102	57	20	77	127	32	91	132	44	81	81
8	100	57	21	85	127	33	78	114	45	81	83
9	93	76	22	83	97	34	78	116	46	56	64
10	94	77	23	83	96	35	72	80	47	81	82
11	93	77	24	79	118	36	78	117	48	62	60
12	97	147	25	80	117	37	90	130	49	82	81

Список литературы

1. *Вальтер Х.* Функциональная визуализация в психиатрии и психотерапии. АСТ Астрель Полиграфиздат. М. 2004.
2. *Вартанов А.А., Чайванов Д.Б., Вартанов А.В.* Локализация на скальпе проекций поверхностных структур мозга по атласу Тайлераха. НИЦ «Курчатовский институт». М. 2011.
3. *Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Вартанов А.А.* Выбор оптимальной технологии локализации транскраниальных нейростимуляторов на скальпе человека. 2012. Биомедицина. № 1. С. 6–9.
4. *Каркищенко Н.Н., Вартанов А.А., Вартанов А.В., Чайванов Д.Б.* Локализация проекций полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа. 2011. Биомедицина. № 3. С. 40–45.
5. *Кормен Т.Х., Лейзерсон Ч.И., Рувест Р.Л., Штайн К.* Алгоритмы: построение и анализ. 2-е изд. М.: «Вильямс». 2006.
6. *Пинчук Д.Ю.* Транскраниальные микрополяризации головного мозга: клиника, физиология. СПб. «Человек». 2007. 496 с.
7. *Talairah J., Tournoux P.* Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain, George Thieme Verlag Stuttgart New York, Thieme Medical Publishers. Inc. New York. 1988.

Algorithm of convolutions medium-line projection of human brain on a scalp surface

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

In this paper we describe algorithm finding the medium-line of a convolution of human brain and projection this line on a scalp surface using Talairah's stereotaxic atlas. This algorithm can also find the thickness of a convolution in every point of medium line.

Key words: convolutions of a brain, neurotherapy, transcranial neurostimulation, stereotaxic atlas.