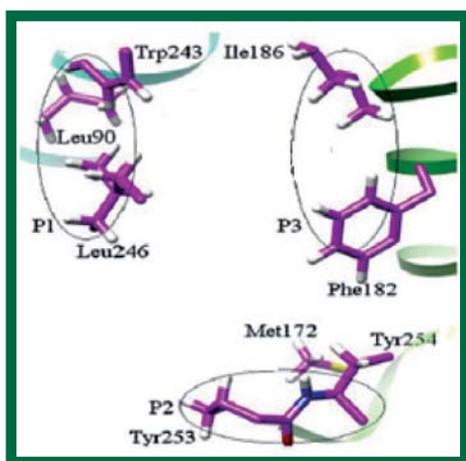


# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
ФМБА РОССИИ

## Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», которая будет проводиться 21-22 мая 2014 г. в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:

143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, владение 1,  
тел. (495) 561-52-64, факс 561-52-73  
e-mail: scbmt@yandex.ru

### Предполагаемые темы для формирования программы конференции:

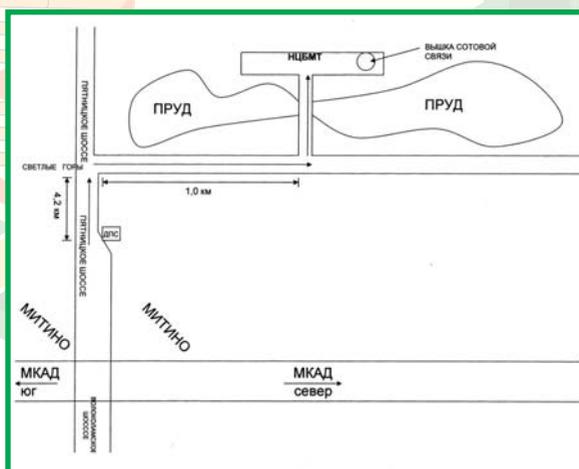
1. **Лабораторные животные** (модели животных в биомедицинских исследованиях, биоэтические нормы и принципы в экспериментальной работе, новые методы оценки функциональных состояний животных, лабораторные животные в современных фармакологических и токсикологических исследованиях, животные-модели и модели животных в сравнительных биологических исследованиях, новые технологии содержания, требования GLP).
2. **Альтернативное и биологическое моделирование в биомедицинских исследованиях** (биологические и клеточные, математические, физико-химические модели, животные-модели).
3. **Биомедицинская безопасность** (безопасность нанобиотехнологических средств, клеточных технологий, иммунобиологических препаратов, лекарственная токсикология и безопасность фармакологических средств и фармацевтических субстанций).
4. **Новые биомедицинские технологии.**
5. **Методы биомедицинских исследований.**
6. **Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.**
7. **Биомоделирование в интересах клинической фармакологии.**

Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин., на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов. Просьба к участникам выслать материалы докладов с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения, названия доклада, а также информации о необходимости бронирования места в гостинице до 10 апреля 2014 года.

### Схема проезда:

Адрес: 143442, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые горы, владение 1.  
Проезд по Пятницкому шоссе от станции метро «Тушинская» на автобусе 575 или маршрутном такси 575, 460, 479 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

На автомобиле:  
по Пятницкому шоссе (6 км от Кольцевой автодороги) до поворота на Светлые горы, мимо пруда, до магазина, после него поворот налево между двух прудов по дамбе прямо до Центра.



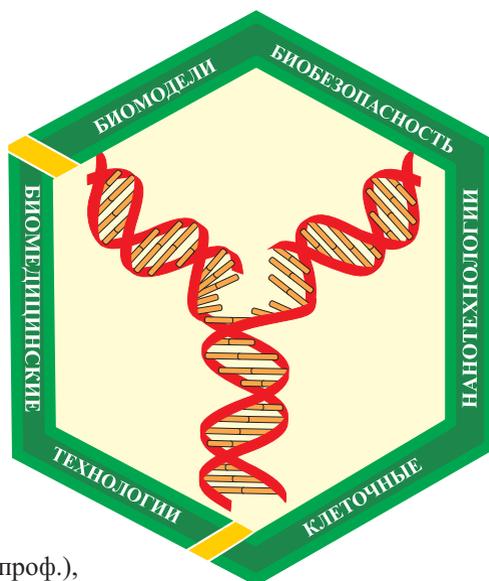
Научный журнал.

Основан в 2005 году ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

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 РАН

К.В.Анохин (чл.-корр. РАН), Е.Е.Ачкасов (д.м.н., проф.),  
И.А.Берзин (д.м.н., проф.), В.А.Быков (акад.РАН),  
А.М.Дыгай (акад. РАН), Г.Д.Капанадзе (д.б.н., зам. главного редактора),  
В.Н.Каркищенко (д.м.н., проф., зам. главного редактора), М.Ф.Киселев (д.б.н.),  
А.А.Кубатиев (акад. РАН), В.Г.Кукес (акад. РАН),  
Ю.С.Макляков (д.м.н., проф.), Е.Л.Матвеев (к.э.н., доц.),  
А.И.Мирошников (акад. РАН), А.Н.Мурашов (д.б.н., проф.),  
М.А.Пальцев (акад. РАН), А.С.Радилов (д.м.н., проф.),  
Г.В.Раменская (д.фарм.н., проф.), А.О.Ревякин (к.б.н.),  
В.Р.Рембовский (д.м.н., проф.), Х.Х.Семенов (к.б.н.),  
Н.В.Станкова (к.б.н., ответственный секретарь), Д.А.Сычев (д.м.н., проф.),  
В.П.Фисенко (акад. РАН), Д.Ф.Хритинин (чл.-корр. РАН),  
Б.Д.Цыганков (проф.), Д.Б.Чайванов (к.ф.-м.н.),  
Е.В.Ших (д.м.н., проф.)  
Е.Б.Шустов (д.м.н., проф., зам. главного редактора)

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:

143442, Московская область,  
Красногорский р-н, п. Светлые горы,  
владение 1  
Тел.: 8 (495) 561-52-64

Отпечатано в типографии «Айсинг»  
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18

Подписано в печать 11.03.2014 г.

Тираж 3 000 экз.

## Содержание

### НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

**Е.Л. Авенирова, П.А. Алексеева, Н.И. Баранова, М.С. Басс, А.В. Бурякина, Н.Н. Питухина, Е.В. Федорова**

Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства.....4

**М.Ю. Ярец, Д.Б. Чайванов, Н.В. Гавриш**

Особенности авторегуляторных способностей управления альфа-ритмом лиц с разным профилем латеральной организации, выявленные в биоуправляемом альфа-тренинге .....11

### РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

**П.А. Ворончихин, А.Н. Куликов, А.А. Карпов, Е.Г. Сухорукова, Д.Д. Ваулина, С.В. Оковитый, Д.Э. Коржевский, Е.Б. Шустов**

Моделирование кардиопульмонарной патологии у экспериментальных животных .....19

**З.Х. Дикинов, И.В. Евсегнеева, О.В. Калужин**

Моделирование увеоретинита и ретинопатии как инструмент изучения их иммунопатогенеза.....27

**О.В. Остапенко, Ю.Б. Чайковский**

Ультраструктурные изменения ациноцитов поджелудочной железы крыс в динамике развития врожденного гипотиреоза .....38

**Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.О. Ревякин**

Моделирование патологии печени рыб при помощи парацетамола .....45

**А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Касинская, О.И. Степанова, О.В. Баранова, А.Г. Киселев**

Моделирование лекарственного токсического гепатита на крысах.....52

### МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**И.Г. Капица, Л.Н. Неробкова, Т.А. Воронина**

ЭЭГ-корреляты ранней стадии болезни Паркинсона в эксперименте на мышах линии C57BL/6 .....54

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

**А.О. Ревякин, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Д.А. Ксенофонтов**

Взаимовлияния микроэлементов в крови лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении.....61

### КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**В.Г. Кукес, Н.Н. Иванец, Д.А. Сычев, Н.А. Псарева**

Фармакогенетика системы цитохрома р-450 и безопасность терапии антидепрессантами.....67

## Content

### NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

<b>E.L. Avenirova, P.A. Alekseeva, N.I. Baranova, M.S. Bass, A.V. Buryakina, N.N. Pitukhina, E.V. Fedorova</b> Molecular aspects of drug development: using methods of computer modeling to create new anti-ischemic agents.....	4
<b>M.Yu. Yarets, D.B. Chayvanov, N.V. Gavrish</b> Features of autoregulatory abilities of control an alpha rhythm by persons with a different profile of the lateral organization, revealed in biooperated alpha training.....	11

### RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

<b>P.A. Voronchikhin, A.V. Kulikov, A.A. Karpov, E.G. Sukhorukova, D.D. Vaulina, S.V. Okovityi, D.E. Korzhevskii, E.B. Shustov</b> Model of cardiopulmonary disease on rats.....	19
<b>Z.H. Dikinov, I.V. Evsegneeva, O.V. Kalyuzhin</b> Modelling of uveoretinitis and retinopathy as a tool for study of their immunopathogenesis.....	27
<b>O.V. Ostapenko, Yu.B. Chaikovskiy</b> Ultrastructural changes of rats pancreas acynocytes in the dynamics of congenital hypothyroidism development.....	38
<b>G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin</b> Modelling of the fishes liver pathology by paracetamol.....	45
<b>A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, N.V. Kasinskaya, O.I. Stepanova, O.V. Baranova, A.G. Kiselyov</b> Modeling of medicinal toxic hepatitis on rats.....	52

### BIOMEDICAL METHODS

<b>I.G. Kapitsa, L.N. Nerobkova, T.A. Voronina</b> EEG correlates of an early stage of a Parkinson illness in experiment on mice of the strain C57BL/6 .....	54
---	----

### LABORATORY ANIMALS

<b>A.O. Revyakin, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, D.A. Ksenofontov</b> Interferences of microcells in blood of laboratory animals at normal and excess food consumption.....	61
---	----

### CLINICAL RESEARCHES

<b>V.G. Kukes, N.N. Ivanets, D.A. Sychev, N.A. Psareva</b> Cytochrome P-450 pharmacogenetics and antidepressants treatment safety.....	67
---	----



## Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства

Е.Л. Авенирова, П.А. Алексеева, Н.И. Баранова, М.С. Басс,  
А.В. Бурякина, Н.Н. Питухина, Е.В. Федорова

ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Контактная информация: к.х.н. Федорова Елена Викторовна,  
[elena.fedorova@pharminnotech.com](mailto:elena.fedorova@pharminnotech.com)

С помощью компьютерных методов моделирования были проанализированы спектры биологической активности ряда производных малоновой кислоты с целью изыскания потенциально активных соединений в отношении ишемических повреждений миокарда. На основании полученных результатов была проведена оценка взаимодействия наиболее перспективного соединения (4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино] бензойной кислоты) с АЗаденозиновым рецептором методом молекулярного докинга. Установлено, что данное соединение может рассматриваться как перспективное противоишемическое средство.

**Ключевые слова:** молекулярное моделирование, виртуальный скрининг, направленное конструирование, противоишемические средства.

### Введение

В настоящее время изучение роли энергодефицита, гипоксии и оксидативного стресса в патогенезе различных заболеваний сердечно-сосудистой системы и возможности фармакологического воздействия на эти представляют значительный теоретический и практический интерес.

Основными направлениями фармакотерапии таких состояний могут стать:

- прямое воздействие на рецепторы сосудистого эндотелия с восстановлением его функции;

- предотвращение действия медиаторов, вызывающих повреждение миокарда и/или сосудов;
- повышение эффективности использования митохондриями дефицитного кислорода;
- снижение потребления кислорода тканями;
- увеличение образования АТФ в ходе гликолиза без увеличения продукции лактата;
- опосредованный эффект через влияние на факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний.

**Цель** работы состояла в изучении спектра биологической активности потенциальных противоишемических средств на основе производных малоновой кислоты методами молекулярного моделирования.

Исследования показали перспективность соединений малоновой кислоты для поиска новых противоишемических средств. Установлено, что производные малоновой кислоты снижают интенсивность окислительных процессов за счет ингибирования дыхательной функции митохондрий во всех звеньях дыхательной цепи. Это влияет на гликолиз и окислительное фосфорилирование и может применяться для защиты миокарда от повреждения в ранние сроки острой ишемии миокарда. Объектами нашего исследования служили ряд производных малоновой кислоты: её сложные эфиры и амиды.

### **Материалы и методы**

Для построения и оптимизации трехмерной компьютерной модели лигандов: 4-[(3-этокси-3-оксoproпаноил)амино] бензойной кислоты и аденозина, был выбран программный пакет ACD / ChemSketch 10.0. Алгоритм 3D оптимизации преобразовывает плоскую (2D) структуру, созданную в программе ACD / ChemSketch 10.0, в реалистичную 3D модель. Оптимизация основана на применении несколько измененных методов молекулярной механики, которые принимают во внимание длину химических связей, величину угла между атомами, внутреннее вращение и невалентные взаимодействия. Модификации включают незначительные упрощения потенциальных функций, а также дополнены эвристи-

ческими алгоритмами для неудачных стартовых конфигураций. Эти упрощения предназначены для увеличения скорости вычисления [6]. Для оптимизации ACD / ChemSketch 10.0 использует модификацию силового поля, подобную заложенной в программе CHARMM [2].

Молекулярный докинг проводили, используя быструю и гибкую программу предсказания белок-лигандных взаимодействий и высокопроизводительного виртуального скрининга FlexX. Критерием оценки взаимодействия между лигандом и белком использовалась так называемая «скоринг-функция» (оценочная функция), определяемая как энергия взаимодействия лиганда с рецептором. Скоринг-функция (Score) учитывает следующие слабые взаимодействия белок-лиганд: энергия Ван-дер-Ваальса, электростатическая энергия, энергия десольватации, энергия внутренних напряжений (деформации валентных связей), энергия водородных связей, энергия взаимодействия ароматических групп.

### **Результаты и их обсуждение**

Известно, что выраженную активность проявляет от 0,1 до 1% веществ, прошедших экспериментальный скрининг [1, 5]. Поэтому, прежде чем начать исследование биологической активности полученных нами соединений, мы предприняли попытку прогноза их вероятных видов активности с помощью компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), используя сервис PASS INet (<http://www.ibmc.msk.ru/PASS>), который позволяет любому зарегистрированному пользователю получать бесплатно прогноз PASS

через Интернет [1, 7]. Структурная формула исследуемого вещества направляется на прогноз в виде MOL-файла на анализ или вводится непосредственно в Интернет-браузере с использованием Marvin-апплета; после чего результат прогноза выдается на дисплей пользователя в течение нескольких минут.

Биологическая активность описывается в PASS качественным образом («активно»/«неактивно»), что позволяет интегрировать в обучающей выборке PASS информацию, собранную из множества различных источников. Структурная формула молекулы, для которой должен быть получен прогноз PASS, представлена в виде MOL-файла (для набора молекул – в виде SDF- файла). Прогнозируемый спектр биологической активности представлен в PASS в виде списка активностей с двумя вероятностями:  $P_a$  – «быть активным», и  $P_i$  – «быть неактивным», рассчитанными для каждой активности. Этот список упорядочен по убыванию разностей  $P_a - P_i$ ; таким образом, наиболее вероятные активности находятся в верхней части списка. Только активности с  $P_a > P_i$  считаются возможными для анализируемого соединения. Список может быть укорочен при любом пороговом значении, однако «по умолчанию» этим порогом является  $P_a > P_i$ .

Среди предсказанных видов биологической активности с порогом  $P_a > P_i$  для ряда наших соединений были выделены **лечение ишемии миокарда** и кардиопротективное действие. Пример определения видов биологической активности в программе PASS для одного из соединений представлен в табл. 1.

На основании данных, полученных с использованием программы PASS, было

выбрано наиболее перспективное соединение, представляющее собой смешанный сложный эфир-амидмалоновой кислоты, формула которого изображена на рис. 1.

Таблица 1  
Спектры биологической активности, прогнозируемые с помощью компьютерной программы PASS для 4-[(3-этоксипропанойл)амино]бензойной кислоты

$P_a$	$P_i$	Активности
0,600	0,187	Лечение ишемии миокарда
0,522	0,234	Кардиопротективное действие

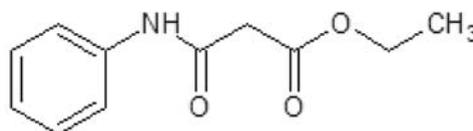


Рис. 1. Структурная формула 4-[(3-этоксипропанойл)амино]бензойной кислоты.

Более детальное изучение предсказанных активностей для данного соединения мы проводили методом молекулярного докинга, который является важным инструментом в изучении взаимодействий белок–лиганд. Докинг называется процесс «подстыковки» лиганда в лиганд-связывающий центр (ЛСЦ) рецептора с целью поиска как наиболее выгодных положений и ориентаций лигандов в ЛСЦ, так и выявления факторов, изменение которых может привести к улучшению лиганд-рецепторного взаимодействия. Поскольку определение пространственных структур комплексов лиганд–рецептор с помощью различных физико-химических методов для многих лигандов затруднено,

задачей докинга является предсказание связывания химических соединений с рецепторами на основании только виртуального эксперимента. Метод молекулярного докинга позволяет предсказывать пространственную структуру комплекса рецептор–лиганд и свободную энергию его образования, исходя из данных о пространственной структуре рецептора, известной с разрешением в несколько ангстрем (например, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа) и химической структуре лиганда. В качестве одной из мишеней для изучения возможных механизмов взаимодействия были выбраны аденозиновые рецепторы подтипа  $A_3$ .

Аденозин входит в состав многих эндогенных молекул (АТФ, НАД<sup>+</sup>, нуклеиновые кислоты). Кроме того, он играет важную роль в регуляции многих физиологических процессов. Действие аденозина на функцию сердца было обнаружено уже в 1929. Аденозин – это эндогенный пуриновый нуклеозид, состоящий из аденина, соединенного с рибозой (рибофуранозой)  $\beta$ - $N_9$ -гликозидной связью. Он является основным лигандом, который приводит к активации аденозиновых рецепторов всех четырех типов ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ). Однако, помимо аденозина, описан ряд иных лигандов (активаторов и ингибиторов), которые могут взаимодействовать с аденозиновыми рецепторами.

Аденозиновые рецепторы (АР) подтипа  $A_3$  регулируют различные физиологические и патофизиологические процессы, в том числе модуляцию мозговой и сердечной деятельности, ишемические повреждения, воспаления, внутриглазное давление, регулирования нормальных и опухолевых клеток роста, и иммуносупрессию. Также  $A_3$ -АР сти-

мулирует фосфолипазу С и активирует ионные кальциевые каналы. Известно, что антагонисты  $A_3$ -АР могут выступать в качестве потенциальных лекарственных средств для лечения ишемических и воспалительных заболеваний, в том числе при терапии и/или профилактике нарушений деятельности сердца, почек, дыхательной системы и центральной нервной системы.

Докинг 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино] бензойной кислоты и модельного соединения аденозина производился на теоретически созданную модель  $A_3$  рецептора (PDB код 1OEA), имеющуюся в свободном доступе на сайте молекулярного банка данных RCSB PDB ([www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)). Для построения теоретической модели в качестве шаблона была использована структура бычьего родопсина с разрешением 2,8 Å [3, 4], поскольку, как и большинство других трансмембранных белков,  $A_3$  аденозиновый рецептор плохо поддается кристаллизации, а, следовательно, точному структурному изучению методом рентгеноструктурного анализа.

Аденозиновый рецептор  $A_3$  относится к сопряженным с G-белком рецепторам и состоит из семи трансмембранных  $\alpha$ -спиралей, попарно соединенных тремя внешними и тремя внутриклеточными гидрофильными петлями (рис. 2).

Y-образный активный сайт  $A_3$  рецептора (рис. 3) состоит из трех гидрофобных доменов (P1, P2 и P3). Домен P1, главным образом, состоит из трех неполярных боковых цепей, а именно Leu90, Trp243 и Leu246, причем взаимодействие с Trp243 является наиболее значительным для активации рецептора [3, 4]. Домен P2 включает различные типы гидрофобных аминокислот:

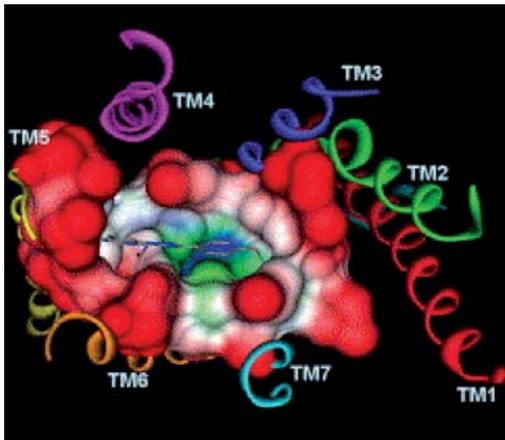


Рис. 2. Модель A<sub>3</sub> аденозинового рецептора.

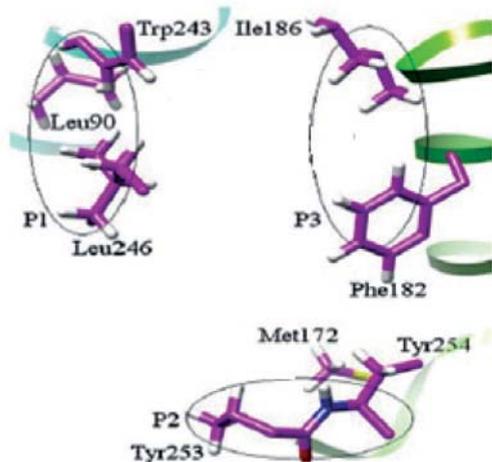


Рис. 3. Y-образный активный сайт A<sub>3</sub> рецептора.

Met172, Ile253 и Tyr254. Домен P3, в основном, включает остатки Phe182, Ile186 и Val178, взаимодействие с ними для разных лигандов-антагонистов может варьироваться.

Оценка того, с какими аминокислотами взаимодействуют антагонисты A<sub>3</sub>, показала, что в связывании могут принимать участие: TRP243, ILE186, LEU90, LEU246, MET172, TYR254, PHE182, ASN250, SER247, PHE168,

GLN167, HIS95, LEU244. Эффективные сайты связывания A<sub>3</sub> антагонистов с рецептором встречаются обычно в верхней области трансмембранных (TM) α-спиралей TM3, 5, 6 и 7 (рис. 4). Все антагонисты демонстрируют некоторые общие взаимодействия с рецептором, а именно образуют водородные связи с Asn250 и взаимодействуют с остатками Phe168 или Phe182.

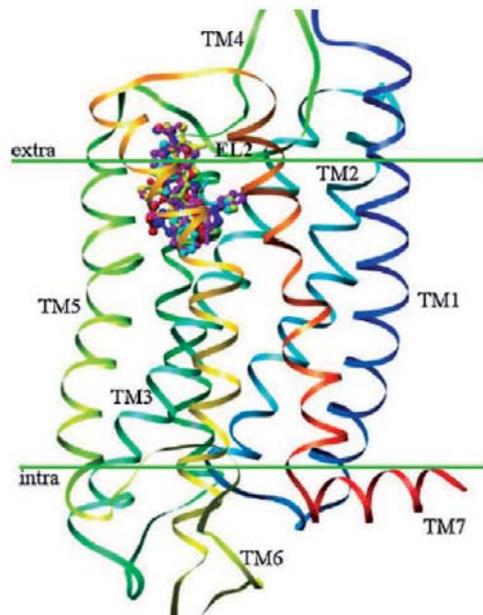
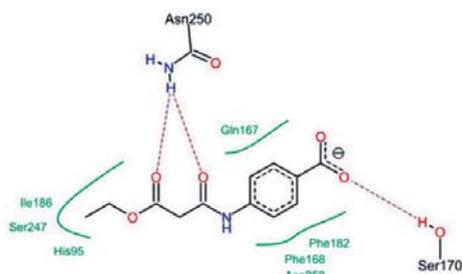


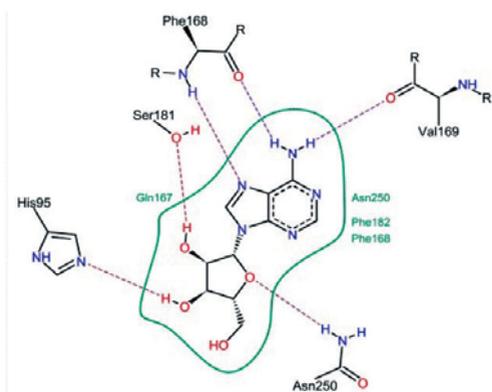
Рис. 4. Эффективный сайт связывания A<sub>3</sub> антагонистов с рецептором.

Анализ результатов докинга показал, что 4-[(3-этоксипропанойл)амино]бензойная кислота в домене P1 взаимодействует с LEU246 и TRP243, играющими значимую роль для активации рецептора; ILE186 и PHE182 домена P3, образуют водородные связи с ASN250, SER247, а также взаимодействуют с остатками HIS95 и PHE168 (домен P2). Таким образом, лиганд стабилизирован в трех доменах рецептора (P1, P2 и P3),

демонстрирующих общие взаимодействия известных ранее селективных антагонистов с рецептором.



Score = -18,7170 ккал/моль



Score = -21,5450 ккал/моль

Взаимодействия с аминокислотами	Исследуемое вещество	Аденозин
SER170	+	-
ILE186	+	-
SER247	+	-
PHE182	+	+
ASN250	+	+
PHE168	+	+
HIS95	+	+
SER181	-	+
GLN167	+	+
VAL169	-	+

## Выводы

Анализ литературных данных показал, что антагонисты А3-АР могут рассматриваться как перспективный класс веществ для лечения ишемических и гипоксических состояний. В частности, интерес представляют производные малоновой кислоты.

С помощью программы PASS нами были проанализированы спектры биологической активности ряда производных малоновой кислоты с целью изыскания потенциально активных в отношении ишемических повреждений миокарда. На основании полученных данных было выбрано наиболее перспективное соединение, представляющее собой смешанный сложный эфир-амид.

Нами была проведена оценка взаимодействия наиболее перспективного лиганда с А3-АР методом молекулярного докинга с использованием программного продукта FlexX. Было выявлено, что искомое соединение связывается с активным центром белка, в том числе с ключевыми аминокислотами PHE182, ASN250, PHE168, HIS95, GLN167, а также имеет удовлетворительное значение скоринг-функции.

Таким образом, на основании хемиоинформатического исследования было выявлено новое соединение (4-[(3-этоксипропан-3-илокси)амино] бензойная кислота), которое может рассматриваться как перспективное противоишемическое средство.

## Список литературы

1. *Ищенко П.О., Федорова Е.В., Яковлев И.П.* Фармация. 2013 (5). С. 41-43.
2. *Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S.* Karplus M. CHARMM –

- a program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations // J. Comp. Chem. 1983. № 4. P. 187-188.
3. **Gao Z.G., Kim S.K., et al.** Structural determinants of A3 adenosine receptor activation—nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary. 2002J. Med. Chem. 45. P. 4471-4484.
  4. **Gao, Z.G., et al.** Identification by site-directed mutagenesis of residues involved in ligand recognition and activation of the human A3 adenosine receptor. 2002J. Biol. Chem. 277. P. 19056-19063.
  5. **Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V.** Bioinformatics. 2000. 16 (8). 747 p.
  6. **Li Z., Wan H., Shi Y., Ouyang P.** Personal experience with four kinds of chemical structure drawing software: review on ChemDraw. ChemWindow. ISIS / Draw. and ChemSketch // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2004. Vol. 44. № 5. P. 1886-1890.
  7. **Sadyr A., Lagunin A., Filimonov D., Poroikov V.** SAR & QSAR Environ. Res. 2003. 14 (5-6) 339.

## Molecular aspects of drug development: using methods of computer modeling to create new anti-ischemic agents

**E.L. Avenirova, P.A. Alekseeva, N.I. Baranova, M.S. Bass, A.V. Buryakina, N.N. Pitukhina, E.V. Fedorova**

The spectra of biological activity of several derivatives of malonic acid were analyzed using computer modeling techniques with the aim to identify potentially active compounds against ischemic myocardial injury. The nature of interaction between the most promising compound based on the obtained results (4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl) amino] benzoic acid) and A3 adenosine receptor was evaluated using molecular docking. Thus this compound can be regarded as a perspective anti-ischemic agent.

**Key words:** molecular modeling, virtual screening, rational design, anti-ischemic agents.

## Особенности авторегуляторных способностей управления альфа-ритмом лиц с разным профилем латеральной организации, выявленные в биоуправляемом альфа-тренинге

М.Ю. Ярец<sup>1,2,3</sup>, Д.Б. Чайванов<sup>1,2</sup>, Н.В. Гавриш<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

<sup>2</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская обл.

<sup>3</sup> – ГОУ ВПО «Российский государственный гуманитарный университет», Москва

Контактная информация: к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, [chaivanov@yandex.ru](mailto:chaivanov@yandex.ru)

В настоящей работе проведено исследование связи авторегуляторных способностей управления альфа-ритмом с профилем латеральной организации у лиц творческих специальностей. На основании полученных результатов даны предложения по улучшению методов профессионального отбора.

**Ключевые слова:** биологическая обратная связь (БОС), произвольная саморегуляция, функциональное состояние, альфа-стимулирующий тренинг, латеральная организация.

### Введение

Тип полушарной латерализации является нейрофизиологической основой психофизиологической индивидуальности. Ряд исследований показывают взаимосвязь профиля латеральной организации и особенностей произвольной саморегуляции, которые, в основном, изучались с помощью опросных методов [1, 2, 5, 6]. Согласно концепции А.Р. Лурия, мозг при реализации любой психической функции работает как парный орган, при этом каждое полушарие вносит свой вклад в осуществлении той или иной деятельности. Для изучения межполушарной асимметрии используется подход Е.Д. Хомской, И.В. Ефимовой и В.А. Москвина, при котором изучение межполушарных взаимоотношений сводится к сопоставлению латеральных признаков и вариантов их

сочетаний (профиль латеральной организации – ПЛО) с особенностями реализации ряда психических процессов, в том числе, и с возможностями произвольного управления деятельностью [4]. При этом вариации латеральных профилей рассматриваются в системе «рука – ухо – глаз», где с «рукой» связан преимущественно моторный двигательный компонент поведенческого акта, а с «ухом» и «глазом» – воспринимающие и ориентирующие компоненты.

В настоящей работе проведено исследование авторегуляторных способностей управления альфа-ритмом лиц с разным профилем латеральной организации. При этом в качестве процедуры исследования авторегуляторных способностей выбран биоуправляемый по амплитуде альфа-ритма тренинг. Возможность использования альфа-тренинга как

диагностического инструмента, полезного при процедуре профотбора, была ранее продемонстрирована нами [8]. В более ранних работах показаны особенности саморегуляции альфа-ритма исключительно в затылочных областях при лево- и правополушарном доминировании и их связь с уровнем сенсорной чувствительности [3]. Согласно этим данным, «правополушарные» испытуемые демонстрируют более высокий уровень саморегуляции. В нашей работе эти особенности будут уточнены.

Традиционно альфа-модулирующие БОС-тренинги, наряду с медициной, используются в большом спорте, искусстве, педагогике как инструмент коррекции авторегуляторных способностей организма.

**Цель** исследования – выявить взаимосвязи между эффективностью биоправления альфа-ритмом и нейрофизиологическими предпосылками (профилем латеральной организации), а также предложить способы улучшения существующих технологий профессионального отбора на основании полученных данных.

### **Материалы и методы**

Для определения профиля латеральной организации испытуемых использовали опросник Аннетт, мануальные пробы (скрещивание рук, переплетение пальцев кистей, тест на апплодирование, теппинг-тест), дихотоническое прослушивание, пробу Розенбаха, тест «карта с дырой» [7].

Исследование особенностей произвольной саморегуляции проводили с использованием программно-аппаратного комплекса БОС «РЕАКОР». Показания ЭЭГ снимались с лобных, центральных,

теменных и затылочных электродов. В ходе анализа ЭЭГ оценивали средний индекс мощности альфа-ритма (диапазон 8-13 Гц) со всех отведений. Визуальная обратная связь подавалась через экран монитора, для аудиальной обратной связи использовали наушники. Особенности функционального состояния испытуемых до и после БОС-тренинга оценивали с помощью методики субъективного шкалирования «САН» (самочувствие, активность, настроение). В данной методике шкала «самочувствие» отражает физиологическое состояние организма; шкала «активность» характеризует актуальный потенциал жизнедеятельности; шкала «настроение» отражает благополучие внешних и внутренних условий на эмоциональном уровне.

Процедура исследования состояла из четырех блоков:

1) вначале оценивался ПЛО респондентов, далее испытуемым предъявлялась инструкция для повышения их мотивации, в которой кратко пояснялись все этапы тренинга БОС, а также задачи респондентов;

2) затем испытуемые заполняли опросник «САН» (3 мин);

3) далее каждая испытуемая участвовала в альфа-стимулирующем тренинге, специально созданном для данного эксперимента (25 мин). Альфа-стимулирующий тренинг – процедура, направленная на повышение альфа-активности с целью повышения устойчивости к стрессу, развития навыков достижения глубокой психической релаксации, улучшения творческих способностей и памяти.

4) после тренинга респонденты повторно заполняли «САН» (4 блок).

Длительность эксперимента составляла 55 мин.

Участницам эксперимента объясняли, что они не должны закрывать глаза в ходе эксперимента, так как это может привести к увеличению амплитуды альфа-ритма (преимущественно в затылочном отведении). Такое повышение амплитуды не будет связано с процессами, изучаемыми в эксперименте.

Предъявляемый альфа-стимулирующий тренинг состоял из следующих этапов:

*1-й этап* – «исходный фон» (измеряли вклад альфа-ритма в состоянии покоя). На мониторе перед испытуемыми – слайды с фотографиями природного ландшафта.

*2-й этап* – «пробный». Задача испытуемых – произвольно изменять свое функциональное состояние, добиваясь реакций релаксации и эмоционального напряжения попеременно и сравнивая свои субъективные ощущения с показателями альфа-ритма на экране). На мониторе – график, отражающий суммарную выраженность альфа-ритма.

*3-й этап* – «отдых» (испытуемые не выполняют никакого задания). На мониторе – слайды с фотографиями природного ландшафта (закаты солнца).

*4-й этап* – «релаксация со зрительной обратной связью». Задача испытуемых – произвольная релаксация с помощью зрительной обратной связи (картинка бабочки), необходимо добиться отсутствия шумовых пятен в изображении. На экране монитора – фото голубой бабочки. При снижении вклада альфа-ритма в регуляцию ниже допустимого порога на фото появляются розовые пятна.

*5-й этап* – «отдых». На мониторе – видеоролик (горы).

*6-й этап* – «эмоциональное напряжение со зрительной обратной связью». Задача испытуемых – произвольное эмоциональное напряжение с помощью зрительной обратной связи (картинка розы), необходимо добиться отсутствия шумовых пятен в изображении. На мониторе – фото розы. При увеличении вклада альфа-ритма в регуляцию выше допустимого порога на фото становится все более мозаичным.

*7-й этап* – «отдых». На мониторе – слайды с фотографиями водоемов (море).

*8-й этап* – «релаксация с аудиальной обратной связью». Задача испытуемых – произвольная релаксация с помощью аудиальной обратной связи через наушники (композиция «Silent night», альбом «Peace of Earth», исполнитель Kitaro), необходимо добиться отсутствия шумов мелодии. На мониторе – фоновый рисунок рабочего стола компьютера. В наушниках – музыкальная композиция. При понижении вклада альфа-ритма в регуляцию ниже допустимого порога в мелодии появляются шумы.

*9-й этап* – «отдых». На мониторе – слайды с фотографиями водоемов (водопады).

*10-й этап* – «эмоциональное напряжение аудиальной обратной связью». Задача испытуемых – произвольное эмоциональное напряжение с помощью аудиальной обратной связи через наушники (композиция из альбома «Infinity», исполнитель ERA), необходимо добиться отсутствия шумов мелодии. На мониторе – фоновый рисунок рабочего стола компьютера. В наушниках – музыкальная композиция. При увеличении вклада альфа-ритма в регуляцию выше допустимого порога в мелодии появляются шумы.

11-й этап – «итоговый фон» (измеряли вклад альфа-ритма в состоянии покоя). На мониторе – фото природного ландшафта.

Перед каждым этапом тренинга на экране монитора появлялась письменная инструкция. Для исключения эффекта прогрессии были созданы 4 варианта тренинга (менялись местами этапы на релаксацию и эмоциональное напряжение, а также типы обратной связи). Испытуемых распределяли по разным вариантам тренинга с помощью процедуры блоковой рандомизации. Успешность выполнения задания на произвольную саморегуляцию функционального состояния зависела от преодоления пороговых значений альфа-ритма, которые выставлялись автоматически для каждой испытуемой в отдельности. В зависимости от типа задания (увеличить вклад альфа-ритма по сравнению с исходным значением (релаксация) или, напротив, снизить его (эмоциональное напряжение)), порог успешности представлял собой среднее квадратичное отклонение от значения среднего индекса мощности альфа-ритма на этапе «исходный фон». Процедура исследования позволяет выявить особенности произвольной саморегуляции (релаксации и эмоционального напряжения) в зависимости от ведущего полушария головного мозга.

Различия между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни для зависимых и независимых выборок.

*Описание выборки.* В исследовании приняли участие 25 девушек в возрасте от 19 до 23 лет, все – студентки высших учебных заведений, без диагностированных хронических заболеваний, из

них 14 «правополушарных» и 11 – «левополушарных».

### **Результаты и их обсуждение**

В затылочном и центральном отведениях значимых корреляций между стадией эксперимента и амплитудой альфа-ритма обнаружено не было. Отсутствие корреляции в затылочном отведении свидетельствует о том, что испытуемые не закрывали глаза в ходе эксперимента, и о том, что переключение внимания со зрительного на звуковой стимул не приводило к ослаблению возбуждения зрительного канала восприятия настолько, что его можно было бы приравнять к закрытию глаз. Отсутствие значимых корреляций амплитуды альфа-ритма с этапом тренинга в центральном отведении свидетельствует о незначимом изменении напряжения мускулатуры в ходе исследования и незначимом изменении активности кинестетического восприятия. Таким образом, можно говорить о корректности постановки эксперимента.

В теменном отведении, в сравнении с этапом «исходный фон», на этапе «эмоциональное напряжение со зрительной обратной связью» зафиксировано достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение вклада альфа-ритма в регуляцию (рис. 1). В этом же отведении вклад альфа-ритма на этапе «релаксация с аудиальной обратной связью» в сравнении с этапом «исходный фон» значимо выше. Обнаружены также достоверные различия между этапами «релаксация со зрительной обратной связью» и «релаксация с аудиальной обратной связью» в обозначенном ранее отведении. В последнем вклад альфа-ритма в регуляцию значимо выше.

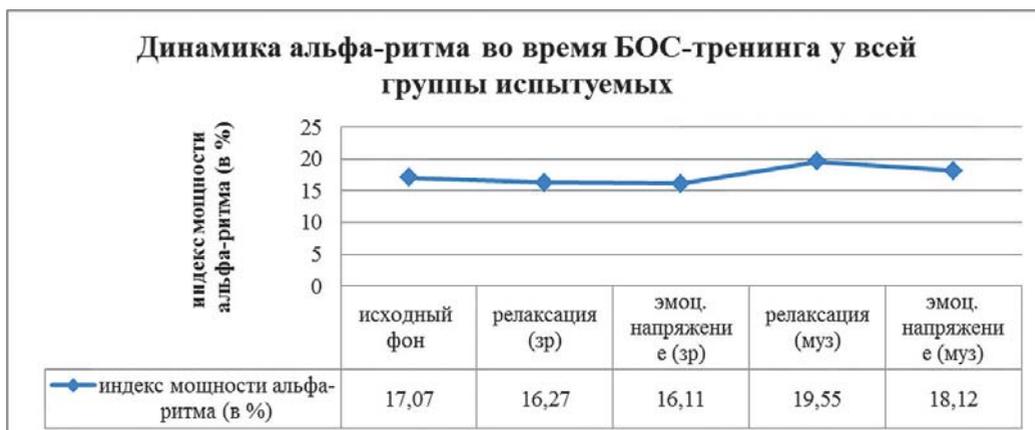


Рис. 1. Индекс мощности альфа-ритма на этапах тренинга у всей группы испытуемых в теменном отведении.

Известно, что возбуждение и движение глаз уменьшают амплитуду альфа-ритма в теменном отведении, а торможение, напротив, увеличивает амплитуду альфа-ритма. При выполнении задания на релаксацию по зрительному образу активация движения глаз вносит несколько больший вклад, чем собственно торможение. Это и приводит к незначительному падению амплитуды альфа-ритма. В прочих этапах, как и следовало ожидать, релаксация приводит к увеличению амплитуды альфа-ритма, а возбуждение, напротив, вызывает его уменьшение.

При анализе данных по группам правополушарных и левополушарных была выявлена достоверная ( $p < 0,05$ ) разница во фронтальном отведении F3-A1 на этапе «эмоциональное напряжение со зрительной обратной связью»: у «правополушарных» испытуемых вклад альфа-ритма в регуляцию на данном этапе значимо выше, чем у «левополушарных» (индекс мощности альфа-ритма составляет 14,38 и 10,08% соответственно). Остальные значимые различия наблю-

даются только в теменном отведении P3-A1 (рис. 2).

На этапе «исходный фон» мы можем наблюдать значимые различия между группами: у «правополушарных» испытуемых вклад альфа-ритма в регуляцию выше, чем у «левополушарных». На этапе «релаксация со зрительной обратной связью» «правополушарные» также демонстрируют более высокую альфа-активность, чем «левополушарные», однако у обеих групп индекс мощности альфа-ритма стал ниже. Относительный спад показателей индекса мощности альфа-ритма у «правополушарных» на данном этапе в сравнении с показателями этой группы на этапе «исходный фон» составляет -3,77. «Левополушарные» демонстрируют относительное уменьшение данного показателя, составляющее -2,68.

На этапе «эмоциональное напряжение со зрительной обратной связью» альфа-активность у «правополушарных» респондентов значимо выше, чем у «левополушарных». Наблюдается относительный спад показателей индекса

мощности альфа-ритма у обеих групп (-4,8 и -1,4 по сравнению с показателями на этапе «исходный фон»).

На этапе «релаксация с аудиальной обратной связью», напротив, наблюдается относительное увеличение показателей вклада альфа-ритма в регуляцию: +2 у «правополушарных» и +10,7 – у «левополушарных», в сравнении с эта-

пом «исходный фон». При этом «правополушарные» респонденты, как и ранее, демонстрируют более высокую альфа-активность по сравнению с «левополушарными».

По результатам САН до предъявления тренинга обе группы значительно различаются по уровню самочувствия (как физической составляющей текущего со-

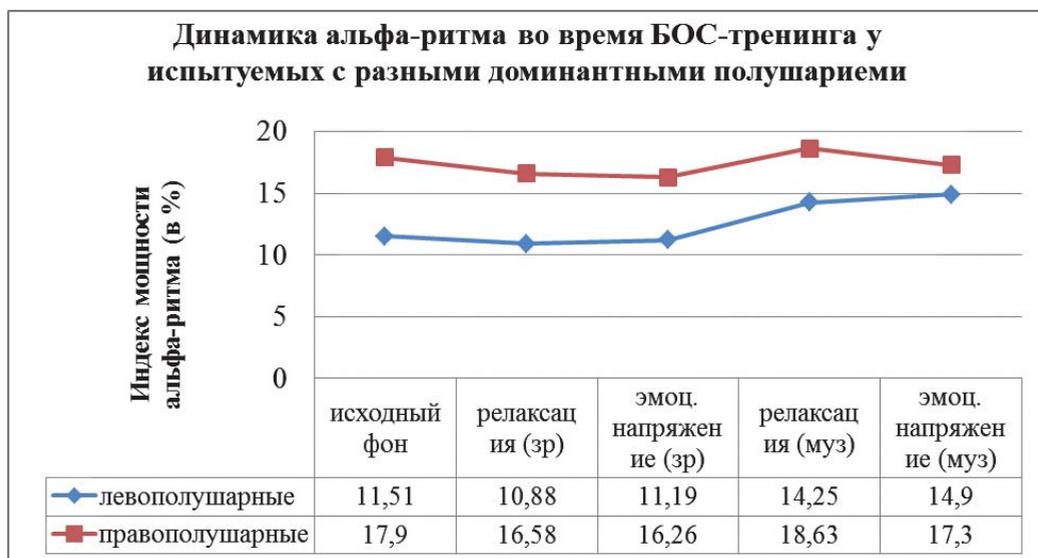


Рис. 2. Различия между группами по индексу мощности альфа-ритма на этапах тренинга в теменном отведении P3-A1.

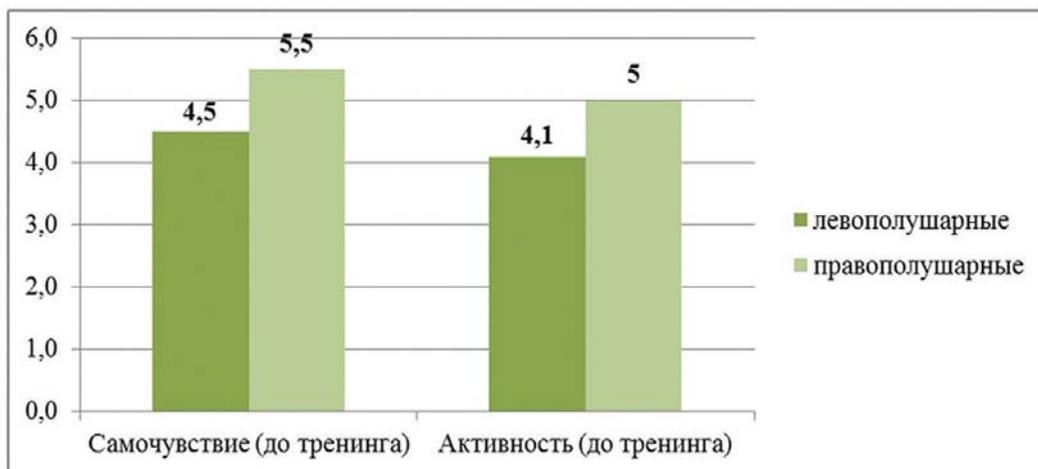


Рис. 3. Значимые различия между группами по баллам САН при измерении до проведения БОС-тренинга (по оси абсцисс – шкалы методики САН, по оси ординат – средний балл в группе).

стояния) и активности (как готовности к действию): «правополушарные» отличаются более высокими показателями по обоим шкалам (рис. 3).

В группе «правополушарных» испытуемых обнаружены значимые внутригрупповые различия по шкале «самочувствие» методики САН: показатели самочувствия снижаются после предъявления тренинга (с 5,5 до 5,3 баллов соответственно). Такие показатели означают физическое утомление в результате тренинга.

Таким образом, обнаружены различия между фоновыми значениями вклада альфа-ритма в регуляцию функционального состояния у испытуемых с разными ведущими полушариями: вклад альфа-ритма в регуляцию выше у «правополушарных» испытуемых, что согласуется с уже имеющимися экспериментальными данными (левое полушарие – более активированное, в связи с большим количеством тормозящих нисходящих путей на ВАРС).

Полученные результаты показывают, что «правополушарные» испытуемые демонстрируют более высокий уровень саморегуляции, в отличие от «левополушарных» респондентов. Это может быть связано с большей мобилизацией ресурсов в ситуации тренинга у «правополушарных» испытуемых, воспринимающих тренинг в большей степени как стрессовое событие. Достоверное снижение самочувствия (физическое истощение) «правополушарных» респондентов может быть связано с истощением ресурсов организма после участия в тренинге.

«Правополушарные» испытуемые легче справляются с заданиями на достижение эмоционального напряжения,

а «левополушарные» – с заданиями на достижение состояния релаксации. Это может быть связано с изначальной разницей в показателях САН (самочувствие и активность), отражающих состояние большей мобилизации у «правополушарных» испытуемых, что, вероятно, связано с адаптацией в новых условиях, которая требует от них больше усилий. Для «левополушарных» испытуемых, способных быстрее осознавать происходящее по причине доминирования речевого полушария, тренинг, вероятно, напротив, является меньшим стрессом, о чем свидетельствуют более низкие показатели САН.

### **Выводы**

1. Обнаружены различия между уровнем саморегуляции функционального состояния в процессе тренинга биологической обратной связи и особенностями профиля латеральной организации испытуемых.

2. «Правополушарные» респонденты демонстрируют более успешную саморегуляцию по сравнению с «левополушарными». Такой феномен связан с большей мобилизацией ресурсов «правополушарных» людей для лучшей адаптации в новых условиях, которые в большей степени воспринимаются ими как стрессовые. Однако «правополушарные» респонденты и быстрее истощаются, устают.

Таким образом, показано, что люди с разными ведущими полушариями головного мозга демонстрируют разные особенности саморегуляции, которые можно учитывать при отборе лиц для работы по соответствующим специальностям. Люди с ведущим правым полушарием обладают специфическими и

очень ценными особенностями восприятия и мышления (лучше ориентируются в пространстве, развита симультанность обработки информации), поэтому будут эффективны в определенных видах деятельности (например, операторы сложных технических комплексов). При этом стоит учесть, что они больше подвержены стрессу и быстрее истощаются, хотя уровень саморегуляции функционального состояния у них достаточно высок.

### Список литературы

1. *Бурдаков Д.С.* Саморегуляция лиц с различными типами функциональной асимметрии мозга и психическая напряженность // Экспериментальная психология. 2010. Т. 3. № 3. С. 123-134.
2. *Бурдаков Д.С.* Стиль саморегуляции и динамические характеристики функциональной асимметрии мозга // Экспериментальная психология. 2010. Т. 4. № 3. С. 110-119.
3. *Луценко Е.Л.* Особенности межполушарной асимметрии индекса альфа-ритма у студентов // Вестник психофизиологии. 2013. № 2. С. 34-40.
4. *Москвин В.А.* Межполушарные отношения и проблема индивидуальных различий. М. 2002.
5. *Осницкий А.К.* Индивидуальные различия процессов саморегуляции у студентов вуза с разными профилями латеральной организации / А.К. Осницкий, С.А. Корнеева; Психологический институт РАО, Москва // Вестник университета (Государственный университет управления). М. 2011. № 14. С. 96-99.
6. *Фокин В.Ф.* Динамическая функциональная асимметрия как отражение функциональных состояний // Асимметрия. 2007. Т. 1. № 1. С. 4-10.
7. *Хомская Е.Д., Ефимова И.В., Будыка Е.В., Ениколопова Е.В.* Нейропсихология индивидуальных различий. М. 1997.
8. *Ярец М.Ю., Чайванов Д.Б.* Особенности авторегуляторных способностей управления альфа-ритмом художников и артистов, выявленные в биоуправляемом тренинге по стимулам визуальной и звуковой модальности // Биомедицина. 2013. № 2. С. 89-94.

## Features of autoregulatory abilities of control an alpha rhythm by persons with a different profile of the lateral organization, revealed in biooperated alpha training

M.Yu. Yarets, D.B. Chayvanov, N.V. Gavrish

In this paper there is research of connection between autoregulatory abilities of control an alpha rhythm and a profile of the lateral organization at persons of creative specialties. On the basis of the obtained results there are suggestions for improvement of methods of professional selection.

**Key words:** biofeedback, unrestricted self-regulation, functional condition, alpha stimulation training, the lateral organization.



### Моделирование кардиопульмонарной патологии у экспериментальных животных

П.А. Ворончихин<sup>1</sup>, А.Н. Куликов<sup>2</sup>, А.А. Карпов<sup>3</sup>, Е.Г. Сухорукова<sup>4</sup>,  
Д.Д. Ваулина<sup>5</sup>, С.В. Оковитый<sup>1</sup>, Д.Э. Коржевский<sup>4</sup>, Е.Б. Шустов<sup>6</sup>

<sup>1</sup> – ГБОУ ВПО СПХФА, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> – ФГБ ВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. Кирова», Санкт-Петербург

<sup>3</sup> – ФГБУ «ФМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

<sup>4</sup> – ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

<sup>5</sup> – ФГБУН «Институт мозга РАН», Санкт-Петербург

<sup>6</sup> – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область

Контактная информация: Ворончихин Павел Алексеевич, [pavalexvor@mail.ru](mailto:pavalexvor@mail.ru)

Разработка фармакотерапии для пациентов, страдающих бронхиальной астмой и имеющих коморбидные заболевания, особенно патологию сердца, требует создания адекватной экспериментальной модели для доклинических исследований. Сочетанная патология у экспериментальных животных моделировалась с помощью доксорубицинового или ишемического поражения миокарда с последующим созданием овальбуминовой бронхиальной астмы.

В результате проведенного исследования установлено, что использование доксорубициновой модели сердечной недостаточности для моделирования коморбидной патологии невозможно, так как при этом подавляется аллергическая реакция, вызываемая овальбумином, и не формируется экспериментальная бронхиальная астма.

Модель окклюзии левой коронарной артерии является наиболее эффективным способом для создания поражения миокарда, на фоне которого хорошо моделируется бронхиальная астма. Эхокардиография выявила снижение основных параметров работы сердца (фракция выброса, фракция укорочения, ударный объем), при этом морфологическое исследование легких подтвердило наличие воспаления в дыхательных путях, сопровождающегося возрастанием числа эозинофилов и тучных клеток в периваскулярном и перибронхиальном пространствах.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, кардиопульмональная патология, крысы.

#### Введение

Одним из самых распространенных хронических заболеваний дыхательных путей является бронхиальная астма (БА). В мире насчитывается более 300 миллионов человек, страдающих этой патологией. Нередко эти пациенты име-

ют сопутствующие заболевания сердечно-сосудистой системы, что является актуальной проблемой современной медицины, так как еще в 1996 г. было выявлено увеличение риска неблагоприятного исхода у пациентов (особенно женщин) с БА и проявлениями

ишемической болезни сердца [12]. Возникновение сочетанной кардиологической патологии у пациентов с астмой не зависит от тяжести бронхиальной астмы, и частота этих возникновений соответствует общим тенденциям в обществе [7].

**Целью** предстоящей работы стало создание адекватной модели кардиопульмонарной патологии с целью ее использования для поиска новых подходов к лечению пациентов с сочетанной патологией сердца и легких.

### Материалы и методы

Для моделирования сердечной недостаточности использованы беспородные крысы-самцы массой 220-250 г. (n=50) из питомника «Рапполово» РАМН. Содержание животных осуществлялось в

условиях вивария СПХФА на стандартном рационе со свободным доступом к воде при 12-час световом режиме в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Схемы экспериментов представлены в табл. 1.

Для моделирования хронической сердечной недостаточности (ХСН) были выбраны 2 модели: фармакологическая модель с использованием доксорубицина и хирургическая модель с созданием ишемического поражения миокарда путем окклюзии левой коронарной артерии.

Для создания фармакологической модели сердечной недостаточности использовали доксорубицин (Teva, Изра-

Таблица 1  
Схемы экспериментов по созданию кардиопульмонарной патологии

Группа	1-30 день	31 и 37 день	60-90 дни
Контроль, эксперимент 1, n=5	-	Введение эквивалентных количеств физиологического раствора	
Группа, с патологией, эксперимент 1, n=10	в/б введение доксорубицина в кумулятивной дозе 15 мг/кг, разделенной на 6 введений в течение 14 дней	ОВА, п/к + БМ, в/б	ОВА, ингаляции каждые 3 дня
Контроль, 2 эксперимент, n=5	-	Введение эквивалентных количеств физиологического раствора	
Группа, с патологией, n=10	Окклюзия левой коронарной артерии в 1-й день	ОВА, п/к + БМ, в/б	ОВА, ингаляции каждые 3 дня

*Примечание:* ОВА – овалбумин; БМ – препарат «Бронхо-мунал»; в/б – внутривентральное введение; п/к – подкожное введение; инг – ингаляционное введение.

иль), вводимый внутривенно в кумулятивной дозе 15 мг/кг, разделенной на 6 введений (14 дней). В такой дозе доксорубин способен снижать сократимость миокарда левого желудочка, формируя у животных ХСН через 1 мес. после последнего введения [3, 17].

Ишемическое повреждение миокарда моделировали, используя окклюзию левой коронарной артерии [6]. Крыс предварительно наркотизировали хлоралгидратом (Acros Organics, США) в дозе 450 мг/кг, фиксировали на препаровальном столике, вскрывали грудную клетку в 4-м подреберье слева, рассекали перикард и обнажали сердце. Под левую коронарную артерию подводили лигатуру, концы нити затягивали под контролем ЭКГ (Инкарт, Россия) до появления признаков ишемии миокарда: снижения вольтажа зубца R и подъема интервала ST. Затем проводили послойное зашивание мышц и кожи. В контрольной группе животных (n=5) также проводили вскрытие грудной клетки с последующим послойным ушиванием операционной раны.

Спустя 30 дней после начала экспериментов, из выживших животных формировали опытную и контрольную группы (n=10) и начинали моделирование овалбуминовой БА в течение 60 дней. Для этого подкожно вводили адсорбированный на геле  $Al(OH)_3$  1:100 овалбумин на 31-й и 37-й дни [10]. Одновременно с введением овалбумина в качестве адьюванта осуществляли внутривенные инъекции препарата «Бронхо-мунал», предварительно растворенного в 2 мл физиологического раствора, в дозе 2,5 мг/кг [1]. Начиная с 45-го дня, проводили ингаляции 5% раствора овалбумина в течение 15 мин ка-

ждые три дня (1 ингаляция = 10 крыс) с помощью небулайзера «F 1000» (Flaem, Италия). Контрольной группе (n=5) ингалировали физиологический раствор в эквивалентных количествах.

Спустя 90 дней после начала эксперимента проводили эхокардиографическое исследование сердца и забор крови, с последующим изъятием и фиксацией ткани легкого. Гистологическое исследование проводили, используя окраску с одновременным выявлением эозинофилов (эозин), тучных клеток и муцина (альциановый синий) по методу Сухоруковой-Ворончихина [4, 5]. Анализировали перибронхиальное пространство (ПБ), периваскулярную область (ПВ) при увеличении  $\times 400$  в 10-ти полях зрения.

Для исследования сердца использовали ультразвуковую систему «Acuson Sequoia 512» (Siemens, Германия) с линейным датчиком (частота 8 МГц). Животных наркотизировали метагекситалом (Lilly, США) в дозе 90 мг/кг. В М-режиме регистрировали диаметр аорты у корня (Ao, мм), передне-задний размер левого предсердия (ЛП, мм), конечные диастолический и систолический размеры левого желудочка (КДР, КСР, мм), толщину межжелудочковой перегородки (Тмжп, мм) и толщину задней стенки левого желудочка (Тзс, мм), фракцию укорочения (ФУ, %), фракцию выброса (ФВ, %) и ударный объем (УО, мл).

Экспериментальные данные статистически обрабатывались с помощью программы BIOSTAT 4.03 [2]. Достоверность различий выявляли с помощью критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна – Уитни. Числовые данные приведены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m_x$ ). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

На модели сочетанной патологии, полученной путем введения доксорубина и овальбумина, в ходе 1-го эксперимента формирования сочетанной патологии не было обнаружено.

Анализ периферической крови выявил возрастание числа лейкоцитов в 2,9 раза, снижение числа эритроцитов (в 1,5 раз) и увеличение количества тромбоцитов (в 2 раза) по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Эхокардиографически были обнаружены изменения фракции укорочения и размера левого желудочка, которые были недостоверны ( $p > 0,05$ ). Морфологическое исследование ткани легкого достоверных отличий в числе эозинофилов, тучных клеток, бокаловидных клеток между опытными группами и контролем не выявило. Вероятно, отсутствие аллергического воспаления в дыхательных путях было связано с иммунодепрессивным действием доксорубина [11, 13]. Более того, в клинических исследованиях была обнаружена способность доксорубина даже несколько улучшать состояние пациентов с БА [14, 16] за счет подавления воспаления в дыхательных путях. Таким образом, очевидно, что доксорубиновая модель

ХСН не является оптимальной для моделирования кардиопульмональной патологии.

При моделировании сочетанной патологии (ХСН и БА), с использованием окклюзии коронарной артерии и последующего введения овальбумина, в периферической крови наблюдалось статистически достоверное возрастание всех субпопуляций лейкоцитов. Так, количество эозинофилов при этой патологии увеличивалось, в среднем, в 7 раз, а нейтрофилов – в 4,5 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). В клинических исследованиях у пациентов с БА также было отмечено возрастание числа эозинофилов в периферической крови [8].

Эхокардиографическое исследование миокарда продемонстрировало достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение конечного диастолического размера (КДР) в 1,3 раза, конечного диастолического объема (КДО) – в 1,75 раз, конечного систолического размера (КСР) левого желудочка – в 2,1 раза и конечного систолического объема (КСО) – в 8 раз по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Одновременно снижалась фракция выброса (ФВ) в 3 раза, фракция укорочения (ФУ) – в 4,3 раза и ударный объем (УО) – в 2,1 раза по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2  
Показатели периферической крови у животных с экспериментальной ишемической ХСН и БА

Группа	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	Эозинофилы, $10^9/\text{л}$	Нейтрофилы, $10^9/\text{л}$
Контроль	$7,2 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,5$	$0,21 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,4$
Группа с патологией	$15,3 \pm 1,3^*$	$6,4 \pm 0,4^*$	$1,85 \pm 0,35^*$	$7,0 \pm 0,9^*$

Примечание: \* – значимое отличие от контрольной группы,  $p < 0,05$ .

Таблица 3

Результаты эхокардиографического исследования

Параметр	Контроль	Группа с патологией
Масса тела	320,0±10,0	320,0±20,0
Аорта, см	0,38±0,03	0,36±0,02
Левое предсердие (ЛП), см	0,41±0,05	0,44±0,07
Параметры левого желудочка		
Конечный диастолический размер (КДР), см	0,68±0,06	0,86±0,04*
Конечный диастолический объем (КДО), мл	0,8±0,05	1,4±0,2*
Конечный систолический размер (КСР), см	0,37±0,03	0,77±0,09*
Конечный систолический объем (КСО), см	0,13±0,02	1,05±0,04*
Фракция укорочения (ФУ), %	47,5±2,3	11,2±6,3*
Ударный объем (УО), мл	0,63±0,05	0,3±0,1*
Частота сердечных сокращений (ЧСС), уд/мин	384±15	386±49
Фракция выброса (ФВ), %	83,2±6	27,0±15*

Примечание: \* – значимое отличие от контрольной группы,  $p < 0,05$ .

Наблюдаемые изменения работы сердца характеризуют ухудшение сократительной способности миокарда в результате проведенной хирургической операции.

При морфологическом исследовании легких наблюдали инфильтрацию стенок бронхов и сосудов тучными клетками и эозинофилами (рис. 1). Количество тучных клеток и эозинофилов возрастало (табл. 4) в перибронхиальном пространстве в 2 и в 2,8 раза, а в периваскулярном пространстве – в 1,6 и 11 раз, соответственно по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

В клинических исследованиях, при биопсии легких больных с БА, также описано увеличение количества тучных клеток. Есть предположение, что число тучных клеток и их активность коррелирует с уровнем гиперреактивности дыхательных путей [9, 15].

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что при использовании окклюзии левой коронарной артерии и модифицированной модели БА может быть смоделирована кардиопульмональная патология.

Таблица 4

Тучные клетки и эозинофилы в тканях легкого

Клетки	Тучные клетки		Эозинофилы	
	ПБ	ПВ	ПБ	ПВ
Область				
Контроль	2,1±0,2	3,0±0,6	2,5±0,5	0
Группа с патологией	4,2±1,2*	4,8±0,4*	7,1±3,0*	11,0±3,4*

Примечание: \* – значимое отличие от значений контрольной группы,  $p < 0,05$ .

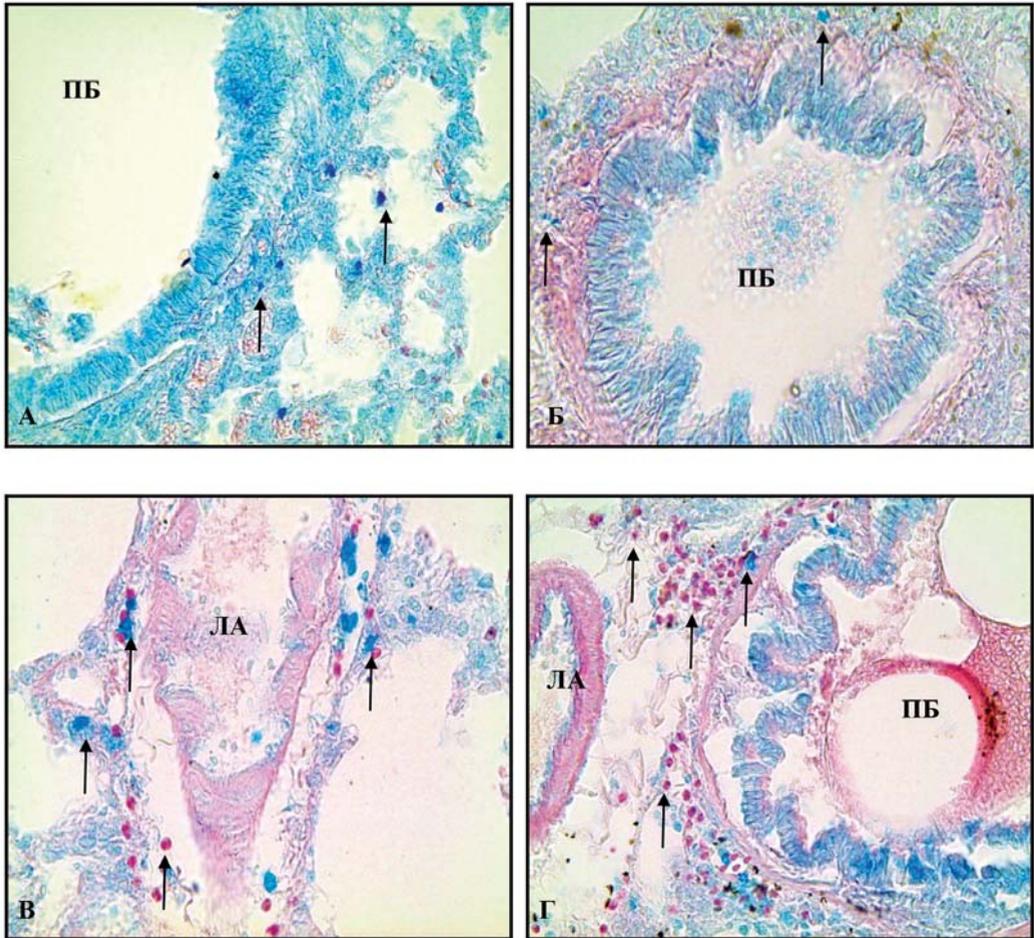


Рис. 1. Гистологический срез легких контрольных животных (А, Б) и животных с кардиопульмональной патологией (В, Г). При моделировании сочетанной патологии в легких наблюдается возрастание числа эозинофилов, тучных клеток и повышение содержание слизи в просвете бронхов. Тучные клетки и муцин окрашены в ярко-синий цвет, эозинофилы в малиновый цвет. Клетки обозначены стрелками (↑), ЛА – легочная артерия, ПБ – просвет бронха. Комбинированная окраска альциановым синим и эозином. Увел. об. х400.

### Выводы

1. Для моделирования кардиопульмонарной патологии наиболее оптимальной для создания сердечной недостаточности является окклюзия левой коронарной артерии с последующим моделированием овальбуминовой БА.

2. Наиболее эффективным методом функциональной диагностики

поражения миокарда у экспериментальных животных является эхокардиография.

3. Используя метод комбинированного окрашивания и одновременного выявления эозинофилов, тучных клеток и муцина можно быстро определить основные морфологические критерии БА.

## Список литературы

1. **Ворончихин П.А., Сырцова М.А., Талантов С.В. и др.** Влияние метопролола и бисопролола на течение экспериментальной бронхиальной астмы // Биомедицина. 2013. № 2. С.48-57.
2. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика. Перевод с англ. М.: Практика. 1999. 459 с.
3. **Казаченко А.А., Оковитый С.В., Куликов А.Н. и др.** Сравнительная характеристика некоторых фармакологических моделей хронической сердечной недостаточности // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т. 71. № 6. С.16-19.
4. **Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Отеллин В.А.** Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях // Морфология. 2006. Т.129. Вып.1. С.85-86.
5. **Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. и др.** Морфологическая диагностика. СПб.: СпецЛит. 2013. 127 с.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. Миронова А.Н.- М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
7. **Cazzola M., Calzetta L., Bettoncelli G. et al.** Asthma and comorbid medical illness // ERJ. 2011. Vol.38. № 1. P.42-49.
8. Global strategy for asthma management and prevention (updated 2012). 110 p.
9. **Holgate S., Kay A.B.** Mast cells, mediators and asthma // J. Clinical Allergy. 1985. Vol. 15., № 3. P.221-234.
10. **Kamachi A., Munakata M., Nishimura Y. et al.** Enhance of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma // J. Thorax. 2001. Vol. 56. №1. P.19-24.
11. **Lee, V., Randhawa A.K., Singal P.K.** Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals // Am. J. Physiol. 1991. Vol.261. № 4. P.989-995.
12. **Toren K., Lindholm N.B.** Do patients with severe asthma run an increased risk from ischaemic heart disease? // Int. J. Epidemiol. 1996. Vol. 25. №3. P.617-620.
13. **Toyoda Y., Okada M., Kashem A.M.** A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration // J. Thorac Cardiovasc. Surg. 1998. Vol. 115. № 6. P.1367-1373.
14. **Reed C.** The natural history of asthma in adults: the problem of irreversibility // J. Allergy Clin. Immunol. 1999. Vol. 103. № 4. P. 539-547.
15. **Robinson D.S.** The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle // J. Allergy Clin. Immunology. 2004. Vol. 114. № 1. P. 58-65.
16. **Weigel S., Schmidt S.M., Bernig T. et al.** Intensive chemotherapeutic regimens against acute leukemia transiently suppress asthma symptoms but do not lead to long-term relief // Pediatr. Hematol. Oncol. 2000. Vol. 17. № 8. P. 659-665.
17. **Weinberg L.E., Singal P.K.** Refractory heart failure and age-related differences in adriamycin-induced myocardial changes in rats // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1987. Vol. 65. № 9. P. 1957-1965.

## Model of cardiopulmonary disease on rats

**P.A. Voronchikhin, A.V. Kulikov, A.A. Karpov, E.G. Sukhorukova,  
D.D. Vaulina, S.V. Okovityi, D.E. Korzhevskii, E.B. Shustov**

Development of methods of therapy in the case of patients with asthma and have a comorbid diseases, especially heart disease, requires an adequate animal model. In our design were selected Doxorubicin heart failure model and myocardial injury model. After heart damage followed by the creation of ovalbumin asthma. As a result of this work it became clear that the use of doxorubicin model of heart failure would not be suppressed because the allergic reaction caused by ovalbumin. In the course of the experiment revealed that the use of the model left coronary artery occlusion is the most effective way to create a comorbidity. Ultrasound heart investigation revealed a decrease in the basic parameters of the heart (ejection fraction, FI, SV) with a morphological study confirmed the inflammation in the airways, accompanied by an increase in the number of eosinophils and mast cells in the perivascular and peribronchial spaces.

**Key words:** experimental bronchial asthma, experimental heart failure, rats.

## Моделирование увеоретинита и ретинопатии как инструмент изучения их иммунопатогенеза

З.Х. Дикинов<sup>1</sup>, И.В. Евсегнеева<sup>2</sup>, О.В. Калюжин<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> – Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, Нальчик

<sup>2</sup> – Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

<sup>3</sup> – Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва

Контактная информация: Калюжин Олег Витальевич, [kalyuzhin@list.ru](mailto:kalyuzhin@list.ru)

Моделирование увеоретинита и ретинопатии на животных и клеточных культурах явилось важнейшим шагом на пути не только к раскрытию иммунных механизмов интраокулярного воспаления, но и к разработке методов биотерапии заболеваний сосудистого тракта и сетчатки. В обзоре проанализированы преимущества и недостатки основных экспериментальных моделей увеоретинита и ретинопатии с позиций адекватности воспроизведения заболеваний глаз у человека.

**Ключевые слова:** увеоретинит, ретинопатия, экспериментальные модели, иммунопатогенез.

### Введение

Среди заболеваний, ведущих к потере зрения, увеоретиниты занимают одно из ведущих мест [21]. Развитие интраокулярного воспаления при этих заболеваниях имеет ряд особенностей, которые в первую очередь связаны с тем, что передняя камера глаза, субретинальное пространство, стекловидное тело и некоторые другие отделы глаза представляют собой иммунологически привилегированные зоны организма [20]. Первичные и вторичные нарушения гематофтальмического барьера ведут к срыву иммунной толерантности к антигенам глаза, главным образом сетчатки, и интраокулярному воспалению, в котором принимают участие компоненты как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Выявление эффекторных и регуляторных механизмов воспаления «забарьерных» тканей глаза стало возможным, во многом благодаря экспериментальным исследованиям на моделях

*in vitro* и *in vivo*, и создало предпосылки для разработки методов биотерапии увеоретинита и ретинопатии [3, 23]. Разнообразие клинических вариантов и патогенетических механизмов поражения сосудистой оболочки глаза и сетчатки, а также методологических подходов к исследованиям предопределили множественность предлагаемых экспериментальных моделей.

В обзоре проанализированы основные подходы и наиболее известные способы моделирования интраокулярного воспаления в свете адекватности воспроизведения конкретных клинических состояний у человека, связанных с аутоиммунным поражением сосудистого тракта и сетчатки.

### Методологические подходы к моделированию интраокулярного воспаления

Целью разработчиков экспериментальных моделей увеоретинита и рети-

нопатии является максимально точное воссоздание либо определенной клинической формы заболевания с ее важнейшими патогенетическими чертами, либо ключевого и/или наиболее универсального звена развития интраокулярного воспаления, сопровождающее гетерогенные заболевания.

Наиболее распространённым подходом к моделированию воспалительных заболеваний глаза является введение в организм экспериментальных животных аутоантигенов и/или стимуляторов врожденного иммунитета. В зависимости от интраокулярного или системного введения триггерных агентов все модели увеоретинитов *in vivo* можно разделить на локально- и системно-индуцированные. В качестве индукторов воспаления обычно используются ретинальные антигены в комбинации с бактериальными адьювантами [9] или патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, такие как липополисахарид (ЛПС) [16], пептидогликан и мурамилпептиды [25]. Выделение как самостоятельной группы моделей аутоиммунного увеоретинита, на наш взгляд, весьма условно, так как иммунная аутоагрессия в той или иной степени имеет место при любом варианте индукции интраокулярного воспаления, ведущего к нарушению гематофтальмического барьера. Тем не менее, термин «экспериментальный аутоиммунный увеит (или увеоретинит)» нашел широкое применение в литературе для обозначения аутоантиген-индуцированных моделей [8].

Другой методологический подход к воспроизведению воспаления сосудистого тракта базируется на введении в организм лабораторных животных сингенных клеточных культур: дендритных

клеток, нагруженных ретинальными антигенами, или аутоантиген-специфических Т-лимфоцитов. В первом случае моделируется заболевание, начиная с индуктивной фазы аутоиммунного воспаления, во втором – завершающая, эффекторная фаза этого заболевания.

Отдельным подходом является использование генетически модифицированных линий экспериментальных животных, у которых спонтанно развивается интраокулярное воспаление.

Промежуточное положение между индуцированными и спонтанными моделями занимает экспериментальный увеоретинит, индуцированный введением сингенных гибридом, продуцирующих антитела к антигенам сетчатки.

Одним из современных методологических приемов для выяснения роли отдельных молекул в патогенезе увеоретинита является воспроизведение интраокулярного воспаления на нокаутных по генам этих молекул животных.

Несколько реже, чем модели *in vivo*, используют клеточные культуры, при этом клетки-мишени – как правило, ретиноциты, – инкубируют с эффекторными молекулами, в частности – аутоанти телами.

**Модели *in vitro* в изучении аутоиммунной патологии сетчатки и сосудистого тракта, а также механизмов иммунной привилегированности глаза**

Модели *in vitro* нашли применение при изучении клеточных и молекулярных механизмов повреждения клеток сетчатки при ретинопатиях. Так, добавление антител против рековерина к культуре ретинальных клеток вызывает их апоптоз по митохондриальному

пути, включающему последовательную активацию каспаз 9 и 3 [5, 29]. Сходные цитотоксические эффекты в культуре ретиноцитов вызываются антителами к  $\alpha$ -энолазе [6]. Эти антитела выявлены в сыворотке крови больных канцер-ассоциированной ретинопатией, а также аутоиммунной ретинопатией [4], и могут играть заметную патогенетическую роль при поражении сетчатки у человека. Легкость воспроизводства и дешевизна говорят о целесообразности применения указанных моделей *in vitro* для изучения молекулярных механизмов апоптоза клеток сетчатки, индуцированного аутоантителами, и разработки биотерапевтических подходов к лечению канцер-ассоциированной и аутоиммунной ретинопатии человека.

На моделях *in vitro* исследуются не только патогенетические события, но и физиологические механизмы, лежащие в основе поддержания иммунной привилегированности глаза. Так, установлено, что пигментные эпителиальные клетки, выделенные из глаза, обладают способностью подавлять рецептор-зависимую активацию Т-клеток и индуцировать регуляторные Т-лимфоциты *in vitro* [31]. Эту способность связывают с продукцией мембранных и растворимых ингибиторных молекул, таких как CD86 (B7-2), трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), тромбоспондин-1, лиганд-1 молекулы программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1/B7-H1) и цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 2 $\alpha$ . Интересно, что пигментные эпителиальные клетки разных локализаций (радужка, ресничное тело, сетчатка) подавляют активацию Т-лимфоцитов по механизмам, которые лишь частично перекрываются. В частности, пигментные

клетки радужки регулируют функцию посттимических Т-предшественников, в основном, при непосредственном контакте с ними за счет мембранных молекул TGF- $\beta$  и B7. Другие пигментные эпителиальные клетки ингибируют активацию Т-лимфоцитов преимущественно за счет растворимых медиаторов, включая TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 [32].

Таким образом, в условиях моделей *in vitro* изучаются как эфферентные звенья поражения клеток сетчатки, сходные с таковыми при ретинопатиях человека, так и регуляторные факторы микроокружения глаза.

### **Модели увеита *in vivo* с системным введением патоген/комменсал-ассоциированных молекулярных паттернов**

Некоторые высококонсервативные структурные фрагменты бактерий (как правило, их клеточных стенок), активирующие дендритные клетки, моноциты/макрофаги и другие клетки-эффекторы врожденного иммунитета, при парентеральных инъекциях индуцируют у экспериментальных животных воспаление сосудистого тракта глаза. Так, системно введенный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахарид (ЛПС), или эндотоксин, - вызывает быструю и стойкую воспалительную реакцию в передних отделах сосудистой оболочки глаза [28]. Иридоциклит может быть вызван и структурной субъединицей ЛПС, которая обуславливает большую часть его биологических эффектов, – липидом А. Интересно, что введение последнего в дозе 0,1 мг/кг в подушечку задней конечности крыс инбредной линии Lewis вызывало существенно большую ней-

трофильную инфильтрацию ресничного тела и передней камеры глаза, чем аналогичная инъекция самого ЛПС в эквивалентной дозе (1 мг/кг) А [15]. Вероятно, это связано с более высокой способностью липида А проникать через гематотканевые, в частности гематофтальмический, барьеры, которая обусловлена более низким молекулярным весом и большей липофильностью в сравнении с целой молекулой эндотоксина. ЛПС и липид А являются лигандами паттерн-распознающих рецепторов: TLR-4, CD14 и MD-2. Связываясь с указанными корецепторами на поверхности моноклеарных и полиморфноядерных фагоцитов, эндотоксин и его структурный компонент стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, а также активных форм кислорода и азота клетками-мишенями. Если механизмы, за счет которых указанные стимуляторы врожденного иммунитета индуцируют локальное воспаление при интравитреальной или интракорнеальной инъекции [13, 17] вполне понятны, то биологические пути, по которым эндотоксин или его биологически активные субъединицы при подкожном, внутривенном или внутрибрюшинном введении индуцируют интраокулярное воспаление, до сих пор не раскрыты. Некоторые авторы, опираясь на косвенные свидетельства участия ЛПС в патогенезе воспалительных заболеваний глаза, выдвигают эндотоксиновую теорию патогенеза переднего увеита и эндогенного эндофтальмита у человека [1]. В качестве аргументов, подтверждающих ключевую роль ЛПС при развитии интраокулярного воспаления, они приводят, в частности, факт прямой взаимосвязи между стрессом, перенесен-

ном пациентом, и развитием эндогенного иридоциклита «неясной этиологии», который часто трансформируется в эндофтальмит. Стресс, шунтируя портальный кровоток в обход печени, обуславливает вброс в общую гемодинамику дополнительного количества кишечного эндотоксина, способствует развитию эндотоксиновой агрессии. Тем не менее, до сих пор точно не установлено, имеется ли человеческий эквивалент локального воспалительного ответа в передней камере глаза на системную циркуляцию ЛПС. Также нет единого мнения, какую именно форму увеита у человека воспроизводит эта модель. Однако, индуцированный эндотоксином экспериментальный увеит широко используется для изучения воспалительного процесса в глазу, в частности для исследования патогенетической роли компонентов врожденного иммунитета. Для этих же целей с могут применяться липид А, его синтетические аналоги и, возможно, некоторые другие лиганды паттерн-распознающих рецепторов. Несомненными преимуществами данных моделей является быстрота и относительная простота индукции, а также хорошая воспроизводимость на инбредных и беспородных мышках и крысах.

### **Модели аутоиммунного увеита *in vivo* с системным введением аутоантигенов**

Считается, что модели аутоиммунного увеита гораздо ближе к неинфекционным воспалительным заболеваниям сосудистой оболочки глаза человека как по клиническим проявлениям, так и по раскрытым механизмам развития [8].

Типичным методом индукции экспериментального аутоиммунного увеита

является иммунизация чувствительных животных, обычно мышей или крыс, одним из ретинальных антигенов, чаще всего аррестином (S-антигеном) или межфоторецепторным ретинол-связывающим белком (IRBP) совместно с бактериальными адьювантами, такими как токсин *Bordetella pertussis* или полный адьювант Фрейнда, содержащий убитые нагреванием клетки *Mycobacterium bovis*. Эти адьюванты, стимулируя образраспознающие рецепторы, активируют клетки врожденного иммунитета (моноциты/макрофаги, дендритные клетки, NK- и NKT-клетки,  $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты) и, тем самым, в присутствии аутоантигенов направляют адаптивный иммунный ответ по аутореактивному пути. В действительности, стимуляция врожденного иммунного ответа сама по себе вызывает воспаление сосудистой оболочки глаза на моделях *in vivo* (что происходит, например, при переднем увеите, индуцированном эндотоксином [16]) и, возможно, у человека. Тем не менее, именно аррестин и IRBP индуцируют аутоиммунное воспаление с преимущественно лимфоидной инфильтрацией, локализованное в задних отделах сосудистой оболочки глаза. Ключевыми медиаторами при этом являются IFN- $\gamma$  и интерлейкин-17 (IL-17), что может быть использовано исследователями для разработки биотерапевтических подходов, основанных на блокировке функции этих провоспалительных цитокинов.

В качестве модели для доклинических исследований иногда используют модель индуцированного аррестином воспаления увеального тракта на обезьянах. При этом клинические и гистологические проявления увеита наибо-

лее адекватно воспроизводят таковые у человека [14]. В отличие от мышинных и крысиных моделей, увеит у приматов характеризуется, помимо привлечения в очаг воспаления Т-клеток, притоком В-лимфоцитов и субретинальным фиброзом. Эти особенности сближают указанную модель с синдромом Фогта-Коянаги-Харады, а также с субретинальным фиброзом и увеальным синдромом у человека.

Достаточно хорошо охарактеризована модель переднего аутоиммунного увеита, в которой как триггер интраокулярного воспаления применяют увеальный меланин [7]. Инъекция бычьего увеального меланина некоторым инbredным и беспородным крысам вызывает воспаление, главным образом, в передней камере глаза и инфильтрацию лимфоцитами радужки и цилиарного тела, что в значительной степени имитирует события, разворачивающиеся при остром переднем увеите (иридоциклите) у человека [30]. В этой связи, многие исследовательские группы используют меланин-индуцированный аутоиммунный увеит для изучения различных аспектов патогенеза острого переднего увеального воспаления, в том числе роли разных субпопуляций лейкоцитов, молекул адгезии, цитокинов, хемокинов, оксида азота, системы комплемента и апоптоза.

Отдельно следует выделить «гуманизированную» модель индуцированного аутоиммунного увеита, которая воспроизводится у мышей, трансфицированных одним из аллелей генов HLA II класса, включая HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DQ6 и HLA-DR8. Такие трансгенные животные, в отличие от мышей дикого типа, отвечают интраокулярной

воспалительной реакцией на введение ретинальных антигенов, в частности аррестина [22]. «Гуманизированный» экспериментальный аутоиммунный увеит представляется адекватной моделью для выявления антигенных участков, функционально вовлеченных в патологический процесс, и разработки методов антиген-специфической иммунотерапии воспалительных заболеваний сосудистой оболочки глаза у человека.

### **Модели увеоретинита *in vivo* с локальным введением патоген/комменсал-ассоциированных молекулярных паттернов**

Среди моделей с интраокулярным введением триггерных агентов, пожалуй, наиболее хорошо охарактеризован экспериментальный увеит, вызванный мурамилпептидами (МП) – минимальными биологически активными структурными субъединицами пептидогликана клеточной стенки бактерий [2]. В качестве локальных индукторов увеита чаще всего используют N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (мурамилдипептид, МДП), реже – N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамил-L-лизин (мурамилтрипептид, МТП) [25]. Через несколько часов после интравитреальной инъекции 100 мкг МДП у мышей наблюдают инфильтрацию лейкоцитами, преимущественно гранулоцитами, радужки и глазной жидкости передней камеры глаза, при этом задние отделы глаза остаются практически интактными. Установлено, что ключевым сенсором МП-индуцированного увеита является цитозольный рецептор NOD-2, так как *Nod2*-нокаутные мыши не отвечают интраокулярным воспалением на локальное введение

МП. Важнейшим иммунным медиатором воспаления в этой модели является интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Генетическая недостаточность этого цитокина существенно снижает выраженность двух важнейших проявлений клеточного воспалительного ответа на интравитреальное введение МП – роллинга и адгезии лейкоцитов [26]. Модель МП-индуцированного увеита вызывает интерес в свете установленной взаимосвязи мутаций NOD-2 и развитием синдрома Блау – аутосомно-доминантного заболевания, характеризующегося мультиорганным гранулематозным воспалением, преимущественно локализованным в глазах, коже и суставах [35]. Исследования интраокулярных функций NOD-2 в условиях вышеописанной модели может пролить свет на механизмы развития поражения тканей глаза не только при синдроме Блау, но и при более распространенных формах увеоретинита.

Увеоретинит также развивается в ответ на интравитреальное введение другого патоген-ассоциированного молекулярного паттерна – пептидогликана, в частности – выделенного из клеточной стенки *Staphylococcus aureus* [25]. Основным сенсором пептидогликана в условиях этой модели, также как и в других ситуациях [33], является образ-распознающий рецептор TLR-4, через который запускается MyD88-зависимый путь активации NF $\kappa$ B [24]. Интересно, что в этом случае NOD-2-рецепция МП, возникающих при биодеградации пептидогликана, играет двойственную роль при развитии интраокулярного воспаления. Обнаружено, что у *Nod2*-нокаутных мышей в сравнении с нормальными животными практически не изменена пептидогликан-стимулированная адге-

зия лейкоцитов и лишь незначительно снижен их роллинг [25]. В другой работе той же научной группы продемонстрировано, что Nod2-нокаутные мыши даже более чувствительны к интравитреальному введению пептидогликана, чем животные дикого типа, что связано с повышенной продукцией IL-12p40, IL-17 and IL-23 [24]. Вероятно, при увеоретините NOD-2-опосредованные сигналы в определенных условиях играют не только патогенетическую, но и защитную роль. Сходная ситуация описана при болезни Крона и воспроизводящих ее экспериментальных моделях [27], когда мутации Nod2 срывают контроль над TLR-опосредованным воспалением.

Как упоминалось выше, экспериментальный увеит также воспроизводится при интравитреальном или интравитреальном введении ЛПС грызунам [13, 17], что может быть использовано как модель острого переднего увеита у человека, связанного с грамотрицательной бактериальной инфекцией.

Вышеуказанные модели локально индуцированного увеоретинита могут оказаться весьма полезными для выяснения роли бактериальных молекулярных паттернов и их рецепторов как в развитии интраокулярного воспаления, так и в поддержании иммунной привилегированности глаза.

### **Клеточно-индуцированные модели аутоиммунного увеоретинита *in vivo***

Экспериментальный аутоиммунный увеоретинит также вызывается адоптивным переносом Т-клеток от иммунизированного животного в интактный организм, генетически совместимый с донорским [10]. Перед переносом ре-

ципиенту Т-клетки культивируются *ex vivo* в присутствии ретинальных антигенов. Этот метод позволяет избежать использования адьювантов и представляет собой модель эфферентной стадии заболевания. При этом воспроизводится клиническая ситуация, когда пациент уже имеет циркулирующие Т-лимфоциты, которые уже контактировали с целевым антигеном.

Недавно описана возможность использования в качестве индукторов аутоиммунного интраокулярного воспаления зрелых дендритных клеток, нагруженных ретинальными антигенами [34]. В этом случае развитие экспериментального увеоретинита сопровождается преимущественно гранулоцитарной инфильтрацией и связано с Th1- и Th2-типами иммунного ответа в противоположность традиционным аутоантиген-индуцированным моделям, в которых патогенетические события в тканях глаза ассоциированы с лимфоидной инфильтрацией и продуктами Th1- и Th17-клеток.

### **Модели спонтанно развивающегося аутоиммунного увеита у трансгенных животных**

Кроме того, существует ряд моделей спонтанно возникающего аутоиммунного увеита у генетически модифицированных мышей. Например, у мышей, трансфицированных геном HLA-A29, в возрасте 8-12 мес. спонтанно развивается увеит [11]. У человека указанный ген ассоциирован с развитием ретинохориоидопатии Бердшота, механизмы которой полностью не раскрыты. Моделирование спонтанного увеита на HLA-A29-трансфицированных мышах поможет пролить свет на неизученные

аспекты этиологии и патогенеза этого достаточно редкого заболевания человека.

Другой пример спонтанного экспериментального заболевания – это модель аутоиммунного увеита у мышей, лишенных гена аутоиммунного регулятора AIRE [12]. Дефицит *Aire* приводит к нарушению экспрессии собственных антигенов, в частности IRBP, в тимусе и, как следствие, блокирует ключевой центральный механизм толерантности – удаление аутореактивных, в данном случае IRBP-специфических, клонов Т-клеток в процессе негативной селекции. В результате у этих мышей развивается антительный и Т-клеточный иммунный ответ на IRBP, что приводит к аутоиммунному воспалению сосудистой оболочки глаза.

Остается спорным вопрос о том, имеют ли преимущества модели спонтанного аутоиммунного увеита над моделями индуцированного заболевания в плане более точного воспроизведения патогенеза аутоиммунного воспаления увеального тракта и сетчатки у человека [8]. Веским аргументом исследователей, приверженных аутоантиген-индуцированным моделям, является то, что спонтанный экспериментальный увеит возникает в генетически измененном организме, который иммунологически существенно отличается от нормального.

### **Модели *in vivo* с введением аутоантиген-продуцирующих гибридных клеток**

Рациональным и перспективным методом моделирования аутоиммунного интраокулярного воспаления представляется введение эксперименталь-

ным животным не самих ретинальных антигенов, а аутоантиген-продуцирующих гибридных клеток. Такой способ занимает промежуточное положение между моделями индуцированного и спонтанного аутоиммунного воспаления. Примером использования гибридной технологии может служить недавно описанная модель рековерин-ассоциированной аутоиммунной ретинопатии [18].  $Ca^{2+}$ -связывающий протеин рековерин, обнаруживаемый в фоторецепторах и ретинальных биполярных клетках, ингибирует родопсинкиназу и тем самым регулирует фототрансдукцию. Антирековериновые иммуноглобулины обнаруживаются в сыворотке крови больных канцер-ассоциированной ретинопатией [4] и меланома-ассоциированной ретинопатией [19]. Кроме того, интравитреальное введение этих антител обезьянам, крысам и кроликам вызывает повреждение сетчатки в результате апоптоза ретинальных клеток. Внутривитреальное введение антирековерин-продуцирующих гибридных клеток мышам вызывало у последних выраженный глиоз и инфильтрацию лейкоцитами сетчатки без значимых проявлений увеита, что воспроизводит патоморфологическую картину при аутоиммунной ретинопатии у человека [18].

В целом, модели аутоиммунного увеоретинита в сравнении с эндотоксин-индуцированными моделями более дорогие, многие из них требуют больше времени и предварительных процедур для воспроизводства, однако они незаменимы для изучения фундаментальных аспектов аутоиммунного воспаления в тканях глаза, а также разработки новых терапевтических подходов.

### Заключение

Полученные в условиях экспериментального увеоретинита и ретинопатии данные позволили существенно приблизиться к пониманию не только сути инфекционного и аутоиммунного интраокулярного воспаления, но и механизмов поддержания иммунной привилегированности глаза и толерантности к аутоантигенам в целом. Кроме того, вышеописанные экспериментальные модели служат незаменимым инструментом для создания новых методов лечения различных форм увеоретинита. С использованием этих моделей разрабатываются различные биотерапевтические подходы, в частности, основанные на специфическом и неспецифическом подавлении активности аутоантиген-специфических клонов Т-лимфоцитов, индукции толерантности к антигенам сетчатки, нейтрализации TNF- $\alpha$  и IL-17, блокировке молекул адгезии, хемокинов и хемокиновых рецепторов [8]. Таким образом, перед учеными, вовлеченными в прикладные фармакологические и фундаментальные исследования в области офтальмологии и иммунологии глаза, открыт широкий арсенал методологических подходов и модельных систем *in vitro* и *in vivo*, рациональный выбор которых позволяет решать самый широкий круг научных задач.

### Список литературы

1. **Вышегуров Я.Х., Закирова Д.З., Расческов А.Ю., Яковлев М.Ю.** Кишечный эндотоксин как облигатный фактор патогенеза эндогенных иридоциклитов и эндофтальмитов неясной этиологии. М.: Московские учебники СиДиПресс. 2006.
2. **Калюжсин О.В.** Производные мурамилдипептида в эксперименте и клинике // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1998. № 1. С. 104-108.
3. **Калюжсин О.В., Дикинов З.Х., Евсегнеева И.В.** Иммунные механизмы экспериментальных увеоретинитов // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2011. № 1. С. 153-159.
4. **Adamus G., Ren G., Weleber R.G.** Autoantibodies against retinal proteins in paraneoplastic and autoimmune retinopathy // BMC Ophthalmol. 2004. Vol. 4. P/record No. 5. <http://www.biomedcentral.com/1471-2415/4/5>.
5. **Adamus G., Webb S., Shiraga S., Duvoisin R.M.** Anti-recoverin antibodies induce an increase in intracellular calcium, leading to apoptosis in retinal cells // J. Autoimmunity. 2006. Vol. 26 (2). P. 146-153.
6. **Anekonda T.S., Adamus G.** Resveratrol prevents antibody-induced apoptotic death of retinal cells through up-regulation of Sirt1 and Ku70 // BMC Research Notes. 2008. Vol. 1. P/record No. 122. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/1/122>.
7. **Broekhuysse R.M., Kuhlmann E.D., Winkens H.J.** Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). III. Induction by immunization with purified uveal and skin melanins // Exp. Eye Res. 1993. Vol. 56. P. 575-583.
8. **Caspi R.R.** A look at autoimmunity and inflammation in the eye // J. Clin. Invest. 2010. Vol. 120 (9). P. 3073-3083.
9. **Caspi R.R.** Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis // Drug discovery today: disease models. 2006. Vol. 3 (1). P. 3-9.

10. **Caspi R.R.** Th1 and Th2 responses in pathogenesis and regulation of experimental autoimmune uveoretinitis // *Int. Rev. Immunol.* 2002. Vol. 21 (2-3). P. 197-208.
11. **De Kozak Y., Camelo S., Pla M.** Pathological aspects of spontaneous uveitis and retinopathy in HLA-A29 transgenic mice and in animal models of retinal autoimmunity: relevance to human pathologies // *Ophthalmic Res.* 2008. Vol. 40 (3-4). P. 175-180.
12. **DeVoss J., Hou Y., Johannes K., et al.** Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen // *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203 (12). P. 2727-2735.
13. **Forrester J.V., Worgul B.V., Merriam G.R.** Jr. Endotoxin-induced uveitis in the rat // *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1980. Vol. 213. P. 221-233.
14. **Fujino Y., Li Q., Chung H., et al.** Immunopathology of experimental autoimmune uveoretinitis in primates // *Autoimmunity.* 1992. Vol. 13 (4). P. 303-309.
15. **Hanashiro R., Fujino K., Guginfu Y., et al.** Synthetic lipid A-induced uveitis and endotoxin-induced uveitis – comparative study // *Jpn. J. Ophthalmol.* 1997. Vol. 41 (6). P. 355-361.
16. **Li Q., Peng B., Whitcup S.M., et al.** Endotoxin induced uveitis in the mouse: susceptibility and genetic control // *Exp. Eye Res.* 1995. Vol. 61 (5). P. 629-632.
17. **Lin N., Bazan H.E.P., Bazan N.G., et al.** Prolonged effect of a new platelet-activating factor antagonist on vascular permeability in an endotoxin model of uveitis // *Curr. Eye Res.* 1991. Vol. 10. P. 19-24
18. **Lu Y., He S., Jia L., et al.** Two mouse models for recoverin-associated autoimmune retinopathy // *Mol. Vis.* 2010. Vol. 16. P. 1936-1948.
19. **Lu Y., Jia L., He S., Hurley M.C., et al.** Melanoma-associated retinopathy: a paraneoplastic autoimmune complication // *Arch. Ophthalmol.* 2009. Vol. 127. P. 1572-1580.
20. **Masli S., Vega J.L.** Ocular Immune Privilege Sites // In: *Suppression and Regulation of Immune Responses: Methods and Protocols* (Ed. Cuturi MC and Anegon I). Series: *Methods in Molecular Biology*. 2011. Vol. 677 (Part 3). P. 449-458.
21. **Nussenblatt R.B., Whitcup S.M.** Uveitis: *Fundamentals and Clinical Practice*. 4<sup>th</sup> ed. Mosby. 2010.
22. **Pennesi G., Mattapallil M.J., Sun S.-H.** A humanized model of experimental autoimmune uveitis in HLA class II transgenic mice // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 111 (8). P. 1171-1180.
23. **Rosenbaum J.T.** Future for biological therapy for uveitis // *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2010. Vol. 21 (6). P. 473-437.
24. **Rosenzweig H.L., Galster K., Vance E.E., et al.** NOD2 deficiency results in increased susceptibility to peptidoglycan-induced uveitis in mice // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. doi: 10.1167/iovs.10-6263.
25. **Rosenzweig H.L., Martin T.M., Jann M.M., et al.** NOD2, the gene responsible for familial granulomatous uveitis, in a mouse model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49 (4): 1518-1524
26. **Rosenzweig H.L., Kawaguchi T., Martin T.M. et al.** Nucleotide oligomerization domain-2 (NOD2)-induced

- uveitis: dependence on IFN- $\gamma$  // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. Vol. 50 (4). P. 1739-1745.
27. **Scharl M., Rogler G.** Microbial sensing by the intestinal epithelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // Int. J. Inflam. 2010. Article ID 671258. doi: 10.4061/2010/671258.
28. **Smith J.R., Hart P.H., Williams K.A.** Basic pathogenic mechanisms operating in experimental models of acute anterior uveitis // Immunol. Cell Biol. 1998. Vol. 76. P. 497-512.
29. **Shiraga S., Adamus G.** Mechanism of CAR syndrome: anti-recoverin antibodies are the inducers of retinal cell apoptotic death via the caspase 9- and caspase 3-dependent pathway // J. Neuroimmunol. 2002. Vol. 132 (1-2). P. 72-82.
30. **Smith J.R., Rosenbaum J.T., Williams K.A.** Experimental melanin-induced uveitis: experimental model of human acute anterior uveitis // Ophthalmic Res. 2008. Vol. 40. P. 136-140.
31. **Sugita S.** Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2009. Vol. 57 (4). P. 263-268.
32. **Sugita S., Futagami Y., Smith S.B., Naggar H., Mochizuki M.** Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta // Exp. Eye Res. 2006. Vol. 83 (6). P. 1459-1471.
33. **Takeda K., Kaisho T., Akira S.** Toll-like receptors // Annu. Rev. Immunol. 2003. Vol. 21. P. 335-376.
34. **Tang J., Zhu W., Silver P.B., et al.** Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype // J. Immunol. 2007. Vol. 178 (9). P. 5578-5587.
35. **Van Duist M.M., Albrecht M., Podswiadek M., et al.** A new CARD15 mutation in Blau syndrome // Eur. J. Hum. Genet. 2005. Vol. 13. P. 742-747.

## Modelling of uveoretinitis and retinopathy as a tool for study of their immunopathogenesis

Z.H. Dikinov, I.V. Evsegneeva, O.V. Kalyuzhin

Modelling of uveoretinitis and retinopathy in animals and cell cultures was a key step to discovery of immune mechanisms of intraocular inflammation and development of methods for biotherapy of uveal and retinal diseases. In this review, the advantages and shortcomings of uveoretinitis and retinopathy models have been analyzed in terms of adequacy of human disease reproduction.

**Key words:** uveoretinitis, retinopathy, experimental models, immunopathogenesis.

## Ультраструктурные изменения ациноцитов поджелудочной железы крыс в динамике развития врожденного гипотиреоза

О.В. Остапенко, Ю.Б. Чайковский

Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Контактная информация: Остапенко Ольга Валериевна, [stepashca@mail.ru](mailto:stepashca@mail.ru)

---

С помощью гистологического и электронно-микроскопического анализа изучено морфофункциональное состояние секреторных клеток поджелудочной железы при врожденном гипотиреозе. В эксперименте показано развитие дистрофических изменений у животных в возрасте 7 суток и компенсаторно-приспособительных у животных в возрасте 45 суток.

**Ключевые слова:** врожденный гипотиреоз, ультраструктура, поджелудочная железа.

---

### Введение

На сегодняшний день актуальным является изучение проблемы недостатка гормонов щитовидной железы. Тиреоидные гормоны, обладая широким спектром биологического действия, транслируют свой биохимический, физиологический и патологический эффект на важнейшие метаболические звенья организма, контролируя ряд сложных биохимических превращений белкового, углеводного, липидного и водно-солевого обмена. А также влияют на активность и организацию аппарата синтеза белка в клетке, интенсивность транспорта электролитов, ионов, субстратов, тем самым повышая эффективность биоэнергетических реакций. При гипотиреозе поражаются многие органы и системы организма, в том числе и органы пищеварительной системы [1-3, 5]. Изучение процессов, происходящих в поджелудочной железе при гипотиреозе, является важным направлением в медицине и биологии.

**Цель** настоящего исследования состояла в изучении особенностей строения экзокринной части поджелудочной железы крыс с врожденным гипотиреозом на разных сроках постнатального периода.

### Материалы и методы

Опыт был проведен на 56 беспородных белых крысах-самцах массой 9,5-11,1 г (7 суток), 119,5-128,1 г (45 суток). Животные были разделены на четыре группы: 1 и 2 – интактные животные в возрасте 7 и 45 суток; 3 группа состояла из животных с врожденным гипотиреозом в возрасте 7 суток; и 4 группа – животные с врожденным гипотиреозом в возрасте 45 суток.

Беременным самкам *per os* вводили препарат мерказолил, для подавления функций щитовидной железы самок, таким образом, моделировали потомству врожденный гипотиреоз. Препарат вводили в течение всего эксперимента ежедневно в дозе 20 мг/кг массы тела, растворенным в воде. Новорожденные

крысята получали препарат с молоком матери. На 7 и 45 сутки после рождения контрольных и экспериментальных животных выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом [4].

Все эксперименты на животных были проведены с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), а также согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных. Содержание лабораторных животных отвечало «Общепринятым этическим принципам экспериментов над животными», утвержденным 20.09.2001 Первым Украинским национальным конгрессом по биоэтике.

Для электронно-микроскопического исследования фрагменты поджелудочной железы размером 1 мм<sup>3</sup> фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO<sub>4</sub>, затем проводили дегидратацию в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Заливали в эпон-аралдитовые блоки согласно общепринятой методике. С помощью ультрамикротомы LKB III изготавливали полутонкие и ультратонкие срезы. Полутонкие срезы окрашивали двухцветной окраской по Nayat [6]. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом. Ультраструктурные изменения в клетках поджелудочной железы изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ПЭМ-125К.

Кроме того, методом иммуноферментного анализа в крови определяли содержание свободного тироксина в плазме с помощью прибора «Sunrise RC» фирмы ТЕКАН (Швейцария).

При статистической обработке полученных результатов определяли средние значения параметров и ошибки средних. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t* критерия Стьюдента. За уровень достоверности статистических показателей принято  $p < 0,05$ .

### **Результаты и их обсуждение**

В постнатальном периоде поджелудочная железа крыс контрольной группы представлена плоским, диффузным органом с непостоянными очертаниями, состоящим из отдельных маленьких гроздевидных долек, связанных рыхлой соединительной тканью в одно древоподобное разветвляющееся образование.

Постепенно происходит созревание и дифференцировка органа, изменяется функциональная активность органа и ферментный состав секреторного материала. У молодых животных многие группы ферментов не столь активны как у взрослых, с возрастом увеличивается активность протеаз, липаз и ферментов, расщепляющих углеводы. Изменяется процентное соотношение клеток с гранулами и без (приближается к показателям 50:50), а также количество клеток, содержащих липидные включения (табл.).

Гистологическое исследование полутонких срезов поджелудочной железы под световым микроскопом показало, что в период молочного кормления (7 сутки) клеточный состав паренхимы органа характеризуется морфологиче-

ским разнообразием. Четко визуализируются темные и светлые клетки, одноядерные и двуядерные ациноциты. Аналогичные клетки отмечаются в паренхиме поджелудочной железы у животных в возрасте 45 суток. Следует отметить, что у 7-ми-суточных животных встречаются малодифференцированные клетки небольших размеров со слабо развитыми органеллами.

#### *Врожденный гипотиреоз 7 суток*

Методом иммуноферментного анализа было установлено снижение уровня свободного тироксина в два раза. При врожденном гипотиреозе отмечается отставание в развитии – уменьшение массы тела животных, на 11,64% по сравнению с контрольной группой. Ряд авторов отмечают отставание в развитии животных (уменьшение массы тела, уменьшение массы органов) на ранних этапах врожденного гипотиреоза. В развитии и созревании организма и органов гормоны щитовидной железы играют главенствующую роль именно на ранних этапах (в юном возрасте), по сравнению с взрослым организмом (в зрелом возрасте). Происходит наложение возрастных изменений органа и изменений, связанных с врожденным гипотиреозом.

Патологическое состояние отмечается на всех уровнях организации, в том числе и на клеточном уровне. С помощью методов световой микроскопии было установлено, что увеличено количество клеток со светлой цитоплазмой. Это обусловлено как снижением функциональной активности, так и патологическими изменениями, происходящими в органе на фоне врожденного гипотиреоза.

Светлые клетки характеризуются изменением структурной организации секреторного аппарата. Цистерны гранулярной эндоплазматической сети частично теряют параллельный ход и укорачиваются, превращаясь в укороченные мешочки и вакуоли (рис. 1). В результате ход цистерн становится хаотичным и неупорядоченным. Цитоплазма заполняется пузырьками и вакуолями, размеры которых сильно варьируют. Следует отметить, что на мембранах гранулярной эндоплазматической сети уменьшается количество рибосом. Увеличение агранулярной эндоплазматической сети сопровождается нарушением синтетических процессов веществ белковой и липидной природы. В базальной части ациноцитов наблюдаются липидные включения. Цистерны комплекса Гольджи расширяются и образуют вакуоли. Недостаток гормонов щитовидной железы так же негативно сказывается и на энергетическом аппарате клетки. Количество митохондрий резко снижается, по сравнению с контролем. Органеллы приобретают округлую форму, матрикс митохондрий просветлен. Внутренняя, а некоторых случаях и наружная, мембрана становится прерывистой, теряет свою целостность. Однако в цитоплазме встречаются более мелкие митохондрии, с электронно плотным матриксом и слабо различимыми кристами.

В апикальной части ациноцитов отмечается скопление большого количества секреторных гранул, размеры и электронная плотность которых также варьирует. Зимогенные гранулы содержат секрет разной степени зрелости (гранулы зимогена и прозимогена), что связано с разной степенью созревания продукта секреции и функциональной

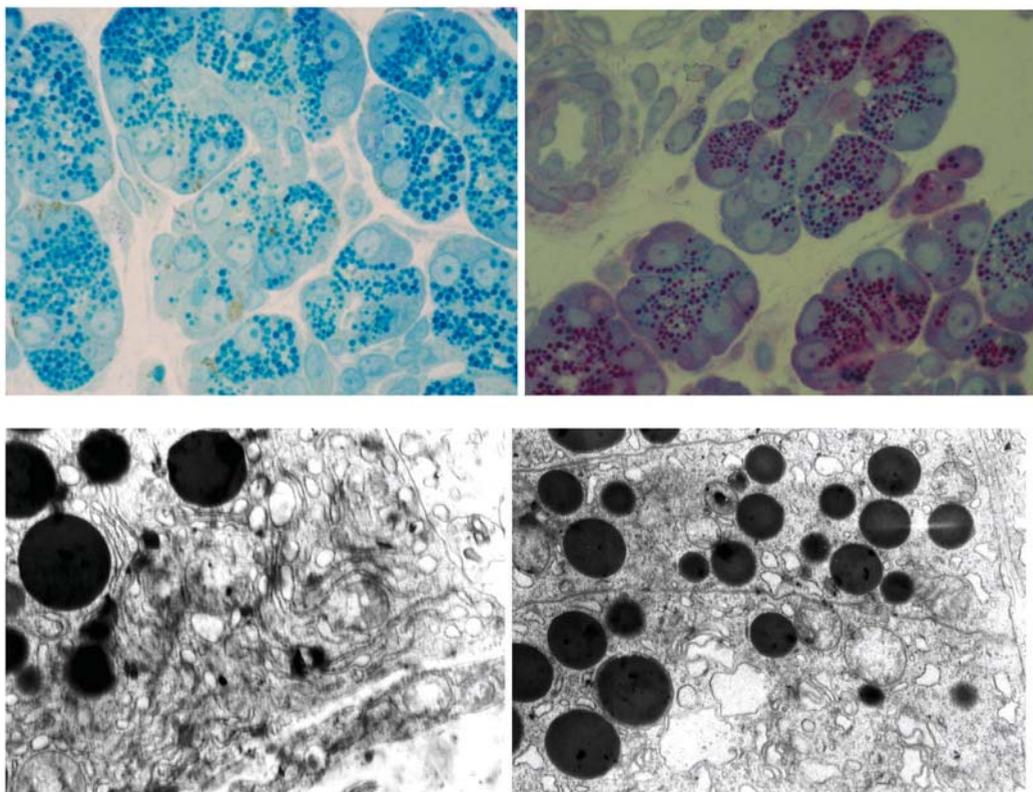


Рис.1. Фрагменты поджелудочной железы крыс с врожденным гипотиреозом в возрасте 7 суток. Скопление большого количества секреторного материала в ациноцитах. Скопление липидных включений в базальной части клеток. Полутоновые срезы. Окраска толуидиновым синим, по Науат. Ув.  $\times 1200$  (А, Б). Ультраструктурные изменения ациноцитов. Дезорганизация цистерн эндоплазматической сети, комплекса Гольджи (В). Нарушение целостности мембран митохондрий (Г). Ув.  $\times 9600$ (В),  $\times 8000$  (Г).

дисфункции. Скопление секреторного материала в апикальной и средней части клетки сопровождается нарушением процесса его выделения в просвет ацинуса. У животных в возрасте 7 суток с ВГТ резко снижается количество клеток, содержащих зимогенные гранулы, а также количество клеток в состоянии экструзии (табл.).

В темных ациноцитах описанных выше изменений не наблюдается. Темные клетки характеризуются относительной целостностью органелл. Возможно, это связано с тем, что клетки,

находясь на разных стадиях жизненного цикла и секреторного цикла, в разной степени реагируют на недостаток тиреоидных гормонов.

#### *Врожденный гипотиреоз 45 суток*

У животных в возрасте 45 суток отмечается снижение уровня свободного тироксина и увеличение массы тела на 4,36%, по сравнению с контролем. С возрастом секреторный процесс изменяется, урегулируется. Количество клеток, содержащих секреторные гранулы, уменьшается и, соответственно,

## Описательная статистика секреторных клеток поджелудочной железы крыс в контроле и при врожденном гипотиреозе

Параметры	Возраст животных			
	7 суток		45 суток	
	Контроль	ВГТ	Контроль	ВГТ
Ациноциты с гранулами	$7,76 \pm 0,43$ 86,22%	$8,66 \pm 0,35$ 98,97%	$4,19 \pm 0,14$ 56,55%	$7,41 \pm 0,38^*$ 92,39%
Ациноциты без гранул	$1,24 \pm 0,26$ 13,78%	$0,09 \pm 0,05^{*,**}$ 1,03%	$3,22 \pm 0,17$ 43,45%	$0,61 \pm 0,15^{*,**}$ 7,61%
Ациноциты, выделяющие секрет	$3,03 \pm 0,44$ 33,67%	$0,79 \pm 0,15^{*,**}$ 9,03%	$2,84 \pm 0,17$ 38,33%	$6,94 \pm 0,39^{*,**}$ 86,53%
Клетки с липидами	$0,62 \pm 0,19$	$1,79 \pm 0,22^{*,**}$	$0,16 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,14^{*,**}$
	58	58	58	66

*Примечание:* Данные в таблице представлены в виде  $M \pm m$  для всех групп животных:

\* – достоверные отличия от группы контроля К ( $p < 0,05$ );

\*\* – достоверные отличия от первой группы ( $p < 0,05$ ).

увеличивается количество клеток без секреторных гранул. Однако процент клеток, выделяющих секрет, значительно не отличается (33,67% и 38,33%). Врожденный гипотиреоз более длительного периода (45 суток) приводит к ускорению процесса экстрюзии, наблюдается резкое увеличение количества клеток, содержащих и выделяющих секрет, по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста (табл.).

Электронно-микроскопическое исследование показало, что на более поздних сроках эксперимента разнообразие клеточного состава сохраняется, но в меньшей степени (по сравнению с предыдущим сроком). Четкого разделения на темные и светлые клетки на полутонких срезах не наблюдается (рис. 2).

Большая часть клеток характеризуется незначительным расширением цистерн эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Параллельный ход цистерн сохраняется. В отдельных участках цитоплазмы на месте мембран-

ных органелл образуются миелиноподобные тельца.

В цитоплазме встречаются митохондрии двух типов. Часть митохондрии округлой формы, просветленным матриксом и слабо развитыми кристами. Встречаются органеллы с признаками нарушения целостности мембран. Второй тип – митохондрии удлиненной палочковидной формы, электронно-плотным матриксом и слабо различимыми кристами.

В апикальной части клеток скопление секреторных гранул с зимогеном и прозимогеном. Количество секреторных гранул снижено по сравнению с предыдущим сроком наблюдений. Нарушения процессов секреции не наблюдается.

Поджелудочная железа крысы и человека существенно отличается внешним видом (формой, размерами, расположением), однако имеет принципиально схожую внутреннюю структуру. Поэтому установленные изменения в ациноцитах поджелудочной железы

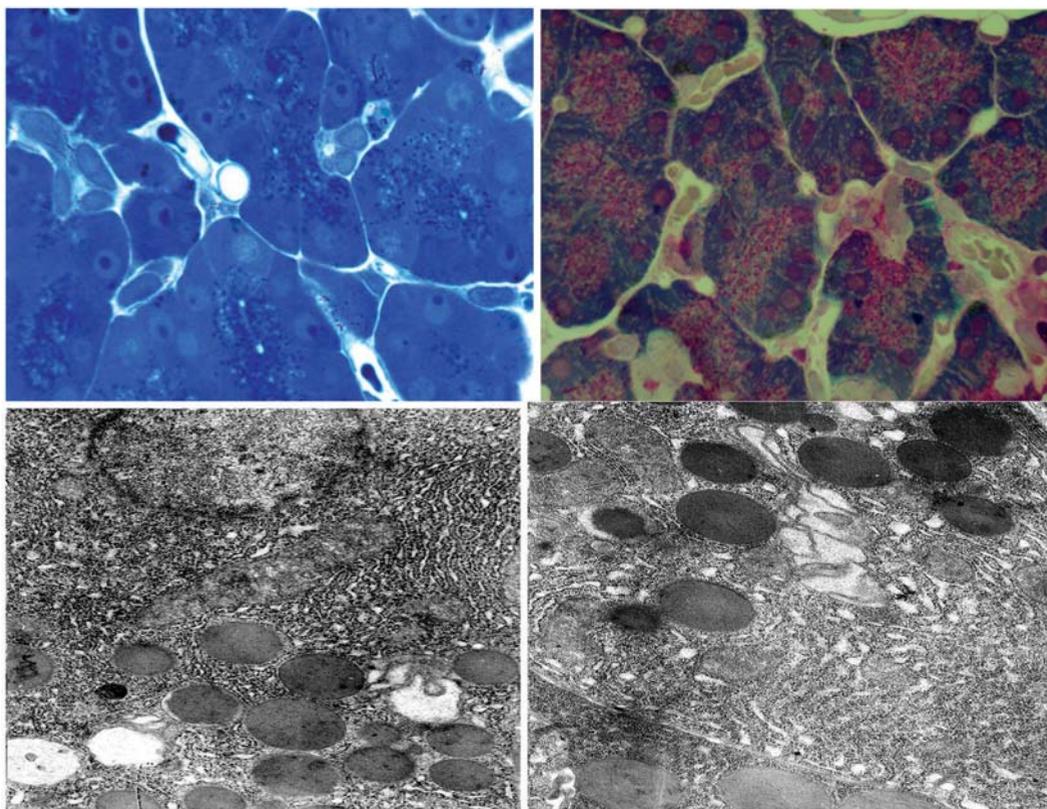


Рис. 2. Фрагменты поджелудочной железы крыс с врожденным гипотиреозом в возрасте 45 суток. Зональность ациноцитов. Скопление зимогенных гранул в апикальной части ациноцитах. Отсутствие липидных включений в базальной части клеток. Полутопкие срезы. Окраска толуидиновым синим, по Nayat. Ув.  $\times 1200$  (А, Б). Ультраструктурные изменения ациноцитов. Расширение цистерн эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Удлиненные митохондрии с электрон плотным матриксом. Образование миелоноподобных тел. Ув.  $\times 9600$  (В, Г).

при врожденном гипотиреозе могут учитываться при дальнейшем изучении механизмов нарушения экзокринной функции этого органа у людей разных возрастных групп.

### Выводы

При развитии врожденного гипотиреоза на ранних этапах отмечается отставание в развитии. Про задержку процессов дифференцировки в экзокринной части поджелудочной железы свидетельствует недостаточное форми-

рование синтетического аппарата, что оказывает влияние на процессы синтеза и секреции ферментов.

Выявленные изменения структурной организации экзокринной части поджелудочной железы в ранние сроки врожденного гипотиреоза (7 суток) носят реактивный характер и свидетельствуют о дезорганизации секреторного эпителия поджелудочной железы, а на более поздних сроках (45 суток) преобладают компенсаторные процессы над деструктивно-дистрофическими.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости ранней диагностики врожденного гипотиреоза и обязательной терапевтической коррекции данных изменений.

### Список литературы

1. *Кузьменко Ю.Ю., Божко О.Г.* Особливості структурних змін нефрону в динаміці розвитку вродженого гіпотиреозу // Вісник проблем біології та медицини. 2013. Вип.1. Т.1(98). С. 125-128.
2. *Остапенко О.В.* Морфофункциональное состояние печени крыс при коррекции гипотиреоза L-тироксином в комплексе с кальцитонином // Український науково-медичний молодіжний журнал. 2013. № 1. С.19-21.
3. *Чухрай С.М.* Ультраструктура кровоносних капілярів міокарда статевозрілих щурів із вродженим гіпотиреозом // Світ медицини та біології. 2010. № 4. С.164-168.
4. Эвтаназия экспериментальных животных (методические рекомендации по выведению животных из эксперимента). М: Наука. 1985. 32 с.
5. *Athea Y., Garnier A., Fortin D., et al.* Mitochondrial and energetic cardiac phenotype in hypothyroid rat. Relevance to heart failure // Pflugers Arch 2007. Vol. 455(3). P. 431-442.
6. *Hayat M.A.* Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications // Macmillan Press. 1989. P. 470.

## Ultrastructural changes of rats pancreas acynocytes in the dynamics of congenital hypothyroidism development

O.V. Ostapenko, Yu.B. Chaikovsky

By means of histological and electron microscopic analysis is studied the morphofunctional state of the secretory pancreas cells in congenital hypothyroidism. The experiment shows the development of dystrophic changes of in the animals at the age of 7 days and compensatory adaptive animals at the age of 45 days.

**Key words:** congenital hypothyroidism, ultrastructure, pancreas.

## Моделирование патологии печени рыб при помощи парацетамола

Г.И. Пронина<sup>1</sup>, Н.Ю. Корягина<sup>2</sup>, А.О. Ревякин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

Контактная информация: к.б.н. Артем Олегович Ревякин, scbmt@yandex.ru

Введение молодежи карпа парацетамола *per os* в дозе 500 мг/особь в смеси с водой и с 50% спиртом вызывает патологию печени. У опытных рыб увеличиваются индексы желчного пузыря и почек, снижается индекс печени, нарушается морфологическая структура клеток периферической крови, происходят изменения в лейкоцитарной формуле.

**Ключевые слова:** моделирование патологии, парацетамол, рыбы, индексы внутренних органов лейкограмма, фагоцитарная активность нейтрофилов.

### Введение

При исследованиях в области медицины нередко возникает необходимость вызывать патологию для нахождения оптимальных способов лечения различных болезней, углубленного изучения функций органов и систем. Одним из основных путей решения данной проблемы является использование комплексного моделирования на классических и альтернативных биологических объектах и экстраполяция на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных [2, 5, 6, 7].

В качестве альтернативных биомodelей целесообразно использовать пойкилотермных гидробионтов по ряду причин:

- по этическим соображениям, так как эти организмы находятся на более низкой ступени эволюционного древа;
- они являются более доступными объектами исследования;

- у них легче вызвать патологию, так как данные организмы являются обитателями водной среды и полностью зависят от температуры окружающей среды;
- холоднокровные гидробионты имеют специфические особенности, изучение которых позволит выявить фундаментальные физиологические механизмы, в т.ч. в эволюционном аспекте.

За последние десятилетия использование рыб как животных для исследований значительно увеличилось [16, 17, 21]. Относительно восприятия болевых импульсов у рыб ведутся дебаты, однако большинство авторов склонны считать, что у рыб понижен болевой порог чувствительности [14, 18, 22].

Рыбы представляют самый старый и самый разнообразный класс позвоночных животных, включая приблизительно 48%

известных существующих разновидностей подтипа *Vertebrata* (Позвоночные). Их эволюционное положение относительно тех или других позвоночных животных, вместе с их высокими адаптивными мощностями, делает их ценными объектами для исследования в различных отраслях биологии. Как следствие, рыбы используются в качестве экспериментальных моделей в исследованиях биомедицины, рака, экологии, экологической токсикологии, эндокринологии, геронтологии, генетики, молекулярного развития, нейробиологии, фармакологии и др. [11, 19].

### Материалы и методы

В данной работе проведено моделирование патологии печени у рыб с помощью парацетамола. Препарат выбран из-за его доступности, относительно низкой стоимости и быстрого токсического эффекта, усиливающегося при добавлении спирта.

Парацетамол (международное название: paracetamol; ацетаминофен; парацетаминофен; N-(4-гидроксифенил)-ацетамид; 4-гидроксиацетанилид) применяется как жаропонижающее и анальгезирующее средство. Однако препарат обладает гепатотоксическим и нефротоксическим действием. Он блокирует обе формы фермента циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), ингибируя синтез простагландинов (P<sub>g</sub>). В периферических тканях клеточные пероксидазы нейтра-

лизуют влияние парацетамола на ЦОГ. Метаболизация парацетамола в печени происходит, в основном, путём конъюгации с глюкуроновой и серной кислотой с образованием нетоксичных метаболитов глюкорангида и сульфата парацетамола. В меньшем количестве под влиянием цитохрома P450 образуются ещё два метаболита, которые обладают токсическим действием: парааминофенол и N-ацетилбензохинон. Под влиянием парааминофенола образуется метгемоглобин; в результате происходит кислородное голодание тканей. N-ацетилбензохинон обладает повреждающим действием по отношению к клеткам печени, вызывая их некроз. При применении парацетамола в терапевтических дозах N-ацетилбензохинон обезвреживается глутатионом и после конъюгации с цистеином и меркаптуровой кислотой выделяется почками. При приёме в высоких дозах (выше 150 мг/кг) возникает дефицит глутатиона и повышается уровень N-ацетилбензохинона, что может привести к некрозу ткани печени. Выводится парацетамол из организма с мочой, в основном, в виде метаболитов (в виде глюкуроновых конъюгатов (60–80%) и сульфоконъюгатов (20–30%) и незначительно (3-5%) в неизменном виде [13, 15]).

В настоящей работе парацетамол вводили двухлеткам карпа, выращенным в аквариальных условиях при невысокой температуре (13-16 градусов

Таблица 1

Схема введения препаратов молоди карпа

Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
	<i>per os</i> через день 7 раз		
Контроль без введения препаратов	Парацетамол 500 мг/рыбу + 1 мл 50% спирта	1 мл 50% спирта	Парацетамол 500 мг/рыбу + 1 мл дистиллированной воды

Цельсия) *per os* в дозе 500мг/на рыбу через день 7 раз, масса рыб составляла: 16-45 г. Рыбы группы 2 получали препарат в смеси с 1 мл 50% спирта; группе 4 давали парацетамол в водной суспензии (с 1 мл воды). Группы 1 и 3 – контрольные (табл. 1).

### Результаты и их обсуждение

Показатели эритропоза и дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови осуществлялся микроскопически на цифровом микроскопе Optika DM 15. Уровень гемопоза оценивался по доле незрелых форм эритроцитов.

Биохимические показатели определяли на анализаторе Chem Well Awareness Technology.

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась цитохимическим методом по М.Г. Шубичу [10] в модификации для гидробионтов Г.И. Прониной [8]. Определялся средний цитохимический коэффициент (СЦК) содержания высокоцитотоксичного не-

ферментного катионного белка в нейтрофилах крови.

Результаты исследований показали, что через 1 мес. эксперимента (через две недели после окончания медикаментозного курса) в опытных группах с парацетамолом (№2 и 4) отмечаются изменения: снижение индекса печени и небольшое увеличение индекса почек (рис. 1). Что закономерно, так как происходила детоксикация препарата в печени и выведение его почками. При этом у рыб данных групп наблюдалась дряблость печени и некротизированные участки в ней. А также отложения и инкапсуляция парацетамола размером с просыное зерно в печени, а у рыб 2-й группы и в почках. Почки рыб 4-й группы дряблой консистенции.

В группе № 3 изменения менее значительны, органы без очагов некроза. Печень дряблая с зелеными включениями.

В группе №4, и в меньшей степени, в группе №2 у рыб отмечено увеличение желчного пузыря и скопление в нем желчи (рис. 2-4). Соответственно, индекс желчного пузыря с содержимым в этих группах был высоким (рис. 5).

## Индексы печени и почек

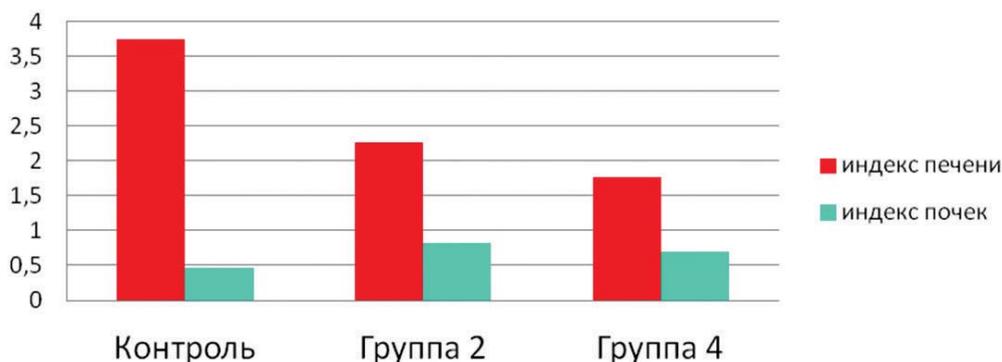


Рис. 1. Индексы печени и почек через месяц эксперимента

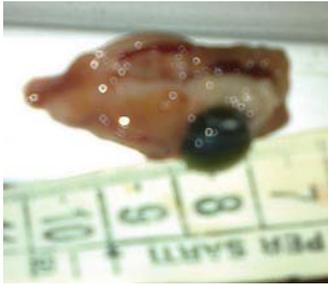


Рис. 2. Печень с увеличенным желчным пузырем.

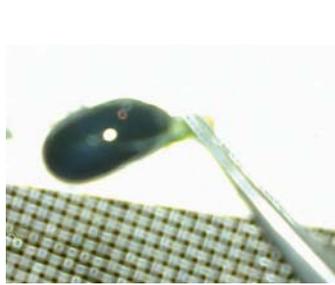


Рис. 3. Извлеченный желчный пузырь.

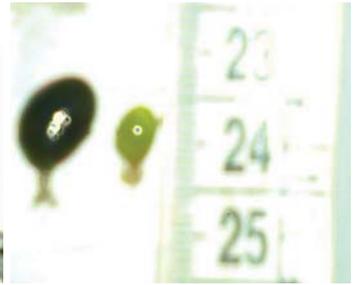


Рис. 4. Сравнение желчного пузыря опытной рыбы с контролем.

Закономерность динамики глюкозы на протяжении опыта не прослеживалась. Гомеостаз глюкозы часто нарушается при циррозе печени, так как печень участвует в поддержании нормального уровня глюкозы в сыворотке крови путем гликогеногенеза, гликогенолиза и глюконеогенеза. Следовательно, в нашем эксперименте у опытных рыб цирроз печени не происходило.

Гематологическая картина показала нарушения морфологии клеток периферической крови у опытных рыб (группы

2 и 4). Обнаружены следующие изменения: эритробласты с деформированным ядром, цитоллиз лимфоцитов, глыбки хроматина в ядрах нормобластов и зрелых эритроцитов, эритроциты с псевдоподиями (рис. 6-8).

Достоверных различий интенсивности эритропоэза в экспериментальных группах не отмечено (табл. 2). Уровень лейкопоэза, судя по относительному количеству бластных форм лейкоцитов (миелобластов, промиелоцитов), наименее интенсивен в группе №2. Вероят-

### Индекс желчного пузыря, %

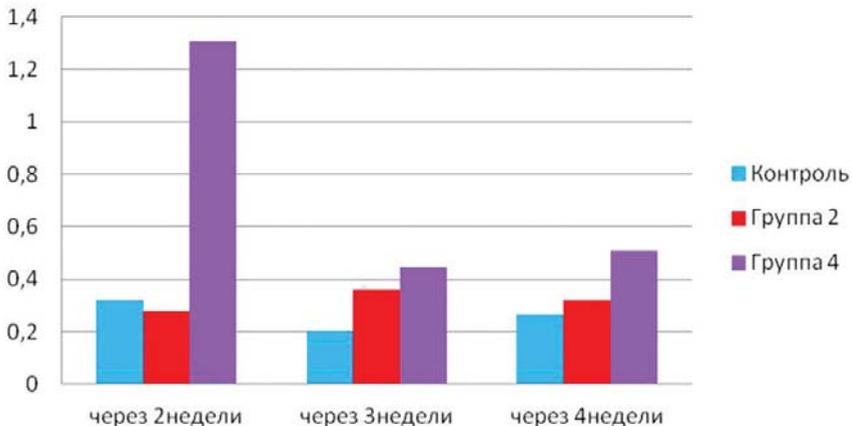


Рис. 5. Индекс желчного пузыря с содержимым в эксперименте.

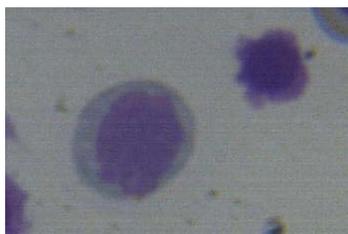


Рис. 6. Эритробласт со смещенным ядром, начало кариолиза; цитоллиз лимфоцита.



Рис. 7. Уплотнение хроматина в ядре нормобласта.



Рис. 8. Эритроциты с псевдоподиями, в ядрах глыбки хроматина.

но, введение парацетамола со спиртом несколько затормозило процесс. В лейкограмме экспериментальных карпов велика доля эозинофилов. Вероятно, причина в активации системы комплемента при детоксикации. В литературе

имеются сведения и о том, что высокий уровень эозинофилов крови может быть связан с дефицитом ионов магния в организме [1, 3, 9].

Следует отметить, что в группе рыб №3, получавших 50% спирт без пара-

Таблица 2

Гематологические и цитохимические показатели молоди карпа

Показатели	Группы рыб			
	№1	№2	№3	№4
Эритропоэз, %				
Гемоцитобласты, эритробласты	0,6±0,2	1,4±0,5	0,3±0,3	0,9±0,3
Нормобласты	3,3±0,4	3,8±0,4	4,5±1,2	3,4±0,8
Базофильные эритроциты	12,5±1,2	12,6±1,5	15,8±4,5	12,1±1,7
Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов	83,6±1,4	82,2±1,4	79,5±5,6	83,6±2,1
Лейкоцитарная формула, %				
Миелобласты	-	-	0,3±0,3	0,3±0,2
Промиелоциты	0,4±0,2	-	0,3±0,3	0,1±0,1
Миелоциты	0,4±0,2	0,2±0,2	0,5±0,3	0,9±0,5
Метамиелоциты	1,2±0,4	0,8±0,5	0,8±0,5	0,9±0,3
Палочкоядерные нейтрофилы	1,3±0,4	0,6±0,4	1,8±0,9	2,4±1,2
Сегментоядерные	2,0±0,3	1,4±0,6	0,7±0,4*	2,9±0,7
Всего нейтрофилов	3,3±0,6	2,0±0,7	2,5±0,9	5,3±1,7
Эозинофилы	0,3±0,1	1,0±0,2*	0,3±0,3	1,0±0,3*
Базофилы	0,2±0,1	0,2±0,2	0,5±0,3	0,7±0,2
Моноциты	2,5±0,5	2,0±0,3	1,8±0,9	3,7±0,8
Лимфоциты	92,3±1,2	93,6±0,9	93,3±1,7	87,1±1,9
Фагоцитарная активность				
СЦК	1,94±0,04	1,92±0,11	1,93±0,22	1,97±0,07

Примечание: \* – различия достоверны по сравнению с 1 группой (контролем).

цетамола снижена, доля зрелых сегментоядерных нейтрофилов. В литературе имеются сведения об активации апоптоза и, следовательно, разрушения нейтрофилов у людей при злоупотреблении алкоголя [4].

Таким образом, при введении парацетамола *per os* по 500 мг/особь через день 7 раз у молодежи карпа отмечались нарушения как на органном, так и на клеточном уровне. Действие препарата усиливается смешиванием с 50% спиртом.

### Список литературы

1. **Абрамьчев А.Н., Иванов В.Г., Гриншпун Л.Д.** Эозинофилии различной природы // *Терапевт. арх.* 1985. № 7. С. 88-91.
2. **Адо А.Д.** (Ред.) Патологическая физиология. М.: Триада-Х. 2000. 574 с.
3. **Волкова Е.С.** Экспериментальное моделирование патологии печени и механизмы ее коррекции // *Дисс. канд. биол. наук.* Уфа. 2003. 297 с.
4. **Жернова Е.В., Вялова Н.М., Ивановна С.А., Бохан Н.А.** Показатели запрограммированной гибели лимфоцитов и нейтрофилов у лиц с алкогольной интоксикацией в динамике терапии препаратом с антиоксидантными свойствами // *Вестник Томского государственного педагогического университета.* Томск. 2009. Вып. 3 (81). С. 59-61.
5. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК. 2005. 608 с.
6. **Корягина Н.Ю., Пронина Г.И., Ревякин А.О.** Сравнительная характеристика альтернативных биомоделей по гематологическим и биохимическим показателям // *Биомедицина.* 2010. № 2. С. 68-70.
7. **Крыжановский Г.Н.** Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // *Вест. Рос. АМН.* 1997. № 5. С. 60-62.
8. **Пронина Г.И.** Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья // *Известия ОГАУ.* №4 (20). Оренбург. 2008. С. 160-163.
9. **Сорока Н.Ф., Савченко М.А.** Современные представления о роли эозинофилов в организме и гиперэозинофильных синдромах // *Медицинские новости.* 1995. № 3. С. 17-29.
10. **Шубич М.Г.** Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // *Ж. Цитология.* 1974. № 10. С. 1321-1322.
11. **Bolis C., Piccolella M., Dalla Valle A.Z., Rankin J.C.** Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research* 44. 2001. P. 265-280.
12. **Borski R.J., Hodson, R.G.** Fish research and the Institutional Animal Care and Use Committee. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 44. 2003. P. 286-294.
13. **Brodie B.B., Axelrod J.** The fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material // *J Pharmacol Exp Ther.* 1949. 94 (1). P. 58-67.
14. **Cameron, A.A., Plenderleith, M.R. & Snow, P.J.** Organization of the spinal cord in four species of elasmobranch

- fish: Cytoarchitecture and distribution of serotonin and selected neuropeptides. *Journal of Comparative Neurology* 297. 1990. P. 210-218.
15. **Chandrasekharan N.V., Dai Hu, Roos K.L.T., Evanson N.K., Tomsik J., Eilton T.S., Simmons D.L.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression // *Proc Natl Acad Sci. – USA*. 2002. T. 99. № 21. P.13926-13931.
16. **Evans D.H., Claiborne J.B.** *The Physiology of Fishes*. 3th edn. 2005. 616 p.
17. **Johansen R., Needham J.R., Colquhoun D.J., Poppe T.T., Smith A.J.** Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* 40. 2006. 323-340.
18. **Leonard R.B.** Primary afferent receptive field properties and neurotransmitter candidates in a vertebrate lacking unmyelinated fibres. *Progress in Clinical Biological Resources* 176. 1985. P. 135-145.
19. **Ostrander G.** *The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals)*. 678pp. Waltham. MA. USA: Academic Press Inc. 2000.
20. **Posner L.P.** Pain and distress in fish: A review of the evidence. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 50. 2009. P. 327-328.
21. **Powers D.A.** Fish as model systems. *Science*. New York 246. 1989. P. 352-358.
22. **Snow P.J., Plenderplait M.B., Wright L.L.** Quantitative study of primary sensory neurone populations of three species of elasmobranch fish. *Journal of Comparative Neurology*. 1993. 334 p.

## Modelling of the fishes liver pathology by paracetamol

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin

Introduction of *per os* paracetamol in a dose of 500 mg / an individual in mix with water and from 50% alcohol to carp thresh is cause of liver pathology. Indexes of a gall bladder and kidneys of experimental fishes increase, the liver index decreases, the morphological structure of cells of peripheral blood is broken, there are changes in a leukocytic formula.

**Key words:** pathology modeling, paracetamol, fishes, indexes of an internal leukogram, phagocyte activity of neutrophils.

## Моделирование лекарственного токсического гепатита на крысах

А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Касинская, О.И. Степанова,  
О.В. Баранова, А.Г. Киселев

*ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область*

*Контактная информация: к.б.н. Артем Олегович Ревякин, scbmt@yandex.ru*

---

В работе представлены данные экспериментального моделирования лекарственного токсического гепатита на крысах. Выявлены дозы и сроки введения парацетамола для получения умеренного хронического гепатита.

**Ключевые слова:** биомодель, токсический гепатит, крысы, парацетамол.

---

### Введение

В последнее время остро стоит проблема токсических поражений внутренних органов, в частности печени, в связи с большим количеством потребляемых лекарств. Токсический гепатит идет «в ногу» с применением лекарств в домашних условиях. В связи с этим, становится актуальным вопрос о защите печени и предотвращении ее заболеваний. Моделирование лекарственного токсического гепатита – необходимая составляющая доклинических исследований гепатопротекторных лекарственных средств.

**Целью** эксперимента являлось получение модели лекарственного токсического гепатита на крысах.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнялись в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России на лабораторных белых аутбредных мышах и крысах. Лабораторные животные поступили из филиала ФГБУН НЦБМТ ФМБА России «Андреевка», пос. Андреевка, Московской

обл. Животные были взяты в эксперимент методом случайной выборки. Кормление осуществлялось стандартным полнорационным комбикормом, поение вволю. Крысы содержались в вентилируемых клетках, по 3 особи. Зоогигиенические параметры содержания были в пределах нормы. Ежедневно всем животным перорально вводили суспензию парацетамола в воде в дозе 500 мг/кг и 1 мл 40% спирта. Длительность введения составила 2 недели. По окончании эксперимента животных умерщвляли путем декапитации с отбором образцов печени для гистологических исследований.

### Результаты и их обсуждение

Дольковое и балочное строение печени сохранено, отмечается умеренно выраженное полнокровие части центральных вен и трети синусоидов. Гепатоциты центральных отделов долек в состоянии белковой дистрофии, единичные клетки в состоянии мелкокапельной жировой дистрофии, часть гепатоцитов с призна-

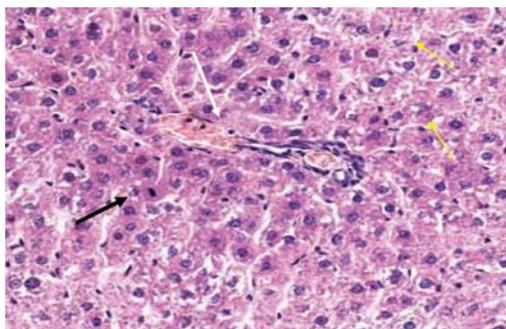


Рис. 1. Полнокровие центральных вен (белая стрелка), глыбчатый распад цитоплазмы гепатоцитов, мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов (желтые стрелки), фигуры митозов (черная стрелка).

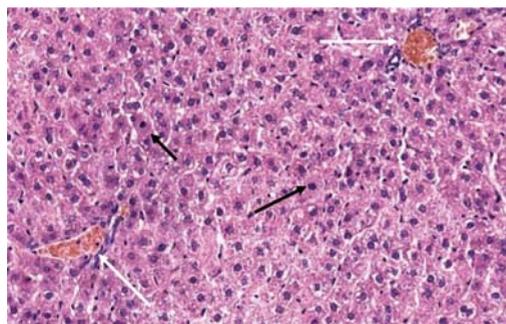


Рис. 2. Полнокровие центральных вен (белая стрелка), глыбчатый распад цитоплазмы гепатоцитов, фигуры митозов (черная стрелка).

ками глыбчатого распада цитоплазмы, пикноза и фрагментации ядер. Портальные тракты не расширены, незначительно инфильтрированы лимфоцитарными элементами, отмечается проникновение части воспалительного инфильтрата в центральные отделы долек с формированием очаговых скоплений в просвете синусоидов (5-10 клеток воспалительного инфильтрата). У части животных отмечаются участки гибели отдельных гепатоцитов и небольших групп гепатоцитов (признаки плазморексиса, кариорексиса, кариолизиса) преимущественно в центральных отделах долек,

отмечаются отдельные гепатоциты с признаками митотической активности (фигуры митозов 1-2 в 4 полях зрения) – рис. 1, 2.

### Выводы

Была получена модель лекарственно-токсического гепатита с умеренными морфофункциональными изменениями печени.

Алкоголь усиливает токсическое действие парацетамола, что может привести к белковой и жировой дистрофии печени, а также к некрозу гепатоцитов.

## Modeling of medicinal toxic hepatitis on rats

A.O. Revyakin, G. D. Kapanadze, N. V. Kasinskaya, O. I. Stepanova,  
O. V. Baranova, A.G. Kiselyov

Data experimental modeling of rats toxic hepatitis are present. Identified doses and timing giving paracetamol for modeling chronic hepatitis.

**Key words:** biomodel, toxic hepatitis, rats, paracetamol.



## ЭЭГ-корреляты ранней стадии болезни Паркинсона в эксперименте на мышах линии C57BL/6

И.Г. Капица, Л.Н. Неробкова, Т.А. Воронина

ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН, Москва

Контактная информация: Капица Инга Геннадиевна, [ingakar73@mail.ru](mailto:ingakar73@mail.ru)

Проведен электроэнцефалографический анализ биоэлектрической активности мозга мышей линии C57BL/6, получавших однократно подкожно 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) в малой дозе (12,5 мг/кг), приводящей к развитию ранней стадии болезни Паркинсона. Показано, что введение МФТП в дозе 12,5 мг/кг не вызывало экстрапирамидных нарушений, но приводило к изменениям в спектре мощности биоэлектрической активности черной субстанции, хвостатого ядра и сенсомоторной коры. Выявлен наиболее устойчивый признак изменений биоэлектрической активности мозга мышей на ранней стадии болезни Паркинсона – усиление спектра мощности в диапазоне бета-частот: в первые сутки наблюдения изменения были более выражены в диапазоне бета<sub>2</sub>-частот, а в дальнейшем – охватывали диапазон бета<sub>1</sub>-частот, и были особенно характерны для областей черной субстанции и хвостатого ядра. Наблюдаемые изменения ЭЭГ могут служить важным прогностическим признаком для ранней диагностики болезни Паркинсона.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, электроэнцефалография, бета-частоты.

### Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – это одно из самых распространенных хронических, прогрессирующих и инкурабельных нейродегенеративных заболеваний людей старшей возрастной группы [19, 21]. Развитие БП – медленный процесс, протекающий бессимптомно на протяжении 4-6 и более лет, до тех пор, пока потеря дофаминергических клеток в черной субстанции не достигнет 50-70% [10, 12]. Согласно современным представлениям, ключевое значение в стратегии борьбы с нейродегенеративными

заболеваниями придается диагностике болезни в ее латентной стадии, еще до появления клинических симптомов [4].

Экспериментальный паркинсонический синдром (ПС), вызванный введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) мышам линии C57BL/6, является наиболее часто используемой и адекватной моделью БП [2, 8, 16, 18], т.к. помимо поведенческих расстройств (олигокинезия, ригидность, тремор, а также ряд вегетативных нарушений) нейротоксин вызывает биохимические изменения, характеризую-

ющиеся селективным и необратимым снижением содержания дофамина и его метаболитов, а также истощением запасов дофамина и снижением активности тирозингидроксилазы в стриатуме, прилежащем ядре и черной субстанции [14, 20]. Применение малых доз МФТП, ещё не вызывающих экстрапирамидных нарушений [11], но приводящих к нейродегенерации дофаминергических нейронов, а также к уменьшению уровня тирозингидроксилазы в стриатуме, без существенного влияния на дофаминергические нейроны черной субстанции [7, 22], используется для моделирования ранней стадии заболевания.

В качестве метода оценки патологических нарушений при ПС предложен электроэнцефалографический анализ (ЭЭГ), как один из методов для диагностики БП и оценки эффективности антипаркинсонической терапии [1, 6]. Целесообразность применения методов ЭЭГ в диагностике БП долгое время дискутировалась из-за отсутствия отчетливых признаков, позволяющих дифференцировать БП и различные паркинсонические синдромы. Однако на сегодняшний день существует все больше доказательств, что БП связана с патологическими синхронными колебаниями в базальных ганглиях, и, в основном, в диапазоне 11-30 Гц. [17, 23].

**Целью** настоящей работы было выявление прогностически значимых ЭЭГ показателей для ранней диагностики проявлений экспериментального ПС.

### **Материалы и методы**

Исследования проводили на самцах мышей линии C57BL/6 массой 28-32 г в возрасте 4-5 мес. полученных из питомника НЦБМТ ФМБА России «Стол-

бовая» (Московская область). Конвенциональные животные содержались при постоянном доступе к корму и воде – использовался полный рацион экструдированного брикетированного корма (ГОСТ на корм Р 50258-92) и питьевая вода. Животные содержались в виварии при температурном режиме 20-22°C, при световом режиме – 12/12 ч, в полипропиленовых клетках с решеткой из цинкохромовой стали, с подстилкой обеспыленной из деревянной стружки, по 10 мышей в каждой клетке (Т/ЗС). Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Наркотизированным животным, согласно координатам стереотаксического атласа [9], вживляли электроды в сенсорную кору, хвостатое ядро, черную субстанцию и гиппокамп, и индифферентный электрод – в носовую кость черепа. Регистрацию биоэлектрической активности мозга проводили в условиях свободного поведения мышей в экранированной камере с использованием 21-канального аппаратно-компьютерного комплекса «Нейро-КМ» (НМФ «Статокин», Москва). Через 5-6 дней после операции проводили запись фоновой биоэлектрической активности мозга мышей, затем вводили МФТП (однократно, подкожно, в дозе 12,5 мг/кг) и записывали ЭЭГ через 10, 20, 60 и 90 мин, 24 ч, 7 и 12 дней после введения нейротоксина. Длительность каждого отрезка записи ЭЭГ составляла не менее 60 с. Компьютерный анализ электрограмм мозга животных проводили с помощью программы «Brainsys»

[5], включавший визуальный и спектральный анализ ЭЭГ и статистическую обработку полученных результатов с использованием нормализованного t-критерия Стьюдента. Оценку двигательных нарушений проводили по стандартной методике [2].

**Результаты и их обсуждение**

Визуальный анализ электрограмм интактных мышей (до введения МФТП) выявил дизритмичный характер фоновой биоэлектрической активности мозга с наличием быстрых и медленных волн в широком диапазоне частот (от 1,5 до 32 Гц), с амплитудой от 10 до 100 мкВ. В электрограммах дорзального гиппокампа отмечалась более регулярная активность в тета1-

диапазоне (4-7 Гц). В электрограммах сенсомоторной области коры отмечалась более низкая амплитуда биоэлектрической активности, чем в электрограммах других структур. Отмеченный характер фоновой биоэлектрической активности отражает работу мозга животных в спокойном состоянии, в норме, и соответствует общепринятым стандартам [13].

При однократном подкожном введении МФТП мышам в дозе 12,5 мг/кг развития экстрапирамидных нарушений на протяжении всего эксперимента не наблюдалось, что согласуется с данными, полученными ранее, об отсутствии моторных и вегетативных нарушений при применении малых доз нейротоксина [11].

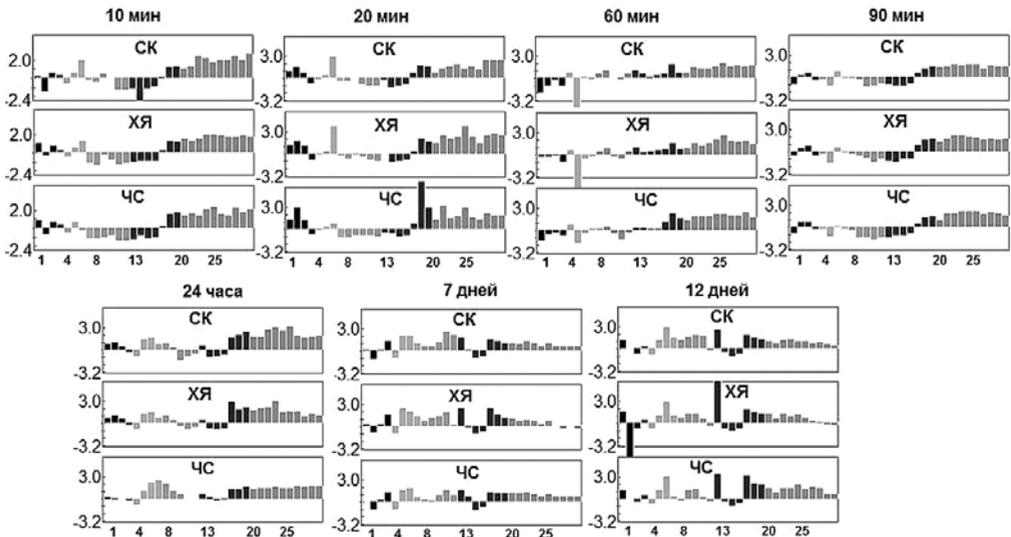


Рис. 1. Автоспектры процентной мощности одного диапазона частоты в % от всего диапазона (сравнение по критерию Стьюдента двух связанных групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при  $p < 0,05$  при  $t > 2,4$ . По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), где N1 – запись ЭЭГ в различные промежутки после введения МФТП (10, 20, 60, 90 мин, 24 часа, 7 и 12 дней), а N2 – фоновая запись до введения МФТП.

По оси абсцисс: диапазоны частот, где области от 1-4 Гц – дельта-, 5-8 Гц – тета 1-, 9-13 Гц – тета 2-, 14-20 – бета1-, 21-30 Гц – бета2 - диапазоны.

ХЯ – хвостатое ядро, СК – сенсомоторная кора, ЧС – черная субстанция.

Однако при отсутствии моторных и вегетативных нарушений у животных выявлялись характерные динамические изменения биоэлектрической активности во всех исследуемых структурах мозга, начиная с первых минут после введения МФТП и на протяжении всего 12-дневного исследования. Наиболее значимые изменения наблюдались в тета- и бета-диапазонах. Так, уже в первые часы после введения нейротоксина в электрограммах всех изучаемых структур отмечалось снижение тета-активности (за исключением отдельных всплесков в диапазоне 5-6 Гц). В дальнейшем (запись через 24 ч, 7 и 12 дней) наблюдалось восстановление тета-активности, и даже некоторое её превышение в диапазоне 5,5-8 Гц по сравнению с фоном (рис. 1).

Наиболее яркие и выраженные изменения частотного спектра мощности были получены при анализе бета-диапазона. Детальный анализ динамики изменения биоэлектрической активности мозга мышей C57BL/6 после однократного введения МФТП показал, что уже через 10 мин отмечалось увеличение мощности спектра в диапазоне бета<sub>1</sub>- и бета<sub>2</sub>-частот в хвостом ядре, черной субстанции и сенсомоторной коре (рис. 2). Через 60 и 90 мин увеличение мощности спектра в диапазоне бета<sub>1</sub>- и бета<sub>2</sub>-частот достигает достоверных изменений во всех исследуемых структурах. Через 24 ч после введения МФТП достоверные изменения ( $t > 2,1$ ) в диапазоне бета<sub>1</sub>- отмечались во всех структурах и бета<sub>2</sub>-частот – в отведениях черной субстанции (рис. 2).

Изменения спектра мощности в структурах мозга мышей были отчет-

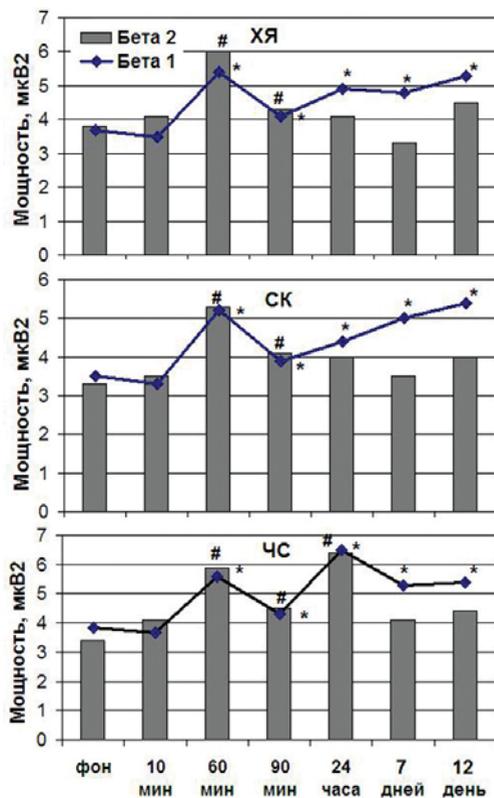


Рис. 2. Динамика изменения частотного спектра ЭЭГ мышей C57BL/6 после введения МФТП (12,5 мг/кг, п/к, однократно). \*, # –  $p < 0,05$  по сравнению с фоновыми значениями для бета<sub>1</sub> и бета<sub>2</sub>, соответственно (критерий Манна-Уитни).

ливо выражены и на 12-й день после введения МФТП (рис. 2), когда во всех структурах - хвостом ядре, черной субстанции и сенсомоторной коре отмечалось усиление спектра мощности в бета<sub>1</sub>- диапазоне ( $p < 0,05$ ). Мощность спектра в диапазоне бета<sub>2</sub>- частот увеличивалась недостоверно.

Таким образом, через 10, 60 и 90 мин после введения нейротоксина в хвостатых ядрах и черной субстанции отмечается превалирование бета<sub>2</sub>-частот над бета<sub>1</sub>-частотами, а через 7 и 12 дней регистрируется большая мощность спектра

ра в диапазоне бета<sub>1</sub>-частот в сравнении с бета<sub>2</sub>-частотами во всех исследованных структурах.

Ряд патологических форм биоэлектрической активности при болезни Паркинсона был описан достаточно давно и касался, в основном, нарушения альфаритма, усиления бета-ритма, появления быстрой активности – до 100 колебаний в 1 с и выше [3]. В исследованиях на животных показано, что повреждение дофаминергических нейронов среднего мозга 6-гидроксидофамина ассоциируется со значительным увеличением мощности спектра и когерентности в бета-диапазоне биоэлектрической активности фронтальных отделов коры и субталамических ядер мозга крыс по сравнению с контрольными животными [15, 17]. Характер синхронизации между активностью в коре и субталамических ядрах на модели ПС, вызванного введением 6-гидроксидофамина, близок с тем, что наблюдается у больных БП. Частота пика когерентной активности в бета-диапазоне увеличивалась во время спонтанных и навязанных движений [17].

Исследование функциональной активности головного мозга больных БП на основе спектрально-когерентного анализа ЭЭГ показало, что на начальных стадиях заболевания биоэлектрическая активность мозга сохраняется в пределах возрастной нормы, однако появляется характерная пачкообразная бета-активность, с источником её генерации в срединных структурах головного мозга [1, 6]. Исследования, проведенные на обезьянах, получавших 1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), и на пациентах с БП, предполагают, что одним из последствий потери дофаминергических нейронов в базальных ганглиях являет-

ся возрастание синхронизации осцилляторной активности в субталамических ядрах и бледном шаре, и запись локальных потенциалов субталамических ядер у пациентов с БП продемонстрировала выраженную активность в бета-диапазоне 15-30 Гц [23].

Таким образом, раннее, до появления моторной и вегетативной симптоматики, выявление изменений биоэлектрической активности мозга в бета-диапазоне позволяет предполагать возможность использования ЭЭГ в качестве адекватного прогностического метода на самых ранних стадиях развития болезни Паркинсона.

### Выводы

Нейротоксин МФТП в дозе 12,5 мг/кг (подкожно, однократно) не вызывает экстрапирамидных нарушений у мышей C57BL/6 в течение 12 дней наблюдения, но вызывает изменения в спектре мощности биоэлектрической активности черной субстанции, хвостатого ядра и сенсомоторной коры.

Усиление спектра мощности биоэлектрической активности в диапазоне бета-частот является наиболее устойчивым признаком изменений в черной субстанции, хвостатом ядре и сенсомоторной коре после введения МФТП.

Непосредственно после введения МФТП (в течение часа) наиболее значительно увеличивается мощность спектра в диапазоне бета<sub>2</sub>-частот, а на 7-й и особенно 12-й дни значительно увеличивается мощность спектра в диапазоне бета<sub>1</sub>-частот в черной субстанции и хвостатом ядре.

Характер изменений биоэлектрической активности мозга отражает его функциональную перестройку при фор-

мировании экстрапирамидных нарушений, а выявленные изменения ЭЭГ в диапазоне быстрых бета-частот являются одним из прогностических признаков для ранней диагностики ПС в эксперименте.

### Список литературы

1. **Аракелян Р.К., Неробкова Л.Н., Катунина Е.А., Вальдман Е.А., Капица И.Г., Воронина Т.А., Авакян Г.Н.** Особенности функциональной активности головного мозга у больных болезнью Паркинсона на фоне лечения амантадин-сульфатом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2005. № 4. С. 17-21.
2. **Воронина Т.А., Неробкова Л.Н.** Методические указания по изучению антипаркинсонической активности фармакологических веществ // В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум. 2005. С. 295-307.
3. **Жирмунская Е.А., Попелянский Я.Ю.** Электрическая активность мозга при различных формах паркинсонизма // Журнал неврологии и психиатрии. 1954. т. 54. № 3. С. 254-259.
4. **Иллариошкин С.Н.** Ранняя диагностика нейродегенеративных заболеваний // Нервы. 2008. №1. С. 11-13.
5. **Митрофанов А.А.** Компьютерная система анализа и топографического картирования электрической активности мозга с нейрометрическим банком ЭЭГ данных «BrainSys». М.: СТТК 0.020.001.ПС. 2007. 72 с.
6. **Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Катунина Е.А., Аракелян Р.К., Вальдман Е.А., Авакян Г.Н.** Особенности эффектов амантадина на пространственную организацию биопотенциалов мозга больных паркинсонизмом // Психофармакология и биологическая наркология. 2002. Т. 2. № 3-4. 429 с.
7. **Calabresi P., Centonze D., Bernardi G.** Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons // Trends Neurosci. 2000. v. 10. P. 57-63.
8. **Dauer W. Przedborski S.** Parkinson's disease: mechanisms and models // Neuron. 2003. № 39. P. 889-909.
9. **Franklin K.B.J., Paxinos G.** The mouse brain in stereotaxic coordinates. - 2nd edition. New York: Elsevier Science & Technology Books. 1997.120 p.
10. **Galvan A., Wichmann T.** Pathophysiology of Parkinsonism // Clin. Neurophysiol. 2008. v. 119. № 7. P. 1459-1474.
11. **Georgiev V., Kambourova T.** Behavioural effects of angiotensin II in the mouse following MPTP administration // Gen. Pharmacol. 1991. v. 22. № 4. P. 625-630.
12. **Hornykiewicz O.** Chemical neuroanatomy of the basal ganglia-normal and in Parkinson's disease // Journal of Chemical Neuroanatomy. 2001. v. 22. № 1-2. P. 3-12.
13. **Jurkowlanec E., Trojnar W., Tokarski J.** Daily pattern of EEG activity in rats with lateral hypothalamic lesions // Journal of physiology and pharmacology. 1994. v. 45. № 3. P. 399-411.
14. **Langston J.W., Forno L.S., Tetrud J., Reeves A.G., Kaplan J.A., Karluk D.** Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. Ann. Neurol. 1999. v. 46. № 4. P. 598-605.
15. **Lehmkuhle M.J., Bhangoo S.S., Kipke D.R.** The electrocorticogram signal can

- be modulated with deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in the hemiparkinsonian rat // *J. Neurophysiol.* 2009. v. 102. № 3. P. 1811-1820.
16. **Luchtman D.W., Shao Di., Song Cai.** Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Physiology & Behavior.* 2009. № 98. P. 130-138.
17. **McCarthy M.M., Moore-Kochlacs Gu.X., Boyden E.S., Han X., Kopell N.** Striatal origin of the pathologic beta oscillations in Parkinson's disease // *PNAS.* 2011. v. 108. № 28. P. 11620-11625.
18. **Meredith G.E., Rademacher D.J.** MPTP mouse models of Parkinson's Disease: an update // *Journal of Parkinson's Disease.* 2011. № 1. P. 19-33.
19. **Pahwa R., Lyons K.E.** Handbook of Parkinson's disease. - New York: Informa Healthcare USA. Inc. 2007. 501 p.
20. **Perez V., Unzeta M.** PF 9601N [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine], a new MAO-B inhibitor, attenuates MPTP-induced depletion of striatal dopamine levels in C57/BL6 mice // *Neurochem. Int.*, 2003. v. 42. № 3. P. 221-229.
21. **Plowman E.K., Tomas N.J., Kleim J.A.** Striatal dopamine depletion induces forelimb motor impairments and disrupts forelimb movements representations within the motor cortex // *Journal of Parkinson's Disease.* 2011. № 1. P. 93-100.
22. **Sriram K., Matheson J.M., Benkovic S.A., Miller D.B., Luster M.I., O'Callaghan J.P.** Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF // *The FASEB Journal.* 2006. v. 20. P. 670-682.
23. **Weinberger M., Mahant N., Hutchison W.D., Lozano A.M., Moro E., Hodaie M., Lang A.E., Dostrovsky J.O.** Beta oscillatory activity in the subthalamic nucleus and its relation to dopaminergic response in Parkinson's disease // *J. Neurophysiol.* 2006. v. 96. № 6. P. 3248-3256.

## EEG correlates of an early stage of a Parkinson illness in experiment on mice of the strain C57BL/6

I.G. Kapitsa, L.N. Nerobkova, T.A. Voronina

We tested electroencephalographic characteristics of cerebral electrobiological activity in C57BL/6 mice, which received a small dose (12,5 mg/kg) of subcutaneous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; this induced early Parkinson illness. We showed that MPTP injection at the dose of 12,5 mg/kg did not cause extrapyramidal impairments but led to changes in the power spectrum of electrobiological activity in substantia nigra, caudate nucleus and sensorimotor cortex. We demonstrated that the most consistent feature of changes in cerebral electrobiological activity in mice with early Parkinson illness is power spectrum amplification in the range of beta frequencies. In the first twenty-four hours changes were the greatest in beta 2 band; subsequently beta 1 band became involved, the changes being particularly typical of substantia nigra and caudate nucleus. Observable EEG changes can serve as an important prognostic indicator for early diagnosis of Parkinson illness.

**Key words:** Parkinson's disease, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, encephalography, beta frequency.



## Взаимовлияния микроэлементов в крови лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении

А.О. Ревякин<sup>1</sup>, Н.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, Е.Б. Шустов<sup>1</sup>, В.Н. Каркищенко<sup>1</sup>,  
Д.А. Ксенофонтов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»,  
Московская область

<sup>2</sup> – РГАУ – МСХА им. К.А.Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, [scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru)

Методом атомно-абсорбционной спектрометрии изучено содержание кальция, магния, железа, меди, марганца и цинка в тканях лабораторных животных при уровнях пищевого потребления, составляющих 100, 120 и 140% от суточной потребности. Выявлены статистические закономерности их взаимосвязи в крови.

**Ключевые слова:** металлохелаты, микроэлементы, содержание в крови, атомно-абсорбционная спектрометрия.

Данная статья является продолжением анализа данных, полученных при исследовании особенностей распределения металлов в тканях лабораторных животных при их нормальном и избыточном пищевом потреблении, и опубликованных нами ранее [2, 3].

### Схема проведения экспериментальной работы

Исследование планировалось и проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологиче-

ских средств. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией НЦБМТ ФМБА России.

Исследование выполнялось на лабораторных белых аутбредных крысах, поступивших из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Карантин, содержание животных, осмотры и рандомизация, введение препаратов и эвтаназия осуществлялись в соответствии с утвержденными СОП (Стандартные операционные процедуры) организации. Животные содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem. В качестве корма животным использовался стандартный экструдированный грану-

лированный полнораационный комбикорм для лабораторных животных ПК-120, произведенный в соответствии с ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось в свободном режиме, исходя из суточных нормативов. Водопроводная очищенная вода давалась всем животным *ad libitum* в стандартных поилках.

Полнораационный комбикорм в суточной дозе (из расчета на одну крысу массой 250 г) содержал кальция - 54 мг, железа - 0,54 мг, цинка - 0,136 мг, марганца - 0,27 мг, меди - 0,072 мг, магния - 0,8 мг, кобальта - 0,0054 мг.

Так как в исследовании планировалось изучение содержания металлов в тканях животных при избыточном их поступлении, то дополнительное количество металлов, обеспечивающее превышение суточной нормы потребления на 20 и 40%, вводилось животным в виде смеси хелатных комплексов ежедневно, однократно, внутривентрикулярно в

объеме 0,1 мл водного раствора, на протяжении 28 дней.

Животные выводились из эксперимента методом декапитации с отбором крови и тканей. Ткани высушивались в сухожаровом шкафу при температуре +105 °С до достижения постоянной сухой массы, затем озолялись в муфельной печи при температуре +850 °С. Навески золы растворяли в 30% химически чистой соляной кислоте и определяли содержания металлов методом атомно-абсорбционной спектрометрии [4] (прибор «Спектр 5-4», производство ОАО «Союзцветметавтоматика», Россия, номер Государственного реестра средств измерений 13743-04). Полученные количественные результаты измерений из зольных навесок пересчитывались в содержание металлов в тканях (мг / 100 г ткани).

Исследуемые металлохелатные комплексы были получены путем совместной инкубации при комнатной темпера-

Таблица 1  
Статистические характеристики распределения металлохелатов в крови крыс

Статистический параметр	Ca	Cu	Mn	Fe	Mg	Zn
Среднее	3,6914	0,857963	0,093917	228,2269	1,819633	2,424767
Стандартная ошибка	0,135	0,045167	0,011326	17,06994	0,040148	0,101818
Медиана	3,8365	0,8428	0,069	207,4905	1,783	2,2385
Мода	4,1	0,83	0,04	160	1,594	2,161
Стандартное отклонение	0,739425	0,247391	0,062037	93,49589	0,2199	0,557679
Дисперсия выборки	0,54675	0,061202	0,003849	8741,481	0,048356	0,311006
Эксцесс	-0,41035	0,259695	0,76253	1,228308	0,860984	5,283579
Асимметричность	-0,10138	0,26055	1,230637	0,984952	0,918417	2,288396
Интервал	3,035	1,029	0,2289	428,652	0,903	2,403
Минимум	2,369	0,36	0,0262	69,888	1,49	1,873
Максимум	5,404	1,389	0,2551	498,54	2,393	4,276
Коэффициент вариации.	0,148114	0,071335	0,040979	0,409662	0,120848	0,229993
Счет	30	30	30	30	30	30

туре и  $pH=7,1 - 7,2$  водных растворов солей металлов с низкомолекулярной фракцией ( $< 10$  кДа) ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока [1]. Полученные жидкие хелаты лиофильно высушивали и определяли в них содержание металлов атомно-абсорбционным методом.

В работе исследовалось содержание металлов в кров (суммарно плазма и форменные элементы крови).

Содержание металлов в крови (мг/100 г ткани) животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении имеет следующие статистические характеристики (табл. 1).

На следующем этапе анализировалось возможное взаимовлияние металлохелатов на содержание их в крови. С этой целью с помощью анализа частотных кривых распределения для каждого из анализируемых металлохелата были определены границы зон низкой, средней и высокой концентрации в крови животных. Затем последовательно методом дисперсионного факторного анализа оценивались возможные влияния одного из металлохелатов (независимый металл) на распределение значений других металлов в крови (табл. 2). Для показателей, имевших достоверные влияния, проводился корреляционный анализ.

Анализ таблицы 2 показывает, что между содержанием кальция в крови и уровнем железа в этой ткани существуют конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции  $r=-0,53$ ) – чем ниже уровень кальция, тем выше уровень железа, и наоборот, чем выше уровень кальция в крови, тем меньше в крови уровень железа. Как правило, такие взаимоотношения характерны при

конкуренции веществ за переносчик (белок-носитель) при доминирующей роли в этой паре кальция. Именно его содержание в крови определяет содержание железа (коэффициент детерминации 0,34, влияние фактора значимо при  $p=0,003$ ). При этом уровень содержания железа не оказывает достоверного влияния на содержание кальция (коэффициент детерминации 0,15,  $p=0,12$ ).

Эти данные позволяют предположить, что в крови существует *два белка-переносчика* – первый, более афинный к кальцию, но способный также переносить ионы железа на не оккупированных кальцием местах связывания, и второй, специализированный по железу. В роли второго (специализированного по железу) переносчика, скорее всего, может выступать трансферрин, а в роли первого переносчика (более афинного к кальцию) – альбумины (именно с альбуминами связано до 45% сывороточного кальция).

Влияние меди на содержание железа в крови описывается куполообразной кривой: низкому содержанию меди соответствует и низкое значение железа, среднему уровню меди – самое высокое содержание железа, высокому содержанию меди – умеренное, более низкое значение содержания железа. Можно предположить, что железо-связывающая способность основного переносчика железа в крови – трансферрина в какой-то степени зависит от уровня меди (при более низком содержании меди или количество переносчика снижено, или его конформация при этом не является оптимальной для связывания с железом).

При среднем уровне концентрации меди переносчик железа находится в оп-

Дисперсионный факторный анализ влияния металлохелатов на распределение значений других металлов в крови лабораторных животных

Металл независимый	Металл зависимый	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания независимого металла в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Кальций	Медь	0,83	0,82	1,08	0,12	0,16
	Марганец	0,08	0,11	0,08	0,06	0,42
	Железо	299	192	172	0,34	0,003
	Магний	1,79	1,84	1,85	0,01	0,83
	Цинк	2,39	2,32	2,90	0,12	0,19
Медь	Кальций	4,06	3,50	4,21	0,16	0,10
	Марганец	0,05	0,09	0,13	0,11	0,20
	Железо	138	256	198	0,24	0,026
	Магний	1,66	1,83	1,99	0,18	0,07
	Цинк	2,20	2,50	2,31	0,05	0,52
Марганец	Кальций	3,14	3,80	3,94	0,15	0,11
	Медь	0,68	0,87	1,02	0,18	0,07
	Железо	246	220	236	0,01	0,83
	Магний	1,73	1,77	2,12	0,38	0,002
	Цинк	2,45	2,45	2,31	0,01	0,88
Железо	Кальций	4,11	3,76	3,18	0,15	0,12
	Медь	0,58	0,91	0,88	0,20	0,045
	Марганец	0,06	0,10	0,09	0,06	0,46
	Магний	1,67	1,87	1,77	0,11	0,21
	Цинк	2,19	2,40	2,67	0,07	0,40
Магний	Кальций	3,61	3,77	3,48	0,02	0,71
	Медь	0,72	0,89	0,92	0,09	0,29
	Марганец	0,08	0,08	0,18	0,35	0,003
	Железо	242	221	237	0,01	0,88
	Цинк	2,61	2,42	2,20	0,06	0,46
Цинк	Кальций	3,49	3,71	3,86	0,2	0,76
	Медь	0,69	0,89	0,89	0,10	0,25
	Марганец	0,09	0,10	0,09	0,004	0,95
	Железо	175	227	300	0,14	0,13

тимальной активности, а при высоком содержании меди в крови, возможно, может возникать частичная конкуренция между медью и железом за переносчик (избыточная медь вытесняет железо из связи с сывороточным белком, что способствует более быстрой элиминации железа из крови).

Существует и своеобразное встречное влияние (уровня железа на содержание меди в крови) – низкому уровню железа в крови соответствует и низкие значения меди, в то же время среднему и повышенному уровню железа соответствует средний уровень меди в крови (коэффициент детерминации этой модели

равен 0,20, уровень значимости модели  $p=0,045$ ).

Возможно, такое влияние может быть объяснено через влияние железа на синтез в печени основного переносчика меди – церулоплазмينا (с этим белком связано до 60-65% переносимой меди) или иных переносчиков меди: транскупринина (12-14%), альбуминов (12-17%), аминокислот гистидина, треонина, глутамина (10-15%) [5]. При этом может реализовываться следующая цепочка: низкий уровень железа – низкий уровень синтеза переносчика – низкое содержание меди в крови.

Для меди также выявлена статистическая тенденция влияния на уровень магния в крови (динамика центроидов монотонно возрастающая, коэффициент корреляции  $r=0,36$ , коэффициент детерминации равен 0,18,  $p=0,07$ ). Известно [5], что 25% сывороточного магния связано с альбуминами. Возможно, уровень меди влияет на синтез альбуминов в печени.

Достаточно своеобразные взаимовлияния выявлены между содержанием марганца и магния в крови. Коэффициент корреляции между содержанием этих металлов в крови  $r=+0,55$ . Однако динамика центроидов этих металлов не является монотонной. Так, низким и средним значениям марганца в крови соответствует умеренно повышенный уровень содержания магния, а высоким значениям – высокие значения магния в крови. Аналогичная динамика характерна и для анализа фактора «содержание магния»: низким и средним значениям магния в крови соответствует умеренно сниженный уровень содержания марганца, а высоким значениям – средние значения марганца в крови. В обоих случаях коэффициент детерминации модели

равен 0,35, уровень значимости  $p<0,003$ .

На уровне статистических тенденций (коэффициент детерминации 0,18,  $p=0,07$ ) проявляется позитивное влияние уровня марганца на уровень меди в крови (повышение содержания меди при повышении уровня марганца). Содержание цинка в крови не проявляло влияния на содержание других анализируемых металлов в крови.

Таким образом, взаимные влияния металлов на их содержание в крови могут быть представлены следующим графом связей (рис.).

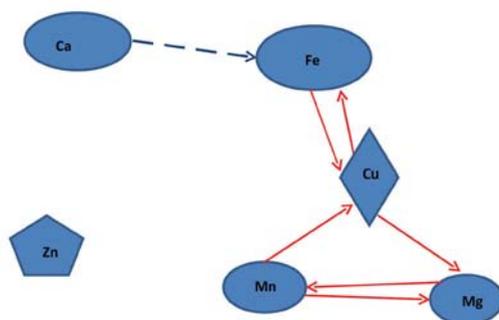


Рис. Граф взаимовлияний металлов на их содержание в крови. Обозначения: непрерывная красная линия – влияние по типу усиления, синяя пунктирная линия – влияние по типу конкуренции.

## Выводы

Статистический анализ характеристик значений содержания металлов в крови животных при нормальном или избыточном их пищевом потреблении показал, что только для меди распределение значений соответствует распределению случайной величины (не испытывает дополнительного влияния внешних факторов). Наибольшее влияние внешних факторов характерно для содержания кальция и цинка в крови. Низкая вариативность показателей содержания в крови меди и марганца отражает су-

ществование жестких механизмов их гомеостатического регулирования.

Между содержанием кальция в крови и уровнем железа в этой ткани существуют конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции  $r=-0,53$ ), которые могут быть объяснены конкуренцией веществ за транспортный белок-переносчик при доминирующей роли в этой паре кальция. Предположительно в роли такого транспортного белка могут выступать альбумины крови.

Выявлено влияние железа на содержание меди в крови, что может быть связано с его влиянием на синтез медь-переносящих белков (церулоплазмينا, транскурина).

Выявлены взаимосвязи между содержанием меди, магния и марганца в крови, механизм которого пока еще не установлен.

Уровень цинка в крови не оказывал влияния на содержание других микроэлементов.

### Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Люблинский С.Л., Капанадзе Г.Д., Шустов Е.Б., Ревякин А.О., Болотских Л.А., Касинская Н.В., Станкова Н.В. Роль микроэлементов

в спортивном питании и безопасность металлохелатов // Биомедицина. 2013. № 3. С. 12-41.

2. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонов Д.А., Касинская Н.В. Особенности распределения металлов в организме лабораторных животных при разных уровнях их пищевого потребления // Биомедицина. 2013. № 3. С. 82-90.
3. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонов Д.А., Касинская Н.В. Влияние колебаний содержания металлов в крови на их содержание в тканях лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении металлохелатов // Биомедицина. 2013. № 4. С. 16-28.
4. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ. Л.: Химия. 1983. 144 с.
5. Элементный статус населения России. Ч. 1. Общие вопросы и современные методические подходы к оценке элементного статуса индивидуума и популяции / под ред. А.В.Скального. М.Ф.Киселева. СПб.: Медкнига «Элби-СПб». 2010. 416 с.

## Interferences of microcells in blood of laboratory animals at normal and excess food consumption

A.O. Revyakin, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, D.A. Ksenofontov

The method of a nuclear and absorbing spectrometry studied the quantity of calcium, magnesium, iron, copper, manganese and zinc in tissues of laboratory animals at levels of food consumption, components of 100, 120 and 140% of daily requirement. Statistical regularities of their interrelation in blood are revealed.

**Key words:** metalchelates, microcells, blood composition, nuclear and absorbing spectrometry.



## Фармакогенетика системы цитохрома Р-450 и безопасность терапии антидепрессантами

В.Г. Кулес, Н.Н. Иванец, Д.А. Сычев, Н.А. Псарева

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава РФ

Контактная информация: Кулес Владимир Григорьевич [elmed@yandex.ru](mailto:elmed@yandex.ru)

Выполнен анализ литературных данных о современных подходах к персонализации выбора лекарственных средств для лечения депрессивных расстройств на основании результатов фармакогенетического тестирования. Большинство антидепрессантов метаболизируются в печени с помощью изоферментов цитохрома Р-450 2D6 (СYP2D6) и 2С19 (СYP2С19). Важнейшим фактором, влияющим на активность изоферментов цитохрома Р-450, является полиморфизм генов, кодирующих эти изоферменты. Наиболее полиморфным является СYP2D6, участвующий в биотрансформации большинства антидепрессантов. У человека присутствуют около 10 генов СYP, при этом полиморфизмы в генах в виде носительства функционально дефектных аллелей могут обуславливать более высокие концентрации антидепрессантов в крови при лечении и приводить к развитию неблагоприятных лекарственных реакций. Повышенный риск таких реакций отмечается у лиц с медленным метаболизмом лекарственных средств, в то время как при сверхбыстром метаболизме концентрация в плазме препаратов может не достигать терапевтической, что может привести к формированию терапевтической резистентности при лечении депрессий.

**Ключевые слова:** депрессивные расстройства, антидепрессанты, генетический полиморфизм, безопасность терапии, фармакогенетическое тестирование.

### Введение

По данным ВОЗ, ежегодно 25% населения Европейского союза страдают от депрессий или тревожных состояний. Эти нарушения являются причиной до 40% случаев инвалидности, причем депрессия является лидирующей причиной. До 50% длительных отпусков по болезни связаны с депрессией/тревожными состояниями, при этом примерно в половине случаев серьёзные депрессии остаются нелеченными [1, 2]. Согласно резолюции Всероссийской

конференции с международным участием «Психическое здоровье населения как основа национальной безопасности России» (2012), учетная распространенность психических расстройств в РФ составляет более 4 миллионов человек.

Возрастающий интерес к изучению депрессивных состояний связан не только с увеличением числа больных депрессиями, но и с выделением «скрытых», «маскированных», «вегетативных», «соматизированных» депрессий, тенденцией к «соматизации депрес-

сивных синдромов» [3, 4]. По мнению Смулевича А.Б. и др. (2007) клинически очерченная депрессия у соматически больных достоверно чаще приводит к инвалидизации, чем отдельно взятое соматическое заболевание [5]. В ряде исследований показано, что депрессия повышает риск летального исхода соматического заболевания, вероятность смерти в течение 6 мес. после инфаркта миокарда при наличии признаков депрессии увеличивается в 3-4 раза [5, 6]. Важнейшим аспектом является и повышение суицидального риска пациентов, у которых соматическое заболевание сопровождается депрессией [5].

Несмотря на внедрение в клиническую практику все новых лекарственных средств (ЛС) – антидепрессантов с принципиально новыми механизмами действия, актуальность проблемы не только не уменьшается, а приобретает еще более масштабный характер. По сообщениям многих исследователей из разных стран, в последние десятилетия отмечается увеличение количества тяжелых и резистентных к терапии депрессивных состояний. По различным данным, от 15 до 60 % пациентов, страдающих рекуррентным депрессивным расстройством, нечувствительны к терапии [5-7].

Поскольку в психиатрической практике подбор антидепрессантов, как правило, сопряжен с продолжительным пребыванием пациентов в стационаре вследствие необходимости подбора наиболее эффективного и безопасного препарата при терапии депрессивного расстройства или замены ЛС из-за неэффективности или плохой переносимости препарата, проблема оценки индивидуальной чувствительности к

проводимой терапии является высокоактуальной для персонализированного подхода к фармакотерапии конкретного пациента [8, 9]. Очевидно, что одним из путей повышения эффективности и безопасности фармакотерапии антидепрессантами может стать персонализация выбора ЛС в зависимости от результатов генотипирования (т.е. фармакогенетического тестирования).

### **Общие представления о генетической основе фармакологического ответа на антидепрессанты**

Данные, указывающие на возможную генетическую предрасположенность к ответу на лечение антидепрессантами: имипрамин, трилципрамин, флувоксамин [10, 11], были получены без применения молекулярно-генетической методологии, до ее внедрения в исследовательскую практику. Постулировалось, что в фармакодинамическом контексте возможными маркерами могут служить компоненты серотониновой системы, являющейся основной мишенью для действия этих препаратов [12]. В настоящее время эффективность и безопасность антидепрессантов связывают с уровнем их проникновения через гематоэнцефалический барьер в ЦНС. При этом, транспортный белок Р-гликопротеин (Р-gp), локализованный на апикальной мембране эндотелиоцитов церебральных сосудов и кодирующийся геном *MDR1*, не «допускает» некоторое количество антидепрессантов-субстратов Р-gp в ЦНС. Очевидно, что генетический полиморфизм *MDR1*, который может приводить к снижению активности Р-gp, и, как следствие, к более интенсивному проникновению препаратов

в ЦНС, может быть ассоциирован как с более высокой эффективностью, так и с развитием «центральных» нежелательных лекарственных реакций (НЛР) [13].

Оценка роли генов, ответственных за функционирование моноаминовых систем, традиционно считающихся патогенетически значимыми, достаточно сложна [14]. Напротив, направление исследований, проводящихся с целью выявления генетических маркеров психофармакологического ответа, имеет более определенные успехи, которые позволяют надеяться на исправление ситуации с лечением данной категории пациентов [14, 15].

Общепризнано, что индивидуальные различия в фармакокинетике психофармакологических препаратов являются следствием вариаций генетического материала, отвечающего за синтез ферментов, которые принимают участие в обмене соответствующих субстанций [16]. Подобные результаты, как минимум, подразумевают наличие метаболизирующей системы, существующей в двух генетических вариантах и работающей с существенно различающейся активностью. В действительности количество ферментов, принимающих участие в метаболизме отдельных ксенобиотиков, значительно больше единицы, более того, некоторые энзиматические реакции имеют обратимый характер, а ферменты способны катализировать как прямой, так и обратный процессы [17].

Остается не совсем ясным вопрос о реализации генетических различий. Во многих случаях установленные маркеры не связаны с кодирующими областями генов и, соответственно, не имеют отражения в структуре и функциональном качестве мишеней. Генетические

вариации мишеней психофармакологических средств обеспечивают различия в скорости процессов, начинающихся с транскрипции соответствующих нуклеотидных последовательностей, и, в конечном счете, различия в уровне адаптации нервной ткани к возмущающим лекарственным воздействиям [18]. Математически выявляемый уровень связи генетических вариантов с ответом на хроническое поступление в организм препарата зависит от процессов формирования функциональной пластичности клеток [19]. Биохимические исследования подтвердили наличие сложной последовательности происходящих при этом процессов, активность которых варьирует вследствие генетических различий [20].

Некоторые полиморфизмы в ключевых регуляторных генах влияют на фармакокинетику препаратов. При этом исследователи обращают особое внимание на систему цитохромов (СYP) и Р-гликопротеин, которые на данный момент наиболее изучены [21].

### **Роль системы цитохрома Р-450 в генетически детерминированной биотрансформации антидепрессантов**

Согласно современным представлениям, большое значение в механизмах лекарственных взаимодействий психотропных средств отводится процессам биотрансформации препаратов в печени с участием ферментов микросомального окисления цитохромов Р-450. Общеизвестно, что ксенобиотики и многие ЛС, в том числе и психотропные препараты, подвергаются метаболизму в результате микросомального окисления, связываясь с цитохромами Р-450,

которые являются первичными компонентами в окислительной ферментной системе [18, 21]. Дальнейшее окисление лекарственных препаратов происходит под влиянием оксидазы и редуктазы при участии НАДФ и молекулярного кислорода. ЛС могут повышать или снижать активность микросомальных ферментов, некоторые их разрушают. При одновременном назначении психотропных средств с индукторами микросомальных ферментов (барбитураты, рифампицин, изониазид, карбамазепин, фенитоин) их метаболизм ускоряется, что приводит к снижению эффективности психофармакотерапии. Никотин усиливает биотрансформацию большинства лекарственных препаратов, в том числе и психотропных средств, что приводит к снижению их концентрации в плазме крови [22]. Поэтому, например, у курильщиков эффективность психофармакотерапии заметно снижается, а для достижения желаемого эффекта может потребоваться увеличение дозы принимаемых препаратов.

Известны опасные клинические последствия одновременного приема алкоголя и психотропных средств — нейрорептиков, антидепрессантов, транквилизаторов, гипнотиков. Алкоголь усиливает угнетающее воздействие психотропных средств на ЦНС, вызывая развитие тяжелых побочных эффектов и осложнений с нарушением сознания, расстройством дыхания и кровообращения. Одновременно сами психотропные средства усиливают токсическое действие алкоголя на ЦНС. При приеме алкоголя и трициклических антидепрессантов нередко наблюдается развитие экстрапирамидных расстройств, не свойственных этому классу ЛС [23].

Система CYP участвует в окислении многочисленных соединений, как эндогенных, так и экзогенных. У человека присутствуют около 10 важных генов CYP, которые определяют метаболизм лекарственных препаратов. Более 70 функционально различных аллелей были зарегистрированы для *CYP2D6*, более 15 из них кодируют неактивный фермент. В соответствии с унаследованными *CYP2D6* генными аллелями, пациент в зависимости от обмена веществ может быть отнесен к группе медленного, среднего, быстрого, сверхбыстрого метаболизма [25]. При этом установлено, что повышенный риск токсических реакций отмечается у лиц с медленным метаболизмом, в то время как при сверхбыстром метаболизме концентрация в плазме определенных препаратов может не достигать терапевтической, что, в свою очередь, может привести к формированию терапевтической резистентности [26].

Очевидно, что с целью профилактики нежелательных лекарственных взаимодействий следует избегать одновременного назначения средств, подвергающихся биотрансформации одним и тем же изоферментом семейства цитохромов P-450. Информация о том, какие препараты являются субстратами и ингибиторами изоферментов цитохрома P-450, может помочь врачам предвидеть возможные неблагоприятные лекарственные взаимодействия, предупредить нежелательные побочные эффекты и выбрать оптимальную терапевтическую тактику [27]. Поэтому в последние годы FDA (The United States Food and Drug Administration) требует от производителей лекарств указывать, какие основные изоферменты цитохрома P-450 участвуют в метаболизме нового ЛС [26].

Относительно недавно была признана крайне важная практическая значимость этих данных о роли цитохромов Р-450, когда несколько новых ЛС были отозваны с рынка производителями вследствие выявленного эффекта опасного для пациентов взаимодействия этих препаратов с другими ЛС [28].

Молекулярные механизмы этого взаимодействия представляют собой:

- индукцию фермента СYP одним ЛС, который может затем повлиять на метаболизм другого препарата, принятого синхронно или последовательно;

- ингибирование метаболизма одного вещества, в результате конкуренции со вторым ЛС за один и тот же фермент СYP [29].

Примером первого случая является увеличение уровня концентрации циклоспорина после приема лекарств, содержащих гиперацин (один из активных компонентов из растения *Hypericum perforatum* – Зверобой продырявленный), что приводит к серьезным нежелательным реакциям у пациентов после трансплантации вследствие мощной индукции СYP3A4. Примером второго механизма влияния является, в частности, взаимодействие не седативного антигистаминового ЛС терфенадина с азоловыми антифунгицидами (противогрибковыми препаратами), например, интраконазолом или кетоконазолом. В результате уровень терфенадина (конкурирующего за тот же самый фермент СYP3A4) в плазме крови у пациентов превышает терапевтический уровень, вызывая злокачественную аритмию по типу «пируэт» [24].

Другими ферментами СYP, принимающими участие в метаболизме лекарств, являются СYP2D6 (метаболизи-

рующие, например, β-адреноблокаторы, многие селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, такие как флуоксетин или пароксетин, а также трициклические антидепрессанты), СYP2C9 (с субстратами, такими как S-варфарин, нестероидные противовоспалительные агенты, такие как ибупрофен, пероральные антидиабетические препараты), СYP2C19 (диазепам, трициклические антидепрессанты, такие как amitриптилин, имипрамин, а также противоязвенные препараты омепразол и лансопразол), СYP2E1 (с типичными субстратами парацетамолом и ингаляционным анестетиком, таким как галотан, и органическими растворителями. - этанолом, ацетоном, ацетонитрилом, нитрозаминами), СYP1A2, метаболизирующими теофиллин, кофеин, клозапин, такрин [24, 30].

### **Влияние генетического полиморфизма системы цитохрома Р-450 на биотрансформацию антидепрессантов**

Кроме конкуренции за ферменты биотрансформации ксенобиотиков другим фактором, влияющим на активность изоферментов цитохрома Р-450, является генетический, в основе которого лежит полиморфизм генов, кодирующих изоферменты цитохрома Р-450 [24, 31]. При этом из всех изоферментов цитохрома Р-450, наиболее полиморфным является СYP2D6, участвующий в биотрансформации большинства антидепрессантов. Было показано, что «медленные» метаболитаторы по СYP2D6 являются носителями функционально дефектных аллельных вариантов гена СYP2D6 и применение у них антидепрессантов, метаболизирующихся СYP2D6, в стан-

дартных дозах может приводить к высоким значениям их концентрации и развитию НЛР [32].

Показано, что в России распространенность генотипов, ассоциированных с низкой активностью CYP2D6 (гетеро- и гомозиготы по функционально дефектным аллелям, а в европейских популяциях наиболее распространен *CYP2D6\*4*) достигает 20-25% [24]. В нашей стране частота пациентов с генотипами «медленного» метаболизма достигает 20-25%. Однако, наряду с «медленными» метаболиторами по CYP2D6, существуют и «быстрые» метаболиторы по CYP2D6, у которых имеются копии функциональных аллелей данного гена. Применение у этой категории пациентов антидепрессантов, метаболизирующихся CYP2D6, в стандартных дозах будет мало эффективным. Следует отметить, что при выявлении у пациентов генотипов «медленного» или «быстрого» метаболизма необходимо либо выбрать дозу антидепрессанта с помощью специально разработанного алгоритма, либо выбрать антидепрессант, не метаболизирующийся CYP2D6, например азафен (метаболизируется CYP1A2) [33]. Учитывая особенности биотрансформации азафена, можно предположить, что эффективность и безопасность применения данных психотропных ЛС не зависит от генетических особенностей пациентов, и, в частности, полиморфизма гена *CYP2D6*.

Подсемейство цитохрома Р-450 CYP2D включает один изофермент – CYP2D6 с множеством аллельных вариантов. Общая характеристика: CYP2D6 представляет собой белок, состоящий из 497 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 55 кДальтон. Ген *CYP2D6* находится в 22 хромосоме, локу-

се 22q13.1. CYP2D6 обнаружен, в основном, в печени. CYP2D6 начинает определяться в печени вскоре после рождения. В течение жизни активность CYP2D6 не меняется. В печени взрослых CYP2D6 составляет около 2% от всех изоферментов цитохрома Р-450 [34]. CYP2D6 метаболизирует около 20% всех известных ЛС, в том числе нейролептики, антидепрессанты, β-адреноблокаторы. CYP2D6 метаболизирует некоторые наркотики: кокаин, М-метил-3,4- метилendioксиметамфетамин («экстази») [35].

Для некоторых ЛС окисление CYP2D6 является «дополнительным» путем метаболизма. Например, основным ферментом метаболизма дилтиазема является CYP3A4, в то время как CYP2D6 катализирует «дополнительный» путь метаболизма препарата- N-деметидезацетилирование [36].

CYP2D6, в отличие от других изоферментов цитохрома Р-450, не имеет индукторов. Ряд ЛС являются ингибиторами CYP2D6, из них наиболее мощным ингибитором CYP2D6 является антидепрессант пароксетин. Показано, что совместное применение ЛС-субстратов CYP2D6 с ингибиторами CYP2D6 приводит к угнетению метаболизма субстратов, следствием чего может быть развитие нежелательных лекарственных реакций, связанных с применением препаратов-субстратов CYP2D6, вплоть до интоксикации за счет замедления их клиренса [37].

### **Результаты клинических исследования по оценке влияния генетического полиморфизма гена CYP2D6 на профиль безопасности терапии антидепрессантами**

Еще в 1977 году Iddle и Mahgoub обратили внимание на различие ги-

потензивного эффекта у больных артериальной гипертензией, применявших дебризохин - препарат из группы  $\alpha$ -адреноблокаторов, не зарегистрированный в России [38]. Тогда же было сформулировано предположение о различии в скорости метаболизма (гидроксилирования) дебризохина у разных индивидуумов. У «медленных» метаболизаторов дебризохина гипотензивный эффект этого препарата был наиболее выражен. Позднее было показано, что у «медленных» метаболизаторов дебризохина замедлен метаболизм и некоторых других ЛС, в том числе фенацетина, нортриптилина, фенформина, спартеина, энкаинаида, пропранолола, гуаноксана, амитриптилина.

Дальнейшие исследования показали, что «медленные» метаболизаторы по CYP2D6 являются носителями (как гомозиготы, так и гетерозиготы) функционально дефектных или т.н. «медленных» аллельных вариантов гена *CYP2D6*. Результатом этих вариантов являются:

- отсутствие синтеза CYP2D6 (аллельный вариант *CYP2D6\*5*);
- синтез неактивного белка (аллельные варианты *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*7*, *CYP2D6\*8*, *CYP2D6\*11*, *CYP2D6\*12*, *CYP2D6\*14*, *CYP2D6\*15*, *CYP2D6\*19*, *CYP2D6\*20*);
- синтез дефектного белка со сниженной активностью (варианты *CYP2D6\*9*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*17*, *CYP2D6\*18*, *CYP2D6\*36*) [24].

В последнее время большое внимание в литературе уделяется варианту *CYP2D6\*10*, который практически не встречается у европейцев, однако частота встречаемости этого варианта в азиатских популяциях высока [39]. Например, в Малайзии 43% населения

являются носителями аллельного варианта *CYP2D6\*10*. Есть данные, что у носителей *CYP2D6\*10* (как гомозигот, так и гетерозигот) замедлен метаболизм метопролола, мексилетина, нейрорептиков. При этом носительство варианта *CYP2D6\*10* не влияет на метаболизм других субстратов CYP2D6, таких как трамадол, галоперидол, кломипрамин [40].

В исследованиях De Vos A. et al. (2011) была предпринята попытка выявления ассоциации между носительством аллеля *CYP2C19\*17* и метаболизмом амитриптилина, циталопрама и кломипрамина у пациентов Датской клиники [41]. Авторы отмечают, что в случае разновидности *\*17* изофермента CYP2C19 отмечалось ускорение метаболизма некоторых субстратов CYP2C19. В исследование было включено 678 пациентов, у которых оценивали наличие ДНК и сывороточные уровни исходного препарата и основного метаболита. Была оценена взаимосвязь между генотипами *CYP2C19* и результатами изучения метаболизма, в том числе уровня препаратов в сыворотке с учетом дозы и метаболического коэффициента (MR). Показано, что аллель *CYP2C19\*17* в значительной степени была связана со снижением MR: для циталопрама (ЦИТ) (*CYP2C19\*1/\*17* MR = 2,3, по сравнению с *CYP2C19\*1/\*1* MR = 2,8) и для амитриптилина (АТ) (*CYP2C19\*17/\*17* MR = 0,8, по сравнению с *CYP2C19\*1/\*1* MR = 3,7 в *CYP2D6\*1/\*1*). Кроме того, была оценена ассоциация генотипов *CYP2D6* с метаболизмом АТ, ЦИТ, и кломипрамина (КЛОМ). Однако четкой корреляции между уровнями метаболизма кломипрамина и генотипом *CYP2C19* обнаружено не было. Авторы сделали вывод о том, что усиление активности аллели *CYP2C19\*17*

обуславливает повышенный уровень метаболизма препаратов, которые метаболизируются CYP2C19, в том числе амитриптилина и циталопрама [41].

Thieme D. et al. (2008) предприняли попытку выявить корреляцию между индивидуальными вариациями метаболизма амитриптилина и полиморфизмом *CYP2C19* и *CYP2D6* по показателям исследования волос больных [2]. Соотношение метаболитов амитриптилина (АТ), нортриптилина (НТ) и их 10-гидрокси метаболитов (Е10-ОНАТ, Z10-ОНАТ, Е10-ОННТ и Z10-ОННТ) было оценено с применением метода жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в образцов волос, взятых у 23 детей европеоидной расы после длительного применения АТ. Исследования показали значительный разброс соотношения метаболитов у разных пациентов (например, НТ/АТ = 0.8-8.1, Е10-ОННТ/Z10-ОННТ = 1.6-10.3). Значение этих изменений было доказано подтверждением временной стабильности этих соотношений внутри волоса. Кроме того, была исследована ассоциация между метаболическим фенотипом и генетически обусловленной предрасположенностью к различной активности метаболизма. С помощью метода полимеразной цепной реакции были изучены генотипы *CYP2C19* (аллели \*2\*, \*3\* и \*4) и *CYP2D6* (\*3\*4, и \*6). Исследователи считают, что относительный показатель деметилирования (НТ/АТ) может зависеть от количества функциональных аллелей *CYP2C19*, продемонстрировано существенное снижение (в 4,3 раза) интенсивности деметилирования у людей с пониженной метаболической функцией CYP2C19 (3 человека, по сравнению с 15 с повышенным метаболизмом) [2].

Van der Weide J. et al. (2005) оценивали наличие взаимосвязи между метаболическим коэффициентом ЛС и генотипом *CYP2C19* и / или *CYP2D6* на примере применения ряда препаратов: селективного ингибитора обратного захвата серотонина венлафаксина, трициклического антидепрессанта амитриптилина, и антипсихотика рисперидона [42]. Для этого были использованы данные обычного генотипирования и анализ уровней ЛС в сыворотке больных. Соотношения между наблюдаемыми метаболическими показателями и генотипами *CYP2D6* и/или *CYP2C19* были охарактеризованы с помощью непараметрического статистического анализа. Была выявлена корреляция между генотипом *CYP2D6* и интенсивностью метаболизма венлафаксина. Установлено и наличие корреляции между метаболическим коэффициентом венлафаксина, амитриптилина, и рисперидона и генотипами ферментов CYP, участвующими в их метаболизме. Авторы делают вывод, что метаболические соотношения могут служить показателем к генотипированию.

Koski A. et al. (2006) оценивали соотношение генотипов *CYP2D6* и *CYP2C19* и уровней метаболизма амитриптилина в серии судебно-медицинских вскрытий [43]. Используются данные 202 случаев посмертной токсикологической экспертизы, при этом были типированы гены *CYP2D6* и *CYP2C19*, оценена концентрация амитриптилина и шести его метаболитов. В качестве объекта исследования был выбран АТ, так как в основном он метаболизируется этими ферментами, считается относительно токсичным, и входит в число основных причин смертельных отравлений наркотиками в Финляндии. Цель исследования заклю-

чалась в оценке генетически детерминированных межиндивидуальных различий в сочетании с метаболическими значениями препаратов, обнаруженных в токсикологических анализах в серии судебно-медицинских вскрытий.

Исследование показало наличие положительных корреляций между долей трансгидроксилированных метаболитов и количеством функциональных разновидностей *CYP2D6*, а также между долей деметилированных метаболитов и количеством функциональных разновидностей *CYP2C19*. Ни один из случаев отравления АТ не совпал с генотипом *CYP2D6* или *CYP2C19*, кодирующим снижение метаболизма. Тем не менее, необычно высокая концентрация АТ в крови бедренной артерии (60 мг/л) была найдена в одном случае самоубийства человека с нефункциональным генотипом *CYP2D6*. Авторы полагают, что результаты исследования подтвердили зависимость уровня метаболизма АТ от генотипов *CYP2D6* и *CYP2C19* при наличии сопутствующих факторов [43].

Steimer W. et al. (2004) выполнили оценку аллель-специфичных изменений концентрации и функциональной дозы гена для прогнозирования сывороточной концентрации амитриптилина и нортриптилина при носительстве аллелей генов *CYP2C19* и *CYP2D6* [44]. Было проведено проспективное двойное слепое исследование для выявления корреляции между аллелями генов *CYP2C19*\*2\*3 и \*4 и *CYP2D6*\*1 и \*10,\*35,\*41 и концентрацией препарата у 50 пациентов, получающих амитриптилин (АТ, 75 мг два раза в день). Установлено, что у 18 пациентов - гетерозигот *CYP2C19* (\*1/\*2) концентрация амитриптилина была значимо выше

( $p=0,033$ ), а концентрация нортриптилина ниже ( $p=0,059$ ), чем у 30 гомозигот (\*1/\*1). Для *CYP2D6* авторы предложили и рассчитали два новых индекса: аллель-специфическое изменение концентрации на одинаковом фоне (ASCOC) и количественные функциональные дозы гена. Продемонстрированы значительно более высокие концентрации для аллелей \*4 (95,6%,  $p < 0,0001$ ), \*10 (63,3%,  $p < 0,001$ ), и \*41 (39,8%,  $p < 0,0001$ ), но не для \*2 и \*35. Присвоение полуколичественной «дозы гена» 0, 0,5, или 1 для каждого аллеля вместо применения используемой системы классификации (прогнозируемые фенотипы: 3 с промежуточным метаболизмом, 46 с быстрым метаболизмом, и 1 со сверхбыстрым метаболизмом) привело к значительному различию концентраций нортриптилина по показателю «дозы гена»: 0,5 ( $n=3$ ), 1 ( $n=14$ ), 1,5 ( $n=11$ ), 2 ( $n=21$ ) и 3 ( $n=1$ ,  $p < 0,00001$ ).

Таким образом, по мнению исследователей, концентрации АТ и НТ могут быть предсказаны в рамках группы *CYP2D6* с быстрым метаболизмом. Результаты исследования показали, что именно *CYP2D6*, а не *CYP2C19* влияет на показатели суммарной концентрации АТ и НТ, что может быть использовано для контроля терапии данным ЛС [44].

В ряде исследований было показано, что «медленные» метаболиты по *CYP2D6* являются носителями функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6*- это пациенты с генотипами *CYP2D6*\*1/\*4 и *CYP2D6*\*4/\*4 [24, 40, 41]. Rau T. и et al. (2004) выявили, что частота аллельного варианта *CYP2D6*\*4 среди пациентов, у которых наблюдались нежелательные лекарственные реакции при приеме трицикли-

ческих антидепрессантов (гипотензия, седативный эффект, тремор, кардиотоксичность), была почти в 3 раза выше (20 %) по сравнению с пациентами, у которых терапия этими препаратами протекала без осложнений (7 %) [40].

### Заключение

Анализ литературных данных свидетельствует, что в настоящее время неконтролируемость ответа на антидепрессанты остается значимой проблемой современной психофармакологии. Полную ремиссию симптомов под воздействием фармакотерапии достигает меньшая часть пациентов, тогда как у большей части патологический процесс продолжает проявляться [45], приводя к дальнейшим страданиям людей, потере трудоспособности, социальному дисфункционированию [46]. Более того, время формирования ответа на современные психофармакологические средства варьирует и может быть достаточно большим; в течение этого периода психиатр вынужден ждать, не зная, будет ли терапия эффективной, что в какой-то мере обуславливает явление полипрагмазии [47]. Все вышеизложенное позволяет полагать насущным вопрос о поиске возможных предикторов ответа на психофармакологические препараты, среди которых генетические маркеры обладают значимым преимуществом вследствие своей стабильности и высокой точности современных методических подходов.

Таким образом, особенности биотрансформации антидепрессантов заключаются в том, что они метаболизируются различными изоферментами цитохрома P-450. При этом информация о том, какой изофермент цитохрома

P-450 принимает участие в метаболизме антидепрессанта, может определять выбор ЛС у конкретного пациента, и только этот выбор будет максимально эффективным и безопасным.

Эта информация важна для прогнозирования фармакокинетического межлекарственного взаимодействия антидепрессантов с другими ЛС на уровне биотрансформации, а также для оценки влияния генетического фактора на их эффективность и безопасность. Также можно заключить, что информация о том, какими изоферментами цитохрома P-450 метаболизируются психотропные ЛС, является клинически значимой и необходима для проведения эффективной и безопасной фармакотерапии больных, страдающих психическими расстройствами.

Следует отметить, что в настоящее время определение функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6* уже используется для выбора доз трициклических антидепрессантов и нейролептиков. Однако в психиатрической клинике отсутствуют четкие представления, позволяющие прогнозировать формирование ответа на психофармакотерапию, становление ремиссии, переносимость фармакологических воздействий, развитие побочных эффектов. В этой связи трудно переоценить значимость молекулярно-генетических исследований, являющихся достижением самого последнего времени. При этом наиболее перспективной представляется комплексная оценка, включающая взаимовлияние нейромедиаторных, нейроэндокринных, нейвизуализационных и генетических факторов. Такой подход, вероятно, может дать возможность не только очертить нейробиологический профиль терапев-

тически резистентных депрессивных состояний, но и выработать новые лечебные подходы. В перспективе полученные данные будут способствовать снижению длительности индивидуального подбора антидепрессанта, что, в свою очередь, снизит частоту НПР, сократит койко-день и, соответственно, повысит экономическую эффективность лечения больных с депрессией.

### Список литературы

1. **Зотов П.Б.** Депрессия в общей медицинской практике (клиника, диагностика, лекарственная терапия) / П.Б. Зотов, М.С. Уманский. М. 2006. 35 с.
2. **Thieme D.** Correlation of inter-individual variations of amitriptyline metabolism examined in hairs with CYP2C19 and CYP2D6 polymorphisms / D. Thieme, B. Rolf, H. Sachs, D. Schmid // *Int. J. Legal. Med.* 2008. Vol. 122 (2). P. 149-155.
3. **Акарачкова Е.С.** Синдром вегетативной дистонии или депрессия? Депрессивные расстройства в общесоматической практике / Е.С. Акарачкова, С.В. Вершинина // *РМЖ.* 2010. Т. 1. № 26.
4. **Abulseoud O.** Free T4 index and clinical outcome in patients with depression / O. Abulseoud, N. Sane, A. Cozzolino A. et al. // *J. Affect. Dis.* 2007. Vol. 100. P. 271-277.
5. **Смулевич А.Б.** Депрессии и возможности их лечения в общей медицинской практике (предварительные результаты программы ПАРУС) / А.Б. Смулевич, Э.Б. Дубницкая, М.Ю. Дробижев и др // *Consilium-medicum.* 2007. Т. 2. № 2. С. 23-25.
6. **Вертоградова О.П.** Депрессия как общемедицинская проблема / О.П. Вертоградова // *Журн. Медицина для всех.* 1997. № 2 (4). С. 2-5.
7. **Бунькова К.М.** Эффективность и переносимость кломипрамина, прилиндола и эсциталопрама при терапии депрессий невротического уровня / К.М.Бунькова // *Журн. неврол. и психиатр. им. С.С.Корсакова.* 2008. № 3. С. 32-39.
8. **Краснов В.Н.** Современные принципы терапии депрессий / В.Н. Краснов // *Новая аптека.* 2006. № 9. С. 16-25.
9. **Barnett J.H.** Personality and bipolar disorder: dissecting state and trait associations between mood and personality / J.H. Barnett, J. Huang, R. Perlis et al. // *Psychol. Med.* 2011. Vol. 41 (8). P. 1593-1604.
10. **Anlgst J.** Antidepressiver effect und genetische faktoren / J. Anlgst // *Arzneimittelforschung.* - 1964. – Vol. 14. – P.496-500.
11. **O'Reilly R.L.** Pharmacogenetic response to antidepressants in a multi-case family with affective disorder / R.L.O'Reilly, L. Bogue, S.M. Sillgh // *Biol. Psychiatry.* 1994. Vol. 36. P. 467-471.
12. **Olgiati P.** Should pharmacogenetics be incorporated in major depression treatment? Economic evaluation in high- and middle-income European countries / P. Olgiati, E. Bajo, M. Bigelli et al. // *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012. Vol. 36 (1). P. 147-154.
13. **Murphy P.J.** The development of drug metabolism research as expressed in the publications of ASPET: Part 3, 1984-2008 / P.J. Murphy // *Drug Metabolism and Disposition.* Oct. 2008. Vol. 36. № 10. P. 1977-1982.

14. **Chi M.H.** Brain derived neurotrophic factor gene polymorphism (Val66Met) and short-term antidepressant response in major depressive disorder / M.H. Chi, H.H. Chang, S.Y. Lee et al. // *J. Affect. Disord.* 2010. Vol.126 (3). P.430-435.
15. **Houston J.P.** Association of catechol-O-methyltransferase variants with duloxetine response in major depressive disorder / J.P.Houston, J. Kohler, K. Ostbye et al. // *Psychiatry Res.* 2011. Vol.189 (3). P.475-477.
16. **Rundell J.R.** Pharmacogenomic testing in a tertiary care outpatient psychosomatic medicine practice / J.R. Rundell, J.P. Staab, G. Shinozaki et al. // *Psychosomatics.* 2011. Vol.52 (2). P.141-146.
17. **Mrazek D.A.** CYP2C19 variation and citalopram response / D.A. Mrazek, J.M. Biernacka, D.J. O’Kane et al. // *Pharmacogenet. Genomics.* 2011. Vol. 21. (1). P.1-9.
18. **Peters E.J.** Pharmacokinetic genes do not influence response or tolerance to citalopram in the STAR\*D sample / E.J. Peters, S.L. Slager, J.B. Kraft et al. // *PLoS One.* 2008. Vol. 3(4). P.1872.
19. **Celine F.** Long-term adaptive changes induced by serotonergic antidepressant drugs / F.Celine, M.F. Ouissame, H. Nasser // *Expert Rev. Neurother.* 2006. Vol. 6. № 2. P. 235-245.
20. **Ferreira Ade A.** The role of 5-HTTLPR polymorphism in antidepressant-associated mania in bipolar disorder / A. Ferreira Ade, F.S. Neves, F.F. Da Rocha et al. // *J. Affect Disord.* 2009. Vol. 112 (1-3). P.267-272.
21. **Choong E.** Follow-up of the metabolic syndrome induced by atypical antipsychotics: recommendations and pharmacogenetics perspectives / E. Choong, A. Solida, C. Lechaire et al. // *Rev. Med. Suisse.* 2008. Vol. 4 (171). P. 1994-1996.
22. **Domschke K.** Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression / K. Domschke, U. Dannlowski, P. Ohrmann et al. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2008. Vol.18 (10). P. 751-759.
23. **Licinio J.** Pharmacogenomics of antidepressant treatment effects / J. Licinio, M. Wong // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2011. Vol. 13 (1). P.63-71.
24. **Кукес, В.Г.** Проблемы клинической фармакогенетики на современном этапе / В.Г. Кукес, Д.А.Сычев, Н.А. Гасанов // *Клиническая медицина.* 2007. Т. 85. № 2. С. 58-63.
25. **Huezo-Diaz P.** CYP2C19 genotype predicts steady state escitalopram concentration in GENDEP / P. Huezo-Diaz, N. Perroud, E. Spencer et al. // *J. Psychopharmacol.* 2012. Vol.26 (3). P.398-407.
26. **Lohoff F.W.** Pharmacogenetic considerations in the treatment of psychiatric disorders / F.W. Lohoff, T.N. Ferraro // *Expert. Opin. Pharmacother.* 2010. Vol. 11 (3). P. 423-439.
27. **Grasmader K.** Impact of polymorphisms of cytochrome-P450 isoenzymes 2C9, 2C19 and 2D6 on plasma concentrations and clinical effects of antidepressants in a naturalistic clinical setting / K. Grasmader, P. Verwohlt, M. Rietschel et al. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2004. Vol. 60 (5). P. 329-336.
28. **Kirchheiner J.** Cytochrome P450 2D6 genotyping: potential role in improving treatment outcomes in psychiatric disorders / J. Kirchheiner, C. Rodri-

- guez-Antona // *CNS Drugs*. 2009. Vol. 23 (3). P. 181-191.
29. **Brandl E.J.** Influence of CYP2D6 and CYP2C19 gene variants on antidepressant response in obsessive-compulsive disorder / E.J. Brandl, A.K. Tiwari, X. Zhou et al. // *Pharmacogenomics J*. 2013. Apr. 2. [Epub ahead of print].
  30. **Mamdani F.** Gene expression biomarkers of response to citalopram treatment in major depressive disorder / F. Mamdani, M. Berlim, M. Beaulieu et al. // *Transl. Psychiatry*. 2011. Vol. 21. 13 p.
  31. **Serretti A.** Pharmacogenetics of antidepressants and mood stabilizers / A. Serretti, S. Gibiino, P. Olgiate // *Handb. Clin. Neurol*. 2012. Vol.106. P. 715-744.
  32. **Vetti H.H.** Is pharmacogenetic CYP2D6 testing useful? / H.H. Vetti, A. Molven, A.K. Eliassen, V.M. Steen // *Tidsskr. Nor Laegeforen*. 2010. Vol.130 (22). P.2224-2228.
  33. **Андреев Б.В.** Клиническая фармакология и психиатрия: состояние проблемы / Б.В. Андреев // *Consilium medicum*. 2006. Т.8. № 2.
  34. **Hiemke C.** Individualized treatment with tricyclic antidepressives. The pharmacogenetics of depression / C. Hiemke // *Pharm. Unserer Zeit*. 2008. Vol.37 (3). P. 234-240.
  35. **Garriock H.A.** A genomewide association study of citalopram response in major depressive disorder / H.A. Garriock, J.B. Kraft, S.I. Shyn et al. // *Biol. Psychiatry*. 2010. Vol.67 (2). P. 133-138.
  36. **Lewis D.F.V.** Cytochrome P450 Substrate Specificities, Substrate structural Templates and Enzyme Active Site Geometries / D.F.Lewis, M. Dickins, P.J. Eddershaw et al. // *Drug metabolism and drug interactions*. 1999. Vol. 15 (1). 51 p.
  37. **Ising M.** A genomewide association study points to multiple loci that predict antidepressant drug treatment outcome in depression / M. Ising, S. Lucae, E. Binder // *Arch. Gen. Psychiatry*. 2009. Vol.66 (9). P. 966-975.
  38. **Idle J.R.** Hypotensive response to debrisoquine and hydroxylation phenotype / J. Idle, A. Mahgoub, R. Lancaster, R.L. Smith // *Life Sci*. 1978. Vol.22. P. 979-984.
  39. **Yang Z.** Association of APC and REEP5 gene polymorphisms with major depression disorder and treatment response to antidepressants in a Han Chinese population / Z. Yang, X. Ma, Y. Wang et al. // *Gen. Hosp. Psychiatry*. 2012. Vol.34 (5). P. 571-577.
  40. **Rau T.** Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment / T. Rau, R. Heide, K. Bergmann et al. // *Pharmacogenetics*. 2002. Vol.12 (6). P. 465-472.
  41. **De Vos A.** Association between CYP2C19\*17 and metabolism of amitriptyline, citalopram and clomipramine in Dutch hospitalized patients / A. De Vos, J. Van der Weide, H.M. Looovers // *Pharmacogenomics J*. 2011. Vol.11 (5). P. 359-367.
  42. **Van der Weide J.** Metabolic ratios of psychotropics as indication of cytochrome P450 2D6/2C19 / J. Van der Weide, E. van Baalen-Benedek, J. Kootstra-Ros // *Ther Drug Monit*. 2005. Vol.27 (4). P. 478-483.
  43. **Koski A.** CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and amitriptyline metabolite

- ratios in a series of medicolegal autopsies / A. Koski, J. Sistonen, I. Ojanpera et al. // *Forensic Sci Int.* 2006. Vol.158 (2-3). P. 177-183.
44. **Steimer W.** Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers / W. Steimer, K. Zopf, S. Von Amelunxen et al. // *Clin. Chem.* 2004. Vol.50 (9). P. 1623-1633.
45. **Kane J.M.** Pharmacological treatment of schizophrenia / J.M. Kane // *Biol. Psychiatry.* 1999. Vol. 46. P. 396-1408.
46. **Kaplan H.I.** Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences and Clinical Psychiatry / H.I. Kaplan, B.J. Sadock, J.A. Grebb. 7th ed. - Baltimore: Williams & Wilkins. 1994.
47. **Seeringer A.** Pharmacogenetics-guided dose modifications of antidepressants / A. Seeringer, J. Kirchheiner // *Clin. Lab. Med.* 2008. Vol.28 (4). P. 619-626.

## Cytochrome P-450 pharmacogenetics and antidepressants treatment safety

V.G. Kukes, N.N. Ivanets, D.A. Sychev, N.A. Psareva

It was performed an analysis of published data on current approaches to personalize the choice of drugs for the depressive disorders treatment on the pharmacogenetic testing basis. Most antidepressants are metabolized in the liver by cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) and 2C19 (CYP2C19). The most important factor influencing the activity of cytochrome P-450 is genes encoding isoenzymes polymorphism. CYP2D6 involved in the biotransformation of most antidepressants is the most polymorphic.

In humans, there are about 10 genes CYP, with polymorphisms in genes as carrier defective alleles may be functionally determining antidepressants higher concentrations in the treatment of blood and may lead to the development of adverse drug reactions. Increased risk of such reactions are observed in patients with slow metabolism of drugs, while at ultrafast metabolism of drugs plasma concentrations can not reach the therapeutic, which may lead to the therapeutic resistance formation in the treatment of depression .

**Key words:** depressive disorder, antidepressants, genetic polymorphism, the safety of therapy, pharmacogenetic testing.

---

## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного и экспериментального характера, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвящённые биологическому, математическому и комплексному моделированию, а новым медицинским технологиям. Особое внимание уделяется вопросам генетической, микробиологической, экологической стандартизации лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых видов биологических моделей, представляющих собой специализированные линии лабораторных животных и альтернативных биологических объектов, имеющих ценность для биомедицинских исследований, моделирующих патологические состояния человека, клеточных культур, органов и тканей. Рассматриваются материалы, посвященные вопросам экстремальных воздействий на организм, включая неблагоприятные факторы спорта высших достижений. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных.

### Рубрикация журнала

1. Новые биомедицинские технологии.
2. Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.
3. Новые регуляторные пептиды.
4. Спортивное питание.
5. Релевантное и альтернативное биомоделирование.
6. Лабораторные животные.
7. Методы биомедицинских исследований.
8. Генетика лабораторных животных.
9. Доклинические исследования новых медицинских технологий.
10. Клинические исследования новых медицинских технологий.
11. Информационные материалы и нормативные документы.

### Общие требования к оформлению

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

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, контактная информация, 4) учреждения, в которых была проведена работа, почтовый адрес с индексом. На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов).

---

Объем представляемой статьи не должен превышать 16 машинописных страниц, включая таблицы и рисунки. Таблицы и рисунки расставляются авторами по тексту. Рисунки в электронной форме прилагаются отдельными файлами.

Результаты исследований должны быть статистически обработаны. Достоверность полученных результатов должна быть оценена с применением корректных статистических критериев.

В конце статьи приводится список цитированной литературы (не более 30 источников) и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи.

В конце статьи приводятся наименование статьи, фамилии авторов, реферат и ключевые слова на английском языке.

К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу и на отдельном листе – фамилию, имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другую рубрику или номер журнала.

Все рукописи направляются на внешнее рецензирование.

За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается. После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

**Рукописи направлять по адресу:**

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

Электронный адрес для переписки с редакцией:  
**[sinayva@yandex.ru](mailto:sinayva@yandex.ru) или [scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru)**

Телефон редакции: **8-(495)-561-52-64.**

Подробные требования к оформлению статей и электронную версию журнала можно посмотреть на сайте **[www.scbmt.ru](http://www.scbmt.ru)**.

# Лабораторкорм

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

## Реализуем:

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



**НАШИ КОРМА**  
полнорационные,  
сбалансированные по  
аминокислотному составу,  
минералам и витаминам

Доставка в любой регион России

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

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 648-42-39;

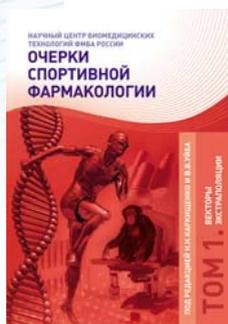
Телефон/факс: (499) 612-99-09;

[www.laboratorkorm.ru](http://www.laboratorkorm.ru), e-mail: [info@laboratorkorm.ru](mailto:info@laboratorkorm.ru)

на правах рекламы

# ОЧЕРКИ СПОРТИВНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

**В** НЦБМТ ФМБА России издается многотомный научный труд, в котором на большом объеме собственных результатов и данных литературы впервые проанализирован и обобщен опыт разработки, доклинического изучения, клинических и специальных испытаний и апробаций высококвалифицированными спортсменами различных фармакологических средств поддержки их здоровья и работоспособности.



В первом томе приведены оценки работоспособности спортсменов при фармакологической поддержке тренировочного и соревновательного процессов в спорте высших достижений. Впервые предложена система дифференцированной доклинической оценки фармакологических средств, повышающих работоспособность, выносливость, скоростные характеристики и ее экстраполяция на спортсменов. Даны принципы и методы доклинической оценки и фармакокинетики инновационных фармакологических средств коррекции механизмов утомления, спортивного стресса при предельных физических нагрузках, постнагрузочного восстановления, сенсорных и когнитивных функций, а также определены этапы и пути создания персонализированных средств спортивной фармакологии.

Во втором томе, на основе современных данных клинико-экспериментальных исследований волонтеров, спортсменов высшей квалификации, военнослужащих и космонавтов, сформулированы принципы и предложены новые методы фармакологической коррекции угнетения энергообмена, гипоксии, иммунитета при предельно переносимых нагрузках. Даны научно обоснованные схемы применения метаболитов, антигипоксантов, иммуностимуляторов, интермедиаторов и антистрессорных средств нового поколения, а также комплексы фармакологических средств, повышающих работоспособность, ускоряющих процессы восстановления и устраняющих риски стрессорных срывов при истощающих нагрузках спортсменов.



Третий том посвящен вопросам оптимизации регуляторных функций организма с помощью энергообеспечивающих органотропных пептидных нуклеопроteidных комплексов, при предельных физических нагрузках, утомлении, астенизации, хронических заболеваний у спортсменов. Даны рекомендации по усилению влияния адаптогенов на физическую работоспособность и функциональное состояние спортсменов при работе «до отказа» в условиях горной местности или жаркого климата.

В четвертом томе сформулирована концепция применения фармнутриентов как лекарственных компонентов спортивного питания, основанная на идеологии «метаболического конструктора» персонализированной нутритивной поддержки спортсменов в зависимости от вида спорта, режима тренировок и особенностей организма спортсмена. Представлены результаты разработки и испытаний отечественных инновационных фармнутриентов МиоАктив-Спорт, МиоАктив-Старт и МиоАктив-Форсаж.



**Предварительные заявки на книги принимаются по адресу:**  
**scbmt@yandex.ru.**