

2014

БИОМЕДИЦИНА

MEDICINE
ISSN 2074-5982

2014

2

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

ПОЗДРАВЛЯЕМ:

За активное плодотворное сотрудничество при подготовке и проведении XXII Олимпийских зимних игр в Сочи в 2014 году, оказанную помощь в организации медико-биологического обеспечения спортсменов сборных олимпийских команд Российской Федерации награждены



КАРКИЩЕНКО
Владислав
Николаевич



медалью «За отличие в медицинском обеспечении спортсменов сборных команд России» Федерального медико-биологического агентства



КАРКИЩЕНКО
Николай
Николаевич

Каркищенко Владислав Николаевич

директор ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»
доктор медицинских наук, профессор имеет научный стаж 21 год в области фармакологии, клинической фармакологии, автор 112 научных работ, 6 патентов. Является руководителем 6 кандидатских и 1 докторской диссертации. Соавтор 5 научных монографий и 1 руководства. Заместитель главного редактора научного журнала «Биомедицина».

Каркищенко Николай Николаевич

Научный руководитель ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»
Член-корреспондент Российской академии медицинских наук; доктор медицинских наук, профессор Академик РАН и Международной академии астронавтики (Париж). имеет стаж научно-педагогической работы 47 лет в области фармакологии, клинической фармакологии. Лауреат Премии Ленинского комсомола, Государственных премий СССР (1987 и 1990 гг.), Премии Президиума РАН (1995 г.), Премии Правительства РФ в области науки и техники (2008 г.). Главный редактор научного журнала.

ПОЧЕТНОЙ ГРАМОТОЙ ФМБА России



ШУСТОВ
Евгений Борисович



КАПАНАДЗЕ
Гия Джемалиевич



ЛЮБЛИНСКИЙ
Станислав
Людвигович

Шустов Евгений Борисович

заместитель директора по научной работе ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» доктор медицинских наук, профессор Лауреат Государственной премии (2003 г.) Член-корреспондент РАЕН и Международной академии астронавтики (Париж). имеет научный стаж 29 лет в области фармакологии, клинической фармакологии, военная, космическая, морская, экстремальная, спортивная медицина, автор более 270 научных работ. Заместитель главного редактора научного журнала «Биомедицина».

Капанадзе Гия Джемалиевич

начальник научно-организационного отдела, руководитель отдела биомедицины ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», доктор биологических наук, имеет научно-педагогический стаж более 15 лет в области биологии, биомоделирования, лабораторного животноводства, доклинических исследований, автор более 100 научных работ. Заместитель главного редактора научного журнала «Биомедицина».

Люблинский Станислав Людвигович

заведующий лабораторией прикладной биотехнологии и биофармации ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», кандидат биологических наук, Заслуженный изобретатель СССР. Имеет научный стаж более 30 лет в области физиологии и биохимии человека и животных, автор 15 изобретений и 40 научных трудов.

Поздравляем **Фокина Юрия Владимировича**
с успешной защитой кандидатской диссертации

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

В.Н. Каркищенко (зам. гл. редактора),

Е.Б. Шустов (зам.гл. редактора), Н.В. Станкова (отв. секретарь)

К.А. Анохин (Москва)

Е.Е. Ачкасов (Москва)

Е.Ю. Бонитенко (Санкт-Петербург)

А.Т. Быков (Сочи)

Витан Влахов (Болгария)

В.М. Говорун (Москва)

А.М. Дыгай (Томск)

Г.Д. Капанадзе (Светлые горы, МО)

М.Ф. Киселев (Москва)

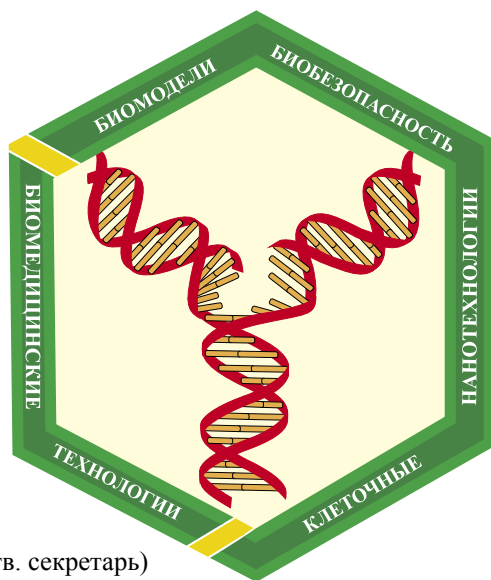
Р.С. Куздембаева (Казахстан)

В.Г. Кукес (Москва)

С.Л. Люблинский (Обнинск)

Ю.С. Макляков (Ростов-на-Дону)

Е.Л. Матвеевко (Светлые горы, МО)



А.И. Мирошников (Пушино, МО)

А.Н. Мурашов (Пушино, МО)

В.Б. Назаров (Химки, МО)

М.А. Пальцев (Москва)

А.С. Радилев (Санкт-Петербург)

Г.В. Раменская (Москва)

В.Р. Рембовский (Санкт-Петербург)

Д.А. Сычев (Москва)

Д.П. Фисенко (Москва)

Ю.В. Фокин (Светлые горы, МО)

Д.Ф. Хритинин (Москва)

Б.Д. Цыганков (Москва)

Д.Б. Чайванов (Москва)

Е.В. Ших (Москва)

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 05.06.2014 г.

Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

| | |
|---|----|
| Н.Н.Каркищенко, Н.В.Петрова, В.В.Слободенюк Высокоспецифичные видовые праймеры к генам Nat1 и Nat2 для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных..... | 4 |
| Н.И. Баранова, П.А. Алексеева, К.С. Чистяков, В.Н. Юсковец, С.В. Оковитый, А.В. Бурякина, Е.В. Федорова Поиск синтетических антикоагулянтов - ингибиторов сериновых протеаз: сочетание <i>in silico</i> и <i>in vitro</i> методов | 17 |
| Н.Н. Каркищенко, Ю.А. Чудина, Д.Б. Чайванов Синдромный анализ функциональных состояний в контексте трехмерной векторной модели | 25 |

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

| | |
|---|----|
| В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, И.С. Симулис, Г.А. Бояринов, А.И. Сенюрина Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах при консервации и воздействии озона | 37 |
| А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, Е.М. Гареев Роль макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани лабораторных животных, индуцированной биоматериалом Аллоплант | 43 |
| А.В. Лабенец, Г.Д. Капанадзе, Э.В. Бубуец Влияние синтетического нанопептида на сперматогенез у осетровых рыб..... | 51 |
| Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, О.В. Баранова, О.И. Степанова Использование гидробионтов для моделирования патологии паренхиматозных органов | 56 |

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

| | |
|---|----|
| И.И. Садртдинова, З.Р. Хисматуллина Стероидная регуляция нейронной возбудимости в переднем кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга у крыс линии WAG/Rij..... | 64 |
|---|----|

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

| | |
|---|----|
| А.О. Ревякин, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Д.А. Ксенофонтов Взаимовлияния микроэлементов в печени лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении | 73 |
| Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей Сообщение 2: Исследование последствий острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей | 80 |
| Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе, В.Н. Каркищенко, Н.В. Станкова, А.Е. Ким, С.Г. Полещук Особенности вегетативной регуляции сердечной деятельности у мини-свиней..... | 86 |

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

| | |
|---|-----|
| О.И. Авдеева, М.Н. Макарова, О.В. Афонькина, И.Е. Макаренко, В.Г. Макаров, Г.Д. Капанадзе Токсикологическая характеристика антигипертензивных средств, влияющих на ренин-ангиотензиновую систему..... | 99 |
| А.С. Васильев, М.Б. Плотников, О.И. Алиев, З.Т. Шульгау Гемореологическая активность экстракта левзеи сафлоровидной при стрептозотоцин-индуцированном диабете у крыс | 105 |

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

| | |
|---|-----|
| В.Г. Кукес, А.Б. Прокофьев, О.А. Горошко, О.А. Чеча Возможности медикаментозной коррекции напряжения кислорода в крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью | 114 |
| Е.А. Сокова, В.Г. Кукес Значение изучения полиморфизма гена <i>ABCB1</i> , кодирующего гликопротеин Р, для оценки отношения ожидаемой польза к возможному риску применения бета-адреноблокаторов у русских беременных с хронической артериальной гипертензией | 119 |

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.N.Karkischenko, N.V.Petrova, V.V.Slobodenuk

Highly specific species primers to genes Nat1 and Nat2 for comparative studies in humans and laboratory animals 4

**N.I. Baranova, P.A. Alekseeva, K.S. Chistyakov, V.N. Yuskovets,
S.V. Okovityi, A.V. Buryakina, E.V. Fedorova**

Development of synthetic anticoagulants - inhibitors of serine proteases: combining *in silico* and *in vitro* approaches 17

N.N. Karkischenko, Yu.A. Chudina, D.B. Chayvanov

Syndromic analysis of functional states in terms of the three-dimensional vector model 25

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

V.N. Krylov, A.V. Deryugina, I.S. Simutis, G.A. Boyarinov, A.I. Senyurina

Contents of ATP and 2,3-DPG in erythrocytes for preservation and ozone exposure 37

A.I. Lebedeva, S.A. Muslimov, L.A. Musina, E.M. Gareev

The role of macrophages in the regeneration of skeletal muscle tissue laboratory animals, induced by the Alloplant biomaterial 43

A.V. Labenets, G.D. Kapanadze, E.V. Bubunets

Effect of synthetic nanopeptide on spermatogenesis in sturgeons 51

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, O.B. Baranova, O.I. Stepanova

Use of hydrobionts for modelling pathology of parenchymatous bodies 56

BIOMEDICAL METHODS

I.I. Sadrtidinova, Z.R. Khismatullina

Steroid regulation of neuronal excitability in the anterior cortical nucleus of the brain's amygdala in WAG/Rij rats 64

LABORATORY ANIMALS

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

Interferences of trace elements in liver of laboratory animals at normal and excess food consumption 73

Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkishchenko

Influence of acute hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice
message 2: research of consequences of acute hypobaric hypoxia on female gametes of rats and mice 80

E.B. Shustov, G.D. Kapanadze, V.N. Karkischenko, N.V. Stankova, A.E. Kim, S.G. Poleschuk

Features vegetative regulation of cardiac activity in mini-pigs 86

NONCLINICAL TESTS

O.I. Avdeeva, M.N. Makarova, O.V. Afonkina, I.E. Makarenko, V.G. Makarov, G.D. Kapanadze

Toxicological properties of antihypertensive drugs acting on the renin-angiotenzin system 99

A.S. Vasil'ev, M.B. Plotnikov, O.I. Aliev, Z.T. Shulgau

The hemorheological activity of extract from rhaponticum cartamoides in streptozotocin-induced diabetic rats 105

CLINICAL RESEARCHES

V.G. Kukes, A.B. Prokofiev, O.A. Goroshko, O.A. Checha

Possibilities of medicamentous correction of tension of oxygen in blood at patients chronic heart failure 114

E.A. Sokova, V.G. Kukes

The significance of *ABCB1* gene *C3435T* polymorphism study for the evaluation of benefit/risk beta-blockers treatment in Russian pregnant women with chronic hypertension 119



Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных

Н.Н.Каркищенко, Н.В.Петрова, В.В.Слободенюк

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

Контактная информация: Каркищенко Николай Николаевич scbmt@yandex.ru

Работа посвящена изучению N-ацетиляционного полиморфизма, определяющего устойчивость к токсичности лекарств и онкологическим процессам, связанным с ароматическими и гетероциклическими аминами. Осуществлен биоинформационный анализ последовательностей генов *NAT1* и *NAT2* у людей, а также лабораторных животных. Сконструированы наиболее перспективные нуклеотидные последовательности мишеней, для использования в синтезе видоспецифичных праймеров для ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Проведены молекулярно-генетические исследования экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК у людей пяти разных популяционных групп, а также мышей, крыс и кроликов методом ОТ-ПЦР. Получены видоспецифичные праймеры для ОТ-ПЦР у людей и лабораторных животных для оптимизации экстраполяции биомоделей полиморфизма по *NAT1* и *NAT2*, а также для изучения механизмов сегрегации индивидуумов в медленные, средние или быстрые ацетиляторные фенотипы людей. В проведенной ПЦР мышей, крыс и кроликов было выявлено наличие высокоспецифичных участков гена и *NAT1* и *NAT2*. Первым этапом настоящих исследований стало получение реальных биомоделей и создание высокоспецифичных видовых праймеров к генам *NAT1* и *NAT2*. Это позволяет создать фундамент для экстраполяции получаемых в эксперименте данных в отношении человека.

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза (*NAT1*, *NAT2*), экспрессия генов *NAT1* и *NAT2*, олигонуклеотидные праймеры, биомодели ацетиляторного полиморфизма человека, лабораторные модели.

Процессы ферментативного ацетилирования ароматических аминов как у прокариотов, так и у эукариотов осуществляется с помощью N-ацетилтрансфераз (*NAT*). Этот процесс заключается в переносе ацетильных групп либо на амидную группу, либо на ОН-группу молекул субстратов. Абсолютное количество субстратов *NAT* является ксенобиотиками, мно-

гие из которых используются в качестве лекарственных средств. Чуть ли не единственным эндогенным субстратом *NAT1* является пара-аминобензоилглутамат, являющийся продуктом катаболизма фолиевой кислоты [7, 15, 16, 22].

Ферментативная активность *NAT* может изменяться в результате химической модификации находяще-

гося в активном центре цистеина. Например, физиологические концентрации перекиси водорода быстро ингибируют *NAT1* [3]. Это ингибирование является обратимым и снимается глутатионом. Также *NAT1* может обратимо ингибироваться нитрозотиолами, в частности S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламином и S-нитрозоглутатионом, которые образуют дисульфидные связи с цистеином⁶⁸ [10]. Сильный сульфгидрильный окислитель пероксинитрит быстро и необратимо инактивирует *NAT1* путем необратимой модификации цистеина активного центра [11, 12].

Гены *NAT* обладают полиморфизмом первичной структуры. В настоящее время известно четыре изоформы *NAT*, соответственно, *NAT1*, *NAT2*, *NAT3*, *NAT4*. У изоформ *NAT1* и *NAT2* было обнаружено много аллельных вариантов. Данные об аллельном полиморфизме генов *NAT1* и *NAT2* позволили выделить в человеческой популяции носителей мутаций, обладающих фенотипом медленных и быстрых ацетиляторов.

У медленных ацетиляторов, контактирующих с ароматическими аминами (β -нафтиламин, бензидин), повышен риск заболеваемости раком мочевого пузыря (и вероятно рака молочной железы, печени и легких) [4, 9, 13, 21, 24], что обусловлено накоплением в моче неконъюгированных N-гидроксипроизводных. У быстрых ацетиляторов скорость инактивации и выведения канцерогенных метаболитов существенно выше, но у них чаще регистрируется рак толстого кишечника, вызванный гетероциклическими аминами, образующимися при термической обработке пищи (в основ-

ном мяса) и активирующимися изоферментом *NAT2* [13].

Критическим моментом является изучение системы генов *NAT*, кодирующих целый комплекс ферментов II фазы детоксикации – ацетилирование ароматических и гетероциклических аминов фармакологической или токсической природы (ксенобиотиков, в том числе лекарств - сульфаниламидов, изониазида, кофеина и др.). *NAT1* не обладает широким генетическим полиморфизмом и ацетилюет лишь небольшое количество ариламинов. *NAT2*, в отличие от *NAT1*, генетически полиморфен и является ферментом ацетилирования многих лекарственных средств и ксенобиотиков. Субстратспецифичный профиль и тканевая экспрессия генов *NAT* определяют их функциональную роль как антиоксидантной системы [2, 5, 26].

В Научном центре биомедицинских технологий на протяжении последних 8 лет ведется работа по изучению полиморфизма, в том числе генов *NAT* и связи этого полиморфизма с функцией ацетилирования у мини-свиней и мышей различных инбредных линий [8]. При помощи праймеров, распознающих консервативные участки в генах *NAT*, нами были амплифицированы, и впоследствии клонированы фрагменты геномной ДНК мышей линий DBA2 и BALB/c и мини-свиней светлогорской популяции. Сравнение нуклеотидных последовательностей этих фрагментов с уже известными последовательностями генов *NAT1* и *NAT2* показало, что полученные фрагменты принадлежат генам семейства *NAT* у исследованных животных. При этом в случае мини-свиней полученный ген оказался геном

NAT1, а в случае мышей геном *NAT2*, соответствующие подобным генам человека.

Ацетиляционный полиморфизм связан не только с различными устойчивостями к токсичности лекарств, но и раковыми заболеваниями, связанными с ароматическими и гетероциклическими аминами. N-ацетиляция является катализом двух цитозольных N-ацетилтрансфераз (*NAT1* и *NAT2*), которые обезвреживают многие карциногенные ароматические амины. *NAT1* и *NAT2* также активируют N-гидроксилметаболиты ароматических и гетероциклических аминных карциногенов до составляющих, которые влияют на ДНК и инициируют рак. Классический N-ацетиляционный полиморфизм регулируется локусом *NAT2*, который сегрегирует индивидуумов в быстрые, средние и медленные ацетиляторные фенотипы.

Некоторые эпидемиологические исследования на людях связаны с медленными и быстрыми ацетиляторными фенотипами с повышением чувствительности в мочевом пузыре и колоректальным раком, соответственно. Ацетиляционный полиморфизм был охарактеризован в трех типах грызунов и у мини-свиней для проверки связи между ацетилятором фенотипа *NAT2* и восприимчивостью к ракам, вызванным ароматическими и гетероциклическими аминами в различных целевых органах опухоли. Были клонированы и последовательно представлены *NAT1* и *NAT2* из быстрых и медленных ацетиляторных мышей, сирийского хомяка и крысы. Реконбинанты *NAT1* и *NAT2* энзимов раскодированы, коды этих генов характеризовали их каталитическую активность

по активации (O-ацетиляция) и деактивации (N-ацетиляция) ароматических и гетероциклических аминных карциногенов. Ацетиляторный полиморфизм у мини-свиней, мышей, сирийского хомячка и крысы может быть описан как модель ацетиляционного полиморфизма человека [1].

Несмотря на имеющиеся литературные сообщения [2, 6, 18, 19, 25, 27, 29, 30] до настоящего времени не было предложено ни одной оптимальной биомодели, включая лабораторных животных, которая могла бы быть применима для изучения и описания ацетиляторного полиморфизма человека.

Цель нашего исследования заключалась в сравнительном изучении генов *NAT1* и *NAT2* у людей разных популяционных групп и различных видов лабораторных животных. На первоначальном этапе нами были обозначены следующие задачи:

- провести биоинформационный анализ последовательностей генов *NAT1* и *NAT2* у людей, а также мышей, крыс, кроликов для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей мишеней, для использования в синтезе видоспецифичных праймеров для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР);
- подобрать и исследовать оптимальные конечные концентрации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, ионов магния (Mg^{2+}) и олигонуклеотидных праймеров, подобрать расчетным и эмпирическим путем оптимальную температуру отжига олигонуклеотидных праймеров, согласно соотношению оснований G/C и A/T их

нуклеотидной последовательности, для полимеразной цепной реакции в реальном времени, оптимизировать количество повторяющихся циклов, при которых происходит наработка продуктов амплификации;

- провести молекулярно-генетические исследования экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК у людей пяти разных популяционных групп, а также мышей, крыс и кроликов методом ОТ-ПЦР;
- сравнить видоспецифичные праймеры для ОТ-ПЦР у людей и лабораторных животных для последующей оптимизации экстраполяции биомоделей ацетиляционного полиморфизма по *NAT1* и *NAT2*, а также для изучения механизмов сегрегации индивидуумов в медленные, средние или быстрые ацетиляторные фенотипы.

Материалы и методы

Объектом исследования служили мыши линии Balb/c, C57BL/6, CBA/lac, DBA/2, B10.GFP, крысы Wistar, August, WAG, кролики породы «Советская шиншилла». Материалом исследования от животных служила плазма крови. Всего было исследовано 300 мышей, 60 крыс, которых содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 10 голов. Животные соответствовали категории SPF. Кролики содержались в индивидуальных клетках батарейного типа на решетчатых полах. В качестве подстилки для всех видов животных использовали стерильные древесные опилки.

Для мелких лабораторных животных использовали стандартный комбикорм гранулированный полнораци-

онный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Нами были исследованы образцы крови 27 человек различных популяционных групп. Образцы крови забирались из вены в процессе плановых углубленных медицинских обследований. Поскольку в настоящей работе стояла задача создания и использования высокоспецифичных видовых праймеров к *NAT1* и *NAT2*, этническая и национальная принадлежность пациентов не учитывалась. В процессе углубленного и специального медицинского обследования у пациентов генетических нарушений не установлено.

Этапы эксперимента:

1. Выделение ДНК/РНК из пробы плазмы крови.
2. Амплификация геномной ДНК.
3. Идентификация ПЦР продуктов методом горизонтального электрофореза. Наличие в геле полоски ДНК соответствующего размера свидетельствовало о наличии в образце искомого гена.

Конструирование специфичных праймеров. С этой целью к генам *NAT1* и *NAT2* применяли биоинформационный анализ с помощью комплекса компьютерных программ Vector NTI Advance 9.0 (PC) (<http://www>.

invitrogen.com/site/us/en/home.html), DNASTAR, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>).

Экстракцию РНК из плазмы крови людей, а также лабораторных животных проводили с помощью комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «Ампли-Прайм РИБО-сорб» (АмплиСенс, г. Москва). Для реакции обратной транскрипции применяли комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» (АмплиСенс, г. Москва).

Синтез олигонуклеотидных праймеров и детекция экспрессии генов. Для детекции экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК у людей и разных видов лабораторных животных использовали специфические олигонуклеотидные праймеры (табл.1-3).

Синтез праймеров осуществлялся на автоматическом синтезаторе ДНК ASM-800 амидофосфитным методом.

Амплификация генов *Nat1* и *Nat2*. Стадию амплификации проводили в 25 мкл смеси: ПЦР Буфер (×10): 700 mM Трис-НСl, рН 8,6 / 25 °С, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, *Taq* - полимеразы, на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Для амплификации фрагментов гена *NAT1* применяли условия проведения реакции: 95 °С – 15 мин., затем 35 циклов: 94 °С – 30 сек., 54 °С – 30 сек., 72 °С – 30 сек., в конце 72 °С – 5 мин. и охлаждение до 6 °С с последующим хранением при 10 °С.

Для амплификации фрагментов *NAT2* гена применяли условия проведения реакции: 95 °С – 15 мин., затем 35 циклов: 94 °С – 30 сек., 52 °С – 30 сек.,

72 °С – 30 сек., в конце 72 °С – 5 мин. и охлаждение до 6 °С с последующим хранением при 10 °С.

После амплификации 6 мкл образца смешивали с 6 кратным буфером для загрузки и вносили в 2% агарозный гель (0,5 мкг/мл ЭБР). Электрофорез проводили при 50 А, 100 В на 1 см² в течение 30 минут. Продукты амплификации визуализировали при помощи системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

Результаты исследований

В результате проведенных исследований по биоинформационному анализу олигонуклеотидных последовательностей генов *NAT1* и *NAT2*, депонированных в электронной базе данных NCBI Gen Bank были отобраны наиболее перспективные последовательности праймеров для мишеней. Исследование будущей структуры олигонуклеотидных праймеров для ПЦР проводили на отсутствие внутренней вторичной структуры (отсутствие само- и взаимнокомплиментарности), отсутствие комплиментарности между 3'-концами (праймер-димеров, шпиклек).

Для подбора и исследования оптимальных концентраций компонентов, учитывая их стоковые концентрации и параметры синтезированных олигонуклеотидных праймеров, была проведена компоновка вариантов реакционных смесей ПЦР с термостабильной *Taq*-полимеразой. Исследование концентраций реакционных смесей позволило установить оптимальный вариант, в котором концентрация фермента составила 1,5 ед. на пробу. Такая концентрация лежит

в диапазоне 0,5-5,0 ед., что не приводит к уменьшению специфичности реакции. Концентрация праймеров от 10 до 15 пМ, что уменьшает вероятность возникновения неспецифического отжига праймеров и накоплению неспецифического продукта.

Рабочая концентрация свободных ионов Mg^{2+} составляет 2,5 mM в реакции, при данной концентрации не происходит ингибирование фермента полимеразы на 40-50% и не наблюдается неспецифических продуктов амплификации. Концентрация каждого dNTP в пределах 80 μ M. Уменьшение концентрации dNTP до такого предела допустимо, при котором происходит сохранение свободных ионов Mg^{2+} , поддерживающих активность фермента полимеразы на должном уровне, что, в свою очередь, не приводит к снижению отжига олигонуклеотидных праймеров и, как следствие, уменьшению выхода специфического продукта.

При проведении подбора расчетным путем оптимальной температуры отжига олигонуклеотидных праймеров и зондов, согласно соотношению оснований G/C и A/T их нуклеотидной последовательности для ПЦР была установлена средняя температура отжига праймеров для гена *NAT1* – 54 °C; для *NAT2* – 52 °C.

Учитывая размер амплифицируемых фрагментов в ПЦР было подобрано оптимальное время продолжительности этапов денатурации, отжига и элонгации – 30 сек, 30 сек и 30 сек соответственно.

Для молекулярно-генетического исследования экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК нами производилось выделение тотальной РНК из

образцов материала лабораторных животных: кроликов, крыс и мышей. Полученную тотальную РНК подвергали реакции обратной транскрипции для получения кДНК, применяемой в дальнейшей реакции ПЦР со специфическими праймерами (табл. 1-4). По истечении амплификации 10 мкл ампликонов смешивали с 6 кратным буфером для загрузки и вносили в 2% агарозный гель (0,5 мкг/мл ЭБР). Размер амплифицируемого продукта определяли с помощью маркера длин фрагментов 1000-50 п.н. в концентрации 0,5 мкг/мкл в буфере для нанесения на гель.

Специфичность ПЦР оценивалась по соответствию размера продуктов амплификации с размером, определенным каждой паре праймеров генов *NAT1* и *NAT2* конкретного лабораторного животного.

Видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* у лабораторных мышей

Таблица 1

Праймеры для видового типирования генов *NAT1* и *NAT2* у мышей

| Олигонуклеотидные праймеры мыши | Размер продукта (пар нуклеотидов) |
|---|--------------------------------------|
| N1musF GTYTRCTTTMAWCTGHTTG N1musR CACYATCMACCWCTYTTCTT | 433 |
| N2musF TTGWGAGRAAGAAGYGGRT N2musR TGYCRAACGGAAGWTGGCAG | 484 |

На рис.1 представлена электрофореграмма продуктов амплификации участков генов *NAT1* и *NAT2* у мышей.

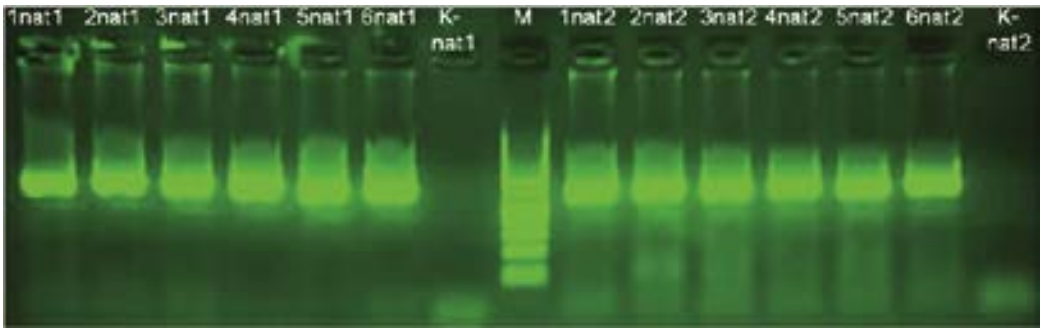


Рис. 1. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймерами N1mus и N2mus. *Обозначения:* М – маркер длин фрагментов от 50 до 1000 пар нуклеотидов; 1nat1–6nat1 треки продуктов амплификации гена *NAT1* мышей с соответствующими праймерами N1musF/N1musR; K-nat1, K-nat2 – отрицательные контроли; 1nat2–6nat2 – треки продуктов амплификации гена *NAT2* мышей с соответствующими праймерами N2musF/N2musR.

Для нас существенно важным было установление отсутствия неспецифических продуктов реакции. Важно также то, что амплификация проходила только с наработкой специфических фрагментов, соответствующих заявленным размерам (табл. 1). Это говорит о высокой видовой специфичности подобранных праймеров к генам *NAT1* и *NAT2* исследованных линий мышей. В то же время было выявлено наличие специфичных участков гена *NAT1* и *NAT2* у каждой мыши, вне зависимости от того, к какой линии они относились.

Видовые праймеры к генам Nat1 и Nat2 у лабораторных крыс

На рис.2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации участков генов *NAT1* и *NAT2* у крыс.

Проведенные ПЦР-исследования не выявили у крыс неспецифических продуктов реакции. В амплификации нарабатывались исключительно специфические фрагменты (табл. 2). Индивидуальные показатели каждой из крыс выявили специфичные участки генам *NAT1* и *NAT2*. Это также подтверждает

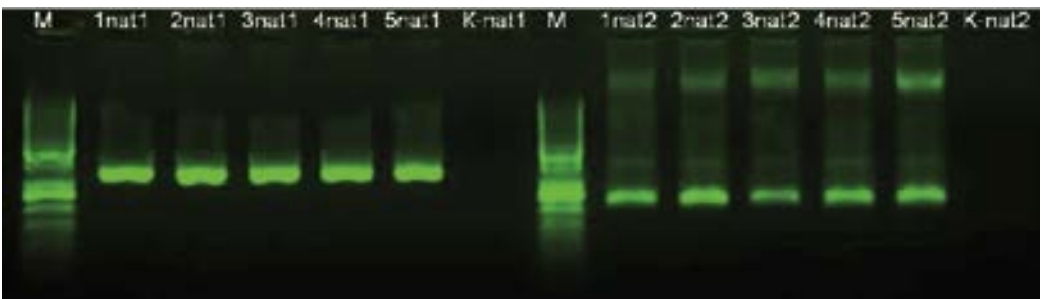


Рис 2. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймерами N1rat и N2rat. *Обозначения:* М – маркер длин фрагментов от 50 до 1000 пар нуклеотидов; 1nat1–5nat1 треки продуктов амплификации гена *NAT1* крыс с соответствующими праймерами N1ratF/N1ratR; K-nat1, K-nat2 – отрицательные контроли; 1nat2–5nat2 – треки продуктов амплификации гена *NAT2* крыс с соответствующими праймерами N2ratF/N2ratR.

высокую видовую специфичность полученных праймеров.

Таблица 2

Праймеры для видового типирование генов *NAT1* и *NAT2* у крыс

| Олигонуклеотидные праймеры крысы | Размер продукта (пар нуклеотидов) |
|---|-----------------------------------|
| N1ratF GAMCACAWAGTAAGGAAARGCG N1ratR CAAMGAAAGAYGGCWGGCA | 388 |
| N2ratF GAYARAAGAGAAYGRAACCT N2ratR GARCMAACCAAACARTGAAC | 255 |

Видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* у кроликов

На рис.3 представлена электрофореграмма продуктов амплификации участков генов *NAT1* и *NAT2* у кроликов.

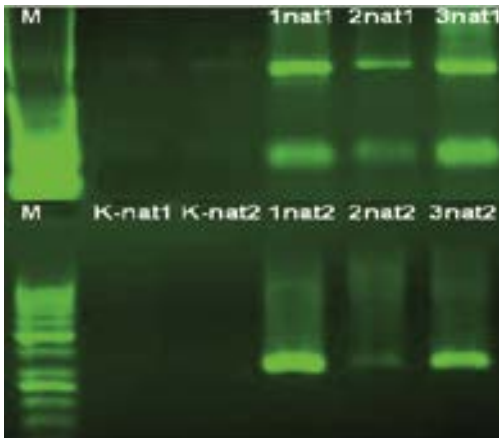


Рис. 3. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймерами N1rab и N2rab. *Обозначения:* М – маркер длин фрагментов от 50 до 1000 пар нуклеотидов; 1*nat1*–3*nat1* треки продуктов амплификации гена *NAT1* кроликов с соответствующими праймерами N1rabF/N1rabR; K-*nat1*, K-*nat2* – отрицательные контроли; 1*nat2*–3*nat2* – треки продуктов амплификации гена *NAT2* кроликов с соответствующими праймерами N2rabF/N2rabR.

В проведенной ПЦР было выявлено наличие специфичных участков гена и *NAT1* и *NAT2*. Как и у мышей, и крыс у кроликов путем амплификации нарабатывались исключительно специфические фрагменты (рис. 3, табл. 3).

Таблица 3

Праймеры для видового типирование генов *NAT1* и *NAT2* у кроликов

| Олигонуклеотидные праймеры кролика | Размер продукта (пар нуклеотидов) |
|---|-----------------------------------|
| N1rabF CCAGGYCTCCACWTTAGYA N1rabR GCTYCCWACTCCTGAMTTCT | 446 |
| N2rabF GTTWGGAGGGYTTGTTWTG N2rabR GGTTGAHGAGYAAWGCAGTA | 324 |

Видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* у человека

Специфичность ПЦР оценивалась по соответствию размера продуктов амплификации с размером, определенным каждой паре праймеров генов *NAT1* и *NAT2* каждого из обследованных пациентов (рис. 4), что находилось в полном соответствии с данными у исследованных лабораторных животных (рис. 1-3). В табл. 4 указаны основные последовательности олигонуклеотидных праймеров, исследованных людей, вне зависимости от их популяционной принадлежности.

На рис.4 представлена электрофореграмма продуктов амплификации участков генов *NAT1* и *NAT2*, характерные для всех исследованных пациентов.

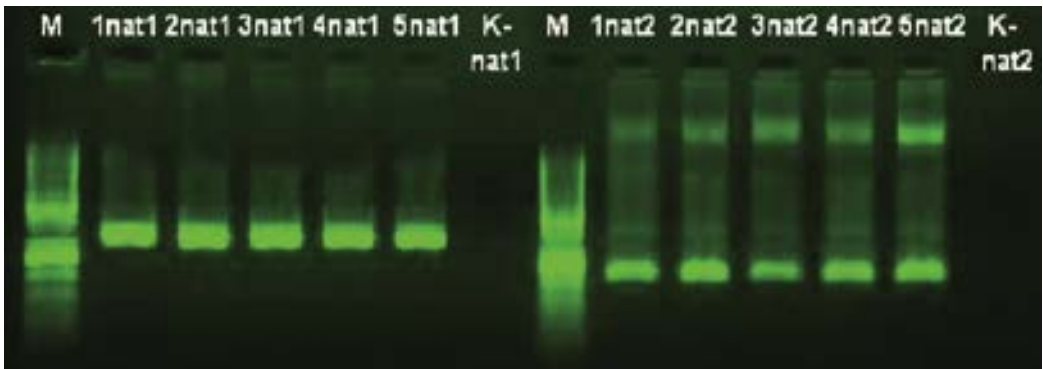


Рис. 4. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймерами N1hom и N2hom. *Обозначения:* М – маркер длин фрагментов от 50 до 1000 пар нуклеотидов; 1nat1–5nat1 треки продуктов амплификации гена *NAT1* человека с соответствующими праймерами N1homF/N1homR; K-nat1, K-nat2 – отрицательные контроли; 1nat2–5nat2 – треки продуктов амплификации гена *NAT2* человека с соответствующими праймерами N2homF/N2homR.

Таблица 4
**Праймеры для типирование генов
NAT1 и *NAT2* у человека**

| Олигонуклеотидные праймеры человека | Размер продукта (пар нуклеотидов) |
|--|-----------------------------------|
| N1homF AAGYTGTGMGAAGAAMTCGG N1homR ACTGTTCCCTTCTGATTTGG | 333 |
| N2homF GRACCWAAYCAGGAGARAGC N2homR AGSCCACCACAWACAGYAAACC | 227 |

Важная роль феномена ацетилирования у людей при различных социально-значимых болезнях, применении лекарственных средств различных групп и показаний, а также выявление роли ксенобиотиков на здоровье специальных контингентов и населения в целом делает проблему изучения роли N-ацетилтрансфераз весьма актуальной и животрепещущей.

Обсуждение результатов

Наиболее широко в литературе представлены данные исследований, посвященных изучению роли полиморфизма ацетилирования при развитии онкологических заболеваний легких и кишечника [8, 28], ревматоидном артрите [2323], а также при анализе фармакокинетики и гепатотоксичности различных препаратов [17, 20]. Известно, что в зависимости от особенностей фенотипа ацетилирования люди делятся на 3 типа: «быстрые» ацетиляторы, «промежуточные» и «медленные» [14]. У «медленных» ацетиляторов обнаруживается повышенная чувствительность не только к изониазиду, но и к сульфаниламидам, ариламинам, гидразинам, к некоторым антиаритмическим и другим препаратам.

Механизм токсического действия препаратов связан с медленным выведением лекарств из-за сниженной скорости ацетилирования, а, следовательно, и выведения препарата, происходит накопление препарата. При носительстве двух «медленных» аллелей гена *NAT2* продуцируется фермент с пониженной

активностью, вследствие чего повышена чувствительность организма к воздействию ароматических аминов.

При носительстве хотя бы одного «быстрого» аллеля продуцируется фермент с повышенной активностью, из-за чего повышена чувствительность к воздействию гетероциклических аминов. При носительстве двух «медленных» аллелей гена *NAT2* увеличен риск развития онкологических заболеваний, вызываемых воздействием ароматических аминов, особенно рака мочевого пузыря, а также повышается риск побочных эффектов при приеме стандартных доз прокаиамида.

Вызывает удивление, что вопросам выяснения механизмов нарушения и даже особенностей *NAT*-ацетилирования уделяется столь малое значение. Отсутствие реальных биологических моделей этих процессов, протекающих у человека, серьезно тормозит дальнейший прогресс в распознавании интимных процессов, протекающих при развитии онкологических заболеваний, гепатотоксичности, ревматоидных болезнях, заболеваний дыхательной и гастроинтестинальной системы. Поэтому первым этапом настоящих исследований стало получение реальных биомоделей и создание высокоспецифичных видовых праймеров к генам *NAT1* и *NAT2*. Эти исследования были бы неполными без оценки соответствующих процессов у людей. Только сочетание этих исследований позволяет создать фундамент для экстраполяции получаемых в эксперименте данных в отношении человека.

В соответствии с целями и задачами, определенными в данной работе, нами установлено следующее. В результате

проведенной ПЦР неспецифических продуктов реакции не наблюдалось, амплификация проходила только с наработкой специфических фрагментов, что говорит о высокой видовой специфичности подобранных праймеров к генам *NAT1* и *NAT2* исследуемых лабораторных животных (мыши, крысы, кролики). У каждого лабораторного животного было выявлено наличие специфичных участков гена *NAT1* и *NAT2*. Аналогичные данные получены у 27 пациентов, не имеющих генетических патологий и относящихся к разным популяционным группам.

Нашим дальнейшим движением в этом направлении является изучение генов N-ацетилтрансферазы (*Nat1* и *Nat2*) у различных лабораторных животных с целью исследования полиморфизма генов, с использованием метода ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов ДНК), что позволит потенциально выявить ферментативную активность на уровне целостного организма. Мы надеемся, что это позволит выявить у животных некоторые аллели, наиболее близкие к таковым у человека.

Список литературы

1. **Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.** Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов *NAT* у человека и животных-моделей // Биомедицина, № 4 2006, с. 85.
2. **Aguiar F.A., Malvar Ddo C., Vaz Ade L., Calixto L.A., Clososki G.C., de Gaitani C.M., de Souza G.E., Jabor V.A.** Simultaneous determination of dipyrone metabolites in rat hypothalamus, cerebrospinal fluid and plasma samples by LC-MS/MS //

- Bioanalysis. 2013. 21: 2631-2645.
3. **Atmane N., Dairou J., Paul A., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (*NAT1*). Reversible inactivation by hydrogen peroxide // *J Biol Chem.* 2003. 278: 35086–35092.
 4. **Bell D.A., Stephens E.A., Castranio T., Umbach D.M., Watson M., Deakin M., Elder J., Hendrickse C., Duncan H., Strange R.C.** Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (*NAT1*) increases risk of colorectal cancer // *Cancer Res.* 1995. 55: 3537–3542.
 5. **Bell D.A., Taylor J.A., Butler M.A., Stephens E.A., Wiest J., Brubaker L.H., Kadlubar F.F., Luder G.W.** Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (*NAT2*) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans // *Carcinogenesis.* 1993. 14 (8): 1689-1692.
 6. **Bősze Zs., Houdebine L.M.** Applications of Rabbits in Biomedical Research: Review. // *World Rabbit Sci.*, 2006, 14, 1-14. WRSA, UPV, 2003.
 7. **Butcher N.J., Minchin R.F.** Arylamine N-Acetyltransferase 1: A Novel Drug Target in Cancer Development // *Pharmacol Rev.* 2012. 64:147–165.
 8. **Cai J., Zhao Y., Zhu C.L. et al.** The association of *NAT1* polymorphisms and colorectal carcinoma risk: evidence from 20 000 subjects. *Mol. Biol. Rep.* 2012; 39 (7): 7497–7503.
 9. **Cascorbi I., Roots I., Brockmoller J.** Association of *NAT1* and *NAT2* Polymorphisms to Urinary Bladder Cancer: Significantly Reduced Risk in Subjects with *NAT1*10* // *Cancer Reserch.* 2001. V. 61. P. № 1. 5051–5056.
 10. **Dairou J., Atmane N., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** Reversible inhibition of the human xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 by S-nitrosothiols // *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 307: 1059–1065.
 11. **Dairou J., Atmane N., Rodrigues-Lima F., Dupret J.M.** Peroxynitrite irreversibly inactivates the human xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (*NAT1*) in human breast cancer cells: a cellular and mechanistic study // *J Biol Chem.* 2004. 279: 7708–7714.
 12. **Dairou J., Malecaze F., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** The xenobiotic-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases in human lens epithelial cells: inactivation by cellular oxidants and UVB-induced oxidative stress // *Mol Pharmacol.* 2005. 67: 1299–1306.
 13. **Deitz A.C., Zheng W., Leff M.A., Gross M., Wen W.Q., Doll M.A., Xiao G.H., Folsom A.R., Hein D.W.** N-Acetyltransferase-2 Genetic Polymorphism, Well-done Meat Intake, and Breast Cancer Risk among Postmenopausal Women // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2000. 9: 905–910.
 14. **Hein D.W., Doll M.A.** Accuracy of various human *NAT2* SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenomics.* 2012; 13 (1): 31–41.
 15. **Jensen L.E., Hoess K., Mitchell L.E., Whitehead A.S.** Loss of function polymorphisms in *NAT1* protect against spina bifida // *Hum Genet.* 2006. 120:52–57.

16. **Johnson N., Bell P., Jonovska V., Budge M., Sim E.** NAT gene polymorphisms and susceptibility to Alzheimer's disease: identification of a novel NAT1 allelic variant // BMC Medical Genetics. 2004. 5:6.
17. **Kagaya H., Miura M., Niioka T. et al.** Influence of NAT2 polymorphisms on ulfamethoxazole pharmacokinetics in renal transplant recipients. Antimicrob. Agents Chemother. 2012; 56 (2): 825–829.
18. **Kawamura A., Graham J., Mushtaq A., Tsiftoglou S.A., Vath G.M., Hanna P.E., Wagner C.R., Sim E.** Eukaryotic arylamine N-acetyltransferase Investigation of substrate specificity by high-throughput screening // Biochemical Pharmacology. 2005. 69: 347–359.
19. **Kawamura A., Westwood I., Wakefield L., Long H., Zhang N., Walters K., Redfield C., Sim E.** Mouse N-acetyltransferase type 2, the homologue of human Nacetyltransferase type 1 // Biochem Pharmacol. 2008. 75(7): 1550-1560.
20. **Leiro-Fernandez V., Valverde D., Vazquez-Gallardo R. et al.** N-acetyltransferase 2 polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Caucasians. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2011; 15 (10): 1403–1408.
21. **McGrath M., Michaud D., De Vivo I.** Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women // BMC Cancer 2006. 6:239.
22. **Minchin R.F., Hanna P.E., Dupret J.M., Wagner C.R., Rodrigues-Lima F., Butcher N.J.** Arylamine N-acetyltransferase I // Int J Biochem Cell Biol. 2007. 39: 1999–2005.
23. **Oqal M.K., Mustafa K.N., Irshaid Y.M. et al.** N-acetyltransferase-2 genotypes among patients with rheumatoid arthritis attending Jordan University Hospital. Gen. Test Mol. Biomarkers. 2012; 16 (9): 1007–1010.
24. **Potter J.D.** Colorectal Cancer: Molecules and Populations // Journal of the National Cancer Institute. 1999. 91(11): 916-932.
25. **Russell A.J., Westwood I.M., Crawford M.H., Robinson J., Kawamura A., Redfield C., Laurieri N., Lowe E.D., Davies S.G., Sim E.** Selective small molecule inhibitors of the potential breast cancer marker, human arylamine Nacetyltransferase 1, and its murine homologue, mouse arylamine N-acetyltransferase 2 // Bioorg Med Chem. 2009. 17: 905–918.
26. **Sim E., Walters K., Boukouvala S.** Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. Drug Metab. Rev. 2008; 40 (3): 479–510.
27. **Zabetian M., Tahmoorespur M, Hosseini Kh.** The applications of Transgenic Rabbits in Agriculture and Biomedicine. Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad. // J Animal and Veterinary Advances, 2011, 10: 780-790. Medwell Journals, 2011.
28. **Zabost A., Roszkowska-Sliz B., Wiatr E. et al.** Polymorphism in the N-acetyltransferase 2 gene in patients with lung cancer. Short communication. Pneumonol. Allergol. Pol. 2012; 80 (4): 323–328.
29. **Zeller A., Pfuhler S.** N-acetylation of three aromatic amine hair dye precursor molecules eliminates their genotoxic potential // Mutagenesis. 2013. 1–12.

30. *Zhao S., Wei K., Yu Q., Li Y., Cheng F., Wang Y., Yang P., Fan J., Liu E.* General topic: Applications of Transgenic Rabbits in Biomedical

Research – Based on Literature Search // World Rabbit Sci. 2010, 18: 159-167 doi:10.4995/wrs.2010.7279 WRSA, UPV, 2003.

Highly specific species primers to genes *Nat1* and *Nat2* for comparative studies in humans and laboratory animals

N.N.Karkischenko, N.V.Petrova, V.V.Slobodenuk

The work is devoted to the study of N-acetylation polymorphism, determining resistance to the toxicity of drugs and cancer processes connected with aromatic and heterocyclic amines. Bioinformatic analysis of gene sequences *NAT1* and *NAT2* in humans and laboratory animals was done. The most promising nucleotide sequence of targets, for use in the synthesis of species-specific primers for PCR (reverse transcription (RT-PCR) were designed. Gene expression *NAT1* and *NAT2* at the level of mRNA in people five different population groups, as well as mice, rats and rabbits RT-PCR were molecular-genetic studied. Specific primers for RT-PCR in humans and laboratory animals for optimization of extrapolation of biomodule polymorphism on *NAT1* and *NAT2*, as well as to study mechanisms of segregation of individuals in a slow, medium or fast acetylator phenotype of men received. By PCR mice, rats and rabbits have revealed the presence of highly specific areas of the gene and *NAT1* and *NAT2*. Real biomodels and create a very specific primers to genes *NAT1* and *NAT2* was the first stage of this study. The study allows approach to extrapolation of results on human beings.

Key words: N-acetyltransferase (*NAT1*, *NAT2*) gene expression *NAT1* and *NAT2*, oligonucleotide primers, biomodels human acetylator polymorphism, laboratory models.

Поиск синтетических антикоагулянтов – ингибиторов сериновых протеаз: сочетание *in silico* и *in vitro* методов

Н.И. Баранова, П.А. Алексеева, К.С. Чистяков, В.Н. Юсковец,
С.В. Оковитый, А.В. Бурякина, Е.В. Федорова

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

Контактная информация: к.х.н. Федорова Елена Викторовна,
elena.fedorova@pharminnotech.com

В работе представлен модельный подход, основанный на интеграции расчётной теории (*in silico*-экспериментов) и экспериментов, поставленных *in vitro* к поиску, оптимизации и созданию новых молекул, обладающих сродством к семейству сериновых протеаз.

Авторы выражают признательность компании Novartis AG за помощь в проведении экспериментов *in vitro* в рамках программы «Novartis in-kind collaborations», а также персональную благодарность их научным сотрудникам-биологам Ulrich Hassiepen и Gabriela Monnet.

Ключевые слова: количественные соотношения структура-активность (QSAR), молекулярный докинг, ингибиторы сериновых протеаз, каскад свертывания, высокопроизводительный скрининг.

Цель

Применение комбинированного подхода, основанного на сочетании *in silico* и *in vitro* методов при поиске потенциальных ингибиторов сериновых протеаз.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения занимают первое место в мире среди причин смерти людей. Одним из основных компонентов схем лечения ишемической болезни сердца, острого коронарного синдрома, тромбозов при травмах, трансплантации, крупных хирургических вмешательствах является антикоагулянтная терапия.

Среди мишеней для действия потенциальных антикоагулянтов одними из наиболее перспективных являются

сериновые протеазы системы свертывания крови. В клинической практике широко применяются пероральные ингибиторы Ха фактора (ривароксабан, аписабан) и Па фактора (дабигатрана этексилат). Интерес также представляет поиск новых антикоагулянтов в ряду ингибиторов таких сериновых протеаз, как фактор VIIa, IXa, XIa, XIIa, калликреин.

Сочетание *in silico* и *in vitro* методов на ранних этапах скрининга активных молекул значительно повышает результативность поиска новых лекарственных средств. [1]. Поскольку методы прогнозирования требуют подтверждения их достоверности с помощью исследования на биообъектах, например, с помощью высокопроизво-

дательного скрининга на изолированных ферментах [2]. Совместное использование хемоинформатических и биологических методов скрининга позволяет снизить расходы на синтетические и аналитические исследования, так как дает возможность исследовать соединения уже на этапе виртуальных молекул.

В настоящей работе использован рациональный модельный подход, основанный на интеграции расчётной теории и эксперимента *in vitro* для поиска новых синтетических ингибиторов сериновых протеаз каскада свертывания.

Материалы и методы

Объекты исследования

Объектами исследования служили органические соединения, синтезированные на кафедрах неорганической химии (Баранова Н.С., заведующий кафедрой - профессор Москвин А.В.) и органической химии (Юсковец В.Н., заведующий кафедрой – профессор Яковлев И.П.), относящиеся к производным пиримидинов, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов.

Дизайн эксперимента

Компьютерное выявление активных структур проводили, используя комбинированный *in silico/in vitro* подход, включавший следующие этапы:

- препроцессинг собственной базы соединений - удаление структур, не удовлетворяющих правилу Липинского (drug likeness) [3];
- постпроцессинг соединений с использованием неспецифических моделей активностей соединений на базе PASS online и их токсичности на базе GUSAR online;

- скрининг потенциальных лигандов на специфическую активность (ингибирование IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa факторов и калликреина) с помощью QSAR-моделей;
- молекулярный докинг структур с оценкой значения скоринг-функции и характера взаимодействия белок-лиганд;
- высокопроизводительный скрининг *in vitro* на изолированных компонентах свертывания крови человека (факторы свертывания IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, калликреин) с помощью хромогенных субстратов;
- выбор соединений-лидеров.

Исследование *in silico*

Для прогнозирования профилей биологической активности в виде MOL-файлов были представлены структурные формулы 1104 химических соединений, относящиеся к производным пиримидинов, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов.

Препроцессинг баз данных был основан на допустимых значениях оценок физико-химических свойств (так называемый drug-likeness) - липофильности, допустимому интервалу молекулярной массы, количеству доноров и акцепторов водородной связи, значению молярной рефракции (правило Липинского), а также числу свободных ротационных связей.

Постпроцессинг осуществляли, анализируя предсказанные спектры активности и токсичности соединений с использованием Интернет-ресурсов PASS-online и GUSAR-online (Pharmaexpert.ru). Соединения отбрасывали в том случае, если $P_a > P_i$

для нежелательных эффектов (мутатогенность, тератогенность, канцерогенность, раздражающее действие), а также расчётное значение LD_{50} составляло менее 15 мг/кг для перорального введения.

На следующем этапе проводили скрининг потенциальных лигандов на специфическую активность с помощью QSAR-моделей в программе GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships), созданной с использованием среды программирования Delphi 5.0 Professional. Нами были созданы модели количественного соотношения между химической структурой и значением полуингибирующей концентрации на следующие мишени: IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa факторы свертывания и калликреин. Устойчивость и репрезентативность моделей оценивали по объёму ($V > 5$) и значениям коэффициентов корреляции ($R^2 > 0,7$ и $Q^2 > 0,6$).

Молекулярный докинг проводили, используя программу предсказания белок-лигандных взаимодействий FlexX [4]. Критерием оценки взаимодействия между исследуемыми соединениями и мишенью служила величина оценочной функции (скоринг-функция), выраженная в ккал/моль и определяемая как энергия взаимодействия лиганда с ферментом. Также учитывали пространственный характер связывания вещества с мишенью посредством образования связей с ключевыми аминокислотами в сравнении с известными агонистами или антагонистами.

Исследование in vitro

В экспериментах были использованы IIa и Xa факторы (Hematologic Technolo-

gies Inc., США), фактор VIIa (Novo Nordisk Pharma AG, Швейцария), факторы XIa, XIIa и калликреин плазмы (Kordia, Нидерланды), фактор IXa (Cellscience, США).

Все растворы белков и пептидов хранили в силиконизированных пробирках (Life Systems Design, Швейцария). Растворы исследуемых соединений переносили в 384-луночные планшеты с общим объемом лунки 25,25 мкл (Labsystems Oy, Финляндия) с помощью CyBi-Hummingwell дозатора (CyBio AG, Германия). Растворы ферментов и субстратов добавляли в планшеты с помощью CyBi-well 384-канального дозатора (CyBio AG, Германия).

Измерение проводили при комнатной температуре в 384-луночных планшетах. Исследуемые вещества растворяли в смеси ДМСО-вода в соотношении 9:1. Предварительно в каждую лунку помещали по 250 нл раствора исследуемого вещества и 12,5 мкл раствора фермента в буфере. После преинкубации в течение 70 мин при комнатной температуре реакцию запускали добавлением 12,5 мкл раствора соответствующего субстрата. Влияние вещества на активность фермента определяли как линейную часть логарифмической кривой и фиксировали через 1 час. Конечные концентрации исследуемых веществ в растворе составляли от 1 нМ до 100 мкМ.

Измерение проводили на планшетном спектрофотометре Ultra reader (TECAN, Швейцария). Для возбуждения флуоресценции красителя Rh110 использовали фильтр с длиной волны 485 нм, испускаемое свечение регистрировали при длине

волны 535 нм. Для повышения соотношения сигнал-шум использовали дихроические зеркала. Все флуорофоры возбуждали тремя вспышками на одно измерение.

Значения IC_{50} рассчитывали как отношение процента ингибирования к ингибирующей концентрации по следующей формуле:

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x / IC_{50})^p),$$

где Y – процент ингибирования при ингибирующей концентрации x

$A1$ – минимальное значение ингибирования

$A2$ – максимальное значение ингибирования

p – коэффициент Хилла

Расчёт и обработку кривых производили методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Helios.

Таблица 1

Условия проведения анализа

| Мишень | Фермент | Субстрат | Концентрация фермента, нМ | Концентрация субстрата, мкМ | Состав буферного раствора |
|-------------|--|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--|
| Фактор IIa | Тромбин человека (фактор IIa) | Bz-Val-Pro-Arg-Rh110-D-Pro | 0,4 | 0,5 | 50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4 |
| Фактор VIIa | Фактор VIIa, человека, рекомбинантный | dPhe-Pro-Arg-Rh110-D-Pro | 15 | 0,5 | 100 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 5 мМ CaCl ₂ , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4 |
| Фактор IXa | Нативный фактор IXa, очищенный, из плазмы человека | dLeu-Gly-Arg-Rh110-D-Pro | 20 | 0,5 | 50 мМ Трис, 125 мМ NaCl, 5 мМ CaCl ₂ , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4 |
| Фактор Xa | Фактор Xa человека | Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Rh110-γGlu | 0,625 | 0,5 | 50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4 |
| Фактор XIa | Фактор XIa человека | dLeu-Pro-Arg-Rh110-γGlu | 0,5 | 0,5 | 50 мМ HEPES, 125 мМ NaCl, 5 мМ CaCl ₂ , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4 |
| Фактор XIIa | Фактор XIIa человека | dPro-Phe-Arg-Rh110-γGlu | 1,5 | 0,5 | 50 мМ HEPES/NaOH, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,8 |
| Калликреин | Калликреин плазмы человека | dPro-Phe-Arg-Rh110-γGlu | 0,025 | 0,5 | 50 мМ HEPES/HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,8 |

Примечание: HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, CHAPS - 3-[(3-холамидопропил)диметиламмония]-1-пропансульфонат.

Результаты и их обсуждение

Исходная база соединений содержала 1104 объекта, принадлежащих к классам гетеро- и алициклических органических соединений – производных, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов. Выявления активных структур компьютерными методами проводили, применяя комбинированный *in silico/in vitro* подход, который включал в себя несколько этапов (рис. 1).

После первичного скрининга с использованием правила Липинского было отобрано 48 соединений. Пример

процедуры препроцессинга представлен в таблице 2.

Соединение с шифром 122.NB.0114 не удовлетворяет правилу Липинского по параметру «число акцепторов водородной связи», которое не должно превышать 5. Анализ данных постпроцессинга позволил отсеять потенциально токсичные вещества [5]. Пример данных постпроцессинга представлен в таблице 3.

В таблице указаны два соединения, отсеянные на этапе постпроцессинга: с шифрами 247.NB.0114 и 018.NB.0114,

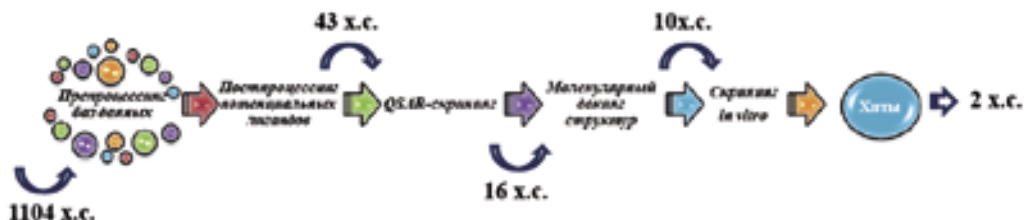


Рис. 1. Блок-схема этапов комбинированного *in silico/in vitro* подхода.

Таблица 2

Пример анализа данных при препроцессинге

| Вещество | Число свободных ротационных связей | logP | Число доноров водородной связи | Число акцепторов водородной связи | Молярная масса, г/моль | Молярная рефракция, см ² |
|-------------|------------------------------------|-------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 247.NB.1213 | 1 | 3,82 | 1 | 3 | 247,1 | 57,3 |
| 122.NB.0114 | 2 | 0,875 | 1 | 6 | 223,2 | 54,796 |
| 093.NB.0114 | 2 | 2,52 | 2 | 3 | 194,2 | 49,4 |

Таблица 3

Пример анализа данных при постпроцессинге

| Вещество | LD ₅₀ GUSAR, мг/кг, крысы п/о | Вероятность возникновения нежелательных эффектов PASS, P ₂ /P _i | | | |
|-------------|--|---|-----------------|----------------|-----------------------|
| | | Мутагенность | Канцерогенность | Тератогенность | Раздражающее действие |
| 247.NB.0114 | 1514 | - | - | - | 0,470/0,025 |
| 122.EV.0114 | 1320 | - | - | - | - |
| 018.NB.0114 | 302.4 | 0,334/0,04 | 0,415/0,003 | 0,230/0,120 | - |

не удовлетворяющие по токсикологическим свойствам. В итоге, по результатам неспецифического постпроцессинга были выбраны 43 вещества.

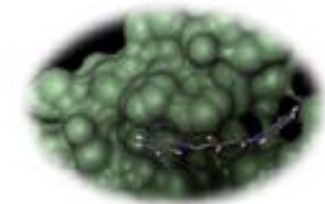
Таблица 4

**Прогностические результаты
полуингибирующей концентрации на Ха
фактор для некоторых соединений**

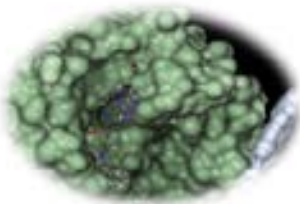
| Объект | IC ₅₀ |
|-------------|-----------------------|
| 931.NB.1213 | 3,04·10 ⁻⁶ |
| 105.NB.1213 | 1,11·10 ⁻⁴ |
| 247.NB.1213 | 2,05·10 ⁻⁶ |
| 093.NB.0114 | 6,50·10 ⁻⁶ |
| 177.VY.1213 | 1,2·10 ⁻⁹ |
| 277.VY.1213 | 5,6·10 ⁻⁸ |

Ранее было показано, что пороговым значением для отбора соединений на указанных моделях является IC₅₀ больше 1·10⁻⁵. Поэтому по результатам GUSAR-анализа на специфические мишени для дальнейшего молекулярного докинга отобрали 16 соединений.

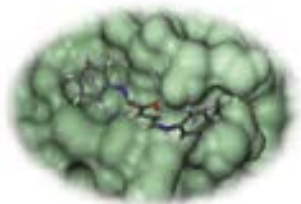
Для всех исследуемых соединений, при проведении молекулярного докинга, значения оценочной функции (ОФ) было удовлетворительно и приближалось к таковому для соединений сравнения (дабигатрана этексилат) (табл.5). Примеры образования белок-лигандных комплексов отобрали соединения с мишенями представлены на рисунке 2.



FXIIa



FXa



IIa (тромбин)

Рис. 2. Белок-лигандные комплексы.

Таблица 5

**Взаимодействие веществ с
характеристическими аминокислотами
активного центра тромбина**

| Аминокислоты | Соединение сравнения – дабигатран (О.Ф. = -25 ккал/моль) | | | | |
|--------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | 247.NB.1213 (О.Ф. = -24 ккал/моль) | 178.NB.1213 (О.Ф. = -23 ккал/моль) | 152.EK.0713 (О.Ф. = -20 ккал/моль) | | |
| His57 | + | - | + | - | |
| Trp215 | + | - | - | - | |
| Gly216 | + | + | + | + | |
| Gly219 | + | + | + | + | |
| Glu192 | + | + | + | - | |
| Leu99 | + | + | - | + | |
| Trp60D | + | + | - | - | |

По результатам молекулярного докинга отобрали 10 соединений, продемонстрировавших связывание более чем с 50% ключевых аминокислот. Отобранные по результатам *in silico* подходящие химические соединения далее были отправлены на скрининг *in vitro*. Два соединения **177.VY.1213** и **277.VY.1213** показали неспецифическую активность в отношении сериновых протеаз каскада свертывания, при этом наиболее выра-

женное влияние наблюдали на энзиматическую функцию XIIIa фактора. Тогда как соединения из класса 1,3,4-оксадиазолов оказались неактивны, а одно из веществ, наоборот, проявило индукторное влияние на активность XIIIa фактора свертывания (табл. 6).

Таким образом, по результатам комбинированного *in silico/in vitro* подхода было отобрано два соединения (177.VY.1213 и 277.VY.1213), перспективных для дальнейшей оптимизации (hit to lead optimization), расширения и идентификации соединений значительно более активных, чем 177.VY.1213 и 277.VY.12. В отношении 8-ми соединений из класса 1,3,4-оксадиазолов, оказавшихся неактивными в результате *in vitro* скрининга, требуется эксперимен-

тальная проверка их активности *in vivo* с целью исключения ложноотрицательного результата, полученного в результате применения *in silico* метода.

Выводы

Проделанная работа является примером интеграции расчётной теории *in silico*-экспериментов и экспериментов, поставленных на *in vitro*, позволившая идентифицировать биологически активные молекулы по отношению к ферментам из класса сериновых протеаз. С целью уменьшения процента ложноположительных и исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется дополнять использованный комбинированный подход данными *in vivo*-экспериментов.

Таблица 6
Значение полуингибирующих концентраций ведущих соединений

| Соединение | Фактор VIIa | | | Фактор IXa | | | Фактор Xa | | | Фактор XIa | | | Фактор XIIa | | | Калликреин | | | Тромбин (фактор IIa) | | |
|-------------|-------------|-------------|-----------------|------------|-------------|-----------------|-----------|-------------|-----------------|------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|------------|-------------|-----------------|----------------------|-------------|-----------------|
| | IC50, мкМ | Козф. Хилла | % ингибирования | IC50, мкМ | Козф. Хилла | % ингибирования | IC50, мкМ | Козф. Хилла | % ингибирования | IC50, мкМ | Козф. Хилла | % ингибирования | IC50, мкМ | Козф. Хилла | % ингибирования | IC50, мкМ | Козф. Хилла | % ингибирования | IC50, мкМ | Козф. Хилла | % ингибирования |
| 112.NB.1213 | >100 | 0 | -1,4 | >100 | 0 | 2,1 | >100 | 0 | -1,6 | >100 | 0 | 0,7 | >100 | 0 | 2,7 | >100 | 0 | -2,1 | >100 | 0 | 1,3 |
| 117.VY.1213 | >100 | 0 | -0,3 | >100 | 0 | -5,5 | >100 | 0 | -8,4 | >100 | 0 | -2,0 | >100 | 0 | -8,5 | >100 | 0 | -4,5 | >100 | 0 | -0,8 |
| 177.VY.1213 | >100 | 1,2 | 48,6 | >100 | 0 | 1,4 | >100 | 1,3 | 34,7 | >100 | 0 | 21,8 | 23,8 | 1,8 | 92,7 | >100 | 0,6 | 42,7 | >100 | 0,9 | 45,5 |
| 178.NB.1213 | >100 | 0 | -0,3 | >100 | 0 | -0,2 | >100 | 0 | -4,1 | >100 | 0 | -0,5 | >100 | 0 | 5,4 | >100 | 0 | -2,7 | >100 | 0 | 1,7 |
| 191.NB.1213 | >100 | 0 | -0,9 | >100 | 0 | -2,0 | >100 | 0 | -5,3 | >100 | 0 | -2,8 | >100 | 0 | -3,3 | >100 | 0 | -1,6 | >100 | 0 | -1,5 |
| 193.NB.1213 | >100 | 0 | 0,0 | >100 | 0 | -0,4 | >100 | 0 | 0,6 | >100 | 0 | -2,8 | >100 | 0 | 5,3 | >100 | 0 | -2,1 | >100 | 0 | 0,1 |
| 233.VY.1213 | >100 | 0 | -2,2 | >100 | 0 | 0,9 | >100 | 0 | -1,1 | >100 | 0 | 2,5 | >100 | 0 | 5,0 | >100 | 0 | -1,8 | >100 | 0 | 1,4 |
| 247.NB.1213 | >100 | 0 | -1,1 | >100 | 0 | -11,1 | >100 | 0 | -10,8 | >100 | 0 | -6,6 | >100 | 0 | -20,5 | >100 | 0 | -5,0 | >100 | 0 | -4,7 |
| 277.VY.1213 | >100 | | 25,4 | >100 | 0 | -4,2 | >100 | 0 | -6,2 | >100 | 0 | 85,1 | 85,1 | 2,4 | 56,1 | >100 | 0 | -1,2 | >100 | | 20,8 |
| 931.NB.1213 | >100 | 0 | -44,6 | >100 | 0 | -2,2 | >100 | 0 | -3,5 | >100 | 0 | -2,1 | >100 | 0 | -1,4 | >100 | 0 | -0,6 | >100 | 0 | 0,2 |

Список литературы

1. **Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефи-
ров Н.С.** Молекулярное моделиро-
вание рецепторов физиологически
активных веществ для целей ме-
дицинской химии // Успехи химии.
2009. Т. 78. № 6. С. 539-557.
2. **Хельтше Х.Д., Зиппль В., Ро-
ньян Д., Фолькерс Г.** Молеку-
лярное моделирование (теория и
практика) / Под редакцией В.А.
Палюлина и Е.В. Радченко.- М.:
БИНОМ. Лаборатория знаний.
2010. 318 с.
3. **Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy,
P.J.** Feeney Experimental and compu-
tational approaches to estimate solubil-
ity and permeability in drug discovery
and development settings /C.A. Lipin-
ski et al.// Advanced Drug Delivery
Reviews.-2001. Vol.46. №1-3. P. 3-26.
4. **Авенирова Е.Л., Алексеева П.А.,
Баранова Н.И., Басс М.С., Буряки-
на А.В., Питухина Н.Н., Федорова
Е.В.** Молекулярные аспекты со-
здания лекарственных препаратов:
использование методов компьютер-
ного моделирования с целью созда-
ния нового противоишемического
средства // Биомедицина. 2014. №1.
С.4-10.
5. **Lagunin A., Zakharov A., Filimonov
D., Poroikov V.** QSAR Modelling of
rat acute toxicity on the basis of PASS
prediction // Mol. Informatics. 2011.
Vol.30, №2-3. P. 241-250.

Development of synthetic anticoagulants - inhibitors of serine proteases: combining *in silico* and *in vitro* approaches

N.I. Baranova, P.A. Alekseeva, K.S. Chistyakov, V.N. Yuskovets,
S.V. Okovityi, A.V. Buryakina, E.V. Fedorova

The aim of this study was to presents a model-based approach based on the integration of computa-
tional theory (*in silico*-experiments) and experiments performed (*in vitro*) to search, optimization and develop-
ment of new anticoagulants molecules with affinity to the family of serine proteases.

The authors gratefully acknowledges to Novartis AG for assistance in the *in vitro* experiments in the
framework of the program “Novartis in-kind collaborations”, as well as the personal gratitude for their
researchers and biologists Ulrich Hassiepen and Gabriela Monnet.

Key words: quantitative structure-activity relationship, molecular docking, serine protease inhibitors, *in
silico* and *in vitro* experiments.

Синдромный анализ функциональных состояний в контексте трехмерной векторной модели

Н.Н. Каркищенко¹, Ю.А. Чудина^{1,2}, Д.Б. Чайванов^{1,2}

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

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

В настоящей работе рассмотрена классификация функциональных состояний, предложенная в рамках трехмерной векторной модели функциональных состояний человека. Проведен сопоставительный анализ этой классификации с литературными данными, и на его основе выявлено, что практически каждому функциональному состоянию соответствует типичное сочетание диагностических маркеров.

Ключевые слова: трехмерная векторная модель, синдромный анализ, непрерывная диагностика смены функциональных состояний, инструментальные способы диагностики функционального состояния, уровень возбуждения, фокус первой сигнальной системы, фокус второй сигнальной системы.

Известно, что любая деятельность не может существовать независимо от состояния организма и нервной системы. В этом смысле функциональное состояние (ФС) является необходимым условием реализации поведения, что определяет значимость изучения его внутренних механизмов и закономерностей. Конкретное ФС зависит от ряда факторов, среди которых выделяют мотивацию, содержание выполняемого задания, общий уровень сенсорной нагрузки, исходный уровень активности нервной системы и индивидуальные особенности [4]. Эти факторы весьма разнообразны и имеют особую историю исследования, но все они носят частный характер, т.е. по одному из них невозможно дать достаточное описание ФС и, следовательно, осуществлять его системную диагностику.

Поиск способов системной диагностики ФС нервной системы человека и животных остается одной из актуальных задач. Не снижается потребность в разработке прикладных систем диагностики ФС, позволяющих не только быстрое определение текущего состояния, но и динамическое управление им в зависимости от поставленной задачи. Именно с этим связано создание трехмерной векторной модели ФС [21, 22], объемная схема которой представлена на рис. 1.

Эта модель позволяет не просто специфицировать ФС, но представить их в рамках единой параметрической системы переменных. ФС в этой модели представлено в виде трехмерного вектора, который характеризуется определенным направлением в зависимости от

значений по трем осям. Оси представляют базовые характеристики ФС. Выбор базовых характеристик связан с попыткой обеспечить системный характер диагностики рассматриваемого феномена. Большинство исследователей отмечает двухмерную природу ФС. Например, Р. Тейер считал, что ФС определяется двумя независимыми переменными, которые вычисляются по шкале «бодрость–усталость» и «напряжение–безмятежность» [4].

И.П. Павловым были выделены два физиологических механизма, участвующих в обеспечении условно-рефлекторной деятельности [17]. Один механизм, названный *настроечным*, связан с регуляцией состояния мозга и созданием определенного уровня возбуждения и работоспособности нервных структур.

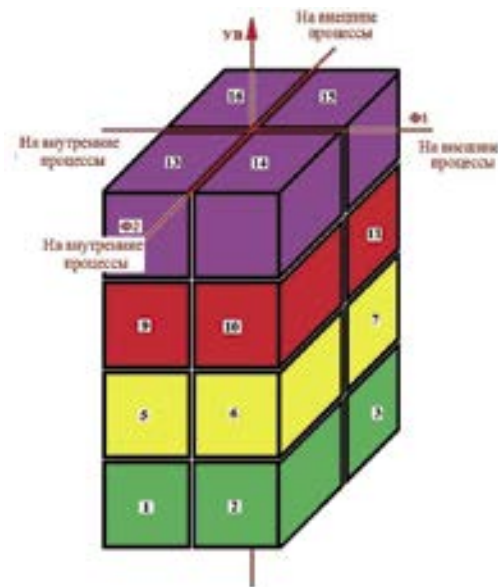


Рис. 1. Объемная схема трехмерной модели функциональных состояний. УВ – уровень возбуждения, Ф1 – фокус первой сигнальной системы, Ф2 – фокус второй сигнальной системы. Цифрами обозначены первоначальные состояния.

Другой механизм – *пусковой* – определяется внешними и/или внутренними факторами и запускает определенную условно-рефлекторную деятельность. Согласно этой точке зрения, ФС определяется, с одной стороны, общей настройкой нервной системы, а с другой стороны, специализированной активацией ее частей, которая обеспечивает адаптивные формы поведения. В. Зингер, предложивший трехфакторную теорию обучения, считал необходимым учитывать при обеспечении поведения в ходе его формирования такие факторы, как: 1) особенности внешнего воздействия, 2) характеристики внутреннего мотивационного возбуждения и 3) степень неспецифической модуляции нервной системы [24, 25].

Системный характер ФС [4], с одной стороны, и инструментальные свойства трехмерной модели, с другой стороны, требуют учета всех необходимых и достаточных переменных, вносящих вклад в реализацию данного феномена. Согласно нашим представлениям, такими переменными являются три фактора, представленные в виде осей векторной модели, определяющих конкретное состояние человека. Первая ось представляет уровень возбуждения (УВ) и соответствует общей активации нервной системы (третий фактор по В. Зингеру). Изменение уровня возбуждения носит градуальный характер, и активация меняется пропорционально уровню возбуждения нервной системы. Это позволяет рассматривать УВ как переменную, значения которой меняются непрерывно, и степень этих изменений можно условно обозначить цифрами, отражающими УВ: 1 – минимальный уровень, 4 – максимальный уровень возбуждения.

Вторая и третья оси отражают вклад, соответственно, первой и второй сигнальной системы. Они учитывают особенности и внешнего воздействия (первый фактор по В. Зингеру), и мотивации (второй фактор по В. Зингеру). Известно, что и внешние сигналы, и системы мотивации связаны с тремя базовыми потребностями: биологическими, социальными и идеальными [20]. В предложенной модели базовые потребности мы будем рассматривать с точки зрения их реализации через первую и вторую сигнальные системы. Вторая ось (Ф1) отражает вклад первой сигнальной системы в поведение, что связано с внешними сенсорными воздействиями и мотивационной системой, носящими невербальный характер. Третья ось (Ф2) представляет вторую сигнальную систему, связанную с вербальным представлением внешних и внутренних сигналов. Для учета направленности сигнальных систем на внешние (изменения внешней стимуляции) и внутренние (мотивационные, когнитивные) процессы было введено понятие «фокус сигнальной системы». Этот фокус может быть ориентирован на внешние (В) и внутренние (Н) процессы. Соответственно, направление фокуса первой сигнальной системы наружу соответствует осознанию внешнего сенсорного сигнала, направленность его внутрь – субъективному представлению невербальных сигналов. Направление фокуса второй сигнальной системы наружу соответствует внешней речи, а его ориентация на внутренние процессы – внутренней речи и когнитивной обработке с помощью вербальных средств. Динамика значений по всем трем осям носит непрерывный характер, однако для возможности со-

поставления предложенной трехмерной векторной модели с имеющимися классификациями ФС было выделено 16 возможных состояний (рис. 1).

Анализ всех 16 состояний показал, что некоторые из них либо вообще не могут существовать, либо являются патологическими. Например, состояние 2 не может существовать, так как оно определяется, с одной стороны, самым низким уровнем возбуждения, который соответствует достаточно глубокому сну, а, с другой стороны, ориентацией первой сигнальной системы на внешние процессы. Состояние 13 скорее характерно для людей с психическими расстройствами (навязчивые состояния), так как оно предполагает ориентацию обеих сигнальных систем внутрь на фоне перевозбуждения нервной системы.

Руководствуясь этими особенностями, из всех 16 состояний были выбраны только 9, являющихся характерными для обычного психически и физически здорового человека, которые мы обозначили как «нормальные». На рис. 2 изображен преобразованный вариант трехмерной модели ФС, где представлены только «нормальные» ФС, обозначенные соответствующим порядковым номером, совпадающим с первоначальным вариантом модели. Сокращенное обозначение ФС дополнено кодом в круглых скобках. Код состоит из одной цифры и двух букв, где цифрой от 1 до 4 обозначен уровень возбуждения, а буквой «В» или «Н» могут быть обозначены фокусы первой (первая буква) и второй (вторая буква) сигнальной системы, в зависимости от обращения фокуса, соответственно, на внутренние или на внешние процессы. Ниже представлено

описание «нормальных» ФС в терминах физиологических маркеров схожих состояний, полученных разными авторами в экспериментальных работах.

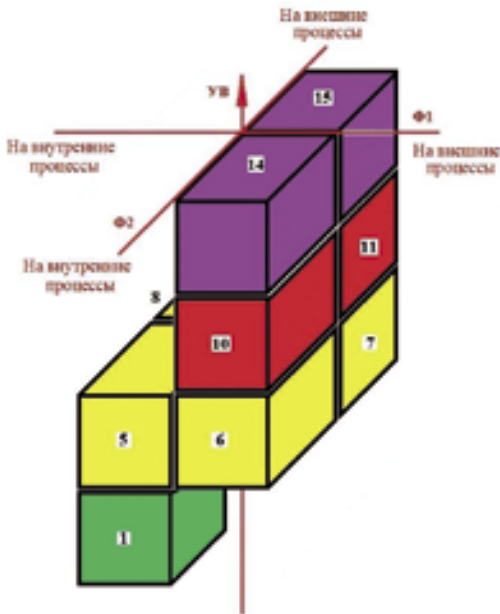


Рис. 2. Редуцированная объемная схема трехмерной модели функциональных состояний. УВ – уровень возбуждения, Ф1 – фокус первой сигнальной системы, Ф2 – фокус второй сигнальной системы. Цифрами обозначены реально существующие непатологические состояния.

ФС 1 (1ВВ) характеризуется самым низким уровнем возбуждения нервной системы, при этом обе сигнальные системы направлены на внутренние процессы. Это состояние более всего соответствует медленному сну, при котором мозговая активность характеризуется появлением сонных веретен и К-комплексов, увеличением доли медленных волн и постепенным торможением психической активности [11]. Во время сна индивидуальные различия фоновой электроэнцефалограммы (ЭЭГ) сглажи-

ваются и появляются типичные частотные спектры. Изучение ЭЭГ-реакции на мелькающие вспышки света (МВС) показало, что с развитием сонного торможения происходит ослабление высокочастотных составляющих реакции перестройки, ухудшается усвоение ритма вспышек на частоте бета-ритма [5]. Медленный сон подразделяют на 4 стадии: первая и вторая стадии представляют поверхностный сон, а третья и четвертая – глубокий. Для первой стадии медленного сна характерно снижение альфа-ритма на 50%, для второй стадии – появление сонных веретен и К-комплексов, третья стадия характеризуется увеличением доли дельта-волн до 50%, четвертая стадия отличается от третьей еще большим увеличением процента дельта-активности. Во время медленного сна происходит усиление парасимпатических влияний на работу сердечно-сосудистой системы, максимальный эффект которых наблюдается на 1, 3 и 4 стадиях медленного сна [1, 2]. На стадии 2 медленного сна наблюдается преобладание симпатической регуляции.

ФС 5-8 характеризуются средним уровнем возбуждения. ФС 5 (2ВВ) отличается от ФС 1 уровнем возбуждения и может быть описано как состояние быстрого сна. Прежде всего, быстрый сон характеризуется быстрыми движениями глаз на фоне снижения общего тонуса мускулатуры. При этом показатели вегетативной активности становятся более нестабильными по сравнению с медленным сном [23]. Во время быстрого сна наблюдается повышение частоты сердечного ритма (СР), артериального давления (АД), общего сопротивления периферических сосудов и минутного объема крови (МОК) на фоне снижения

ее ударного объема (УОК). Сердечный ритм достоверно учащается в быстром сне по сравнению с медленным сном, но не достигает показателей состояния бодрствования [2]. Активность мозга во время быстрого сна очень похожа на активность во время бодрствования с той разницей, что в последнем случае мы воспринимаем мир реальным, а не иллюзорным [11]. На ЭЭГ доминируют дельта-волны на фоне исчезновения сонных веретен и К-комплексов, кроме того, может регистрироваться низкоамплитудная активность различного частотного диапазона, накладывающаяся на дельта-волны.

ФС 8 (2ВН) отличается от 5 ориентацией второй сигнальной системы на внешние процессы, такое возможно только в состоянии транса, создаваемом, например, с помощью гипнотического воздействия. Исследования ЭЭГ-активности во время гипнотического воздействия по сравнению с естественным сном у одних тех же испытуемых показали сходство переходных процессов [15, 16]. В условиях гипнотического воздействия первоначально наблюдается уменьшение и уравнивание амплитуды альфа и бета-активности без изменения их регулярности, которое сменяется прерыванием альфа-активности и появлением альфа-веретен. Далее следует подавление альфа-ритма, которое может сопровождаться такими типичными вариантами, как: 1) углубление кривой биотоков, 2) появление тета-волн, 3) возникновение дельта-активности [16]. На фоне дельта и тета-волн возникает фаза смешанных ритмов, которая характеризуется появлением альфа и даже бета-активности. Такое появление альфа-ритма во время гипнотического воздействия

(особенно у высокогипнабельных испытуемых) считается признаком устойчивой каталепсии [19], признаваемой состоянием, на фоне которого может осуществляться суггестивное воздействие [18]. Вегетативными показателями состояния транса являются уменьшение активности симпатической регуляции и усиление парасимпатического влияния, при этом динамика гемодинамических показателей зависит от внушенного состояния [3, 7, 8]. Наиболее чувствительными к внушению оказались периодограмма RR-интервалов и дыхание. Экспериментально было выявлено, что внушение приятных сновидений сопровождалось замедлением дыхательного ритма, повышением тонуса периферических сосудов и учащением сердечного ритма. Внушение напряженной физической и психической нагрузки приводило к достоверному учащению дыхания, увеличению тонуса периферических сосудов и уменьшению дисперсии сердечного ритма [7]. В целом, состояние транса во время гипнотического воздействия сочетает признаки, характерные для состояний Ф1 и Ф5, сопровождаемые каталепсией.

ФС 6 (2НВ) и 7 (2НН) создаются на фоне среднего уровня возбуждения, первая сигнальная система направлена на восприятие окружающей стимуляции. Эти состояния можно специфицировать как спокойное бодрствование, для которого характерно расслабление и релаксация. ФС 6 и 7 отличаются направленностью второй сигнальной системы, которая определяет разную роль произвольной, сознательной регуляции в поведении и участие высших психических функций. ФС 7 характеризуется пассивным восприятием внешних сти-

мулов и при монотонности внешнего воздействия возможностью перехода в дремотное состояние с последующим засыпанием. В целом, спокойное бодрствование, состояние покоя и релаксации характеризуется синхронизацией ЭЭГ и преобладанием альфа-ритма, особенно при закрытых глазах. Для состояния покоя характерна гистограмма длительности кардиоинтервалов в виде нормального распределения [4]. Нарушение нормальности гистограммы связано с переходом из состояния покоя к физической или психической нагрузке или обратно к состоянию покоя.

ФС 10 (ЗНВ) и 11 (ЗНН) реализуются на фоне высокого уровня возбуждения и могут быть сопоставлены с состоянием нормального активного бодрствования, определяемого как оптимальное ФС, для которого характерна наиболее эффективная работоспособность. ФС 10 и 11 отличаются направленностью второй сигнальной системы, которая в данном случае определяет тип осуществляемой деятельности. ФС 10 является оптимальным состоянием для мыслительной деятельности и решения абстрактных задач, а ФС 11 связано с решением поведенческих и двигательных задач. Общей характеристикой ФС 10 и 11 является блокада альфа-ритма, проявляющаяся в десинхронизации ЭЭГ и появлении бета-ритма, с последующим преобладанием высокочастотных бета- и гамма-ритмов. Предъявление МВС во время бодрствования привело к усилению высокочастотных составляющих реакции перестройки при ухудшении усвоения на низкой частоте и подавления субгармоник. Признаком оптимального ФС и продуктивной напряженности, характерным для низкорепактивных испыту-

емых, является наличие компонента N150 вызванного потенциала (ВП) затылка при выполнении зрительной задачи [5].

Различия ФС 10 и 11 можно зафиксировать при выполнении задач, требующих разной направленности внимания. Исследования Дж. Лейси показали, что выполнение задания, требующего сосредоточения на сенсорных характеристиках стимула, сопровождается снижением частоты сердечных сокращений (ЧСС), падением АД, ростом сопротивления сосудов на фоне депрессии альфа-ритма. В ситуации решения арифметической задачи в уме, требующей фокусировки на внутренних процессах, наблюдается рост ЧСС и АД при снижении сопротивления сосудов, сопровождающиеся выраженным альфа-ритмом [14].

Современные исследования ФС в ситуации произвольного внимания и пассивного внимания показали наличие разных комплексов показателей [6]. Произвольное внимание в ситуации целенаправленного поведения характеризуется возникновением центральной тонической модуляции, сочетающейся с ориентировочной реакцией. Они проявляются, соответственно, в виде положительной корреляции высокочастотного дыхательного модулятора с мощностью гамма-ритма и низкочастотного дыхательного модулятора с депрессией ритмов ЭЭГ. Пассивное внимание характеризуется направленностью на внутренние процессы, при которой осуществляется извлечение информации из памяти. Это состояние проявляется в виде положительной корреляции метаболического модулятора СР с мощностью низкочастотных ритмов ЭЭГ и, в особенности, с тета-ритмом.

Причиной разнонаправленных изменений ЭЭГ и вегетативных показателей может быть не фокус внимания, а индивидуальные особенности и субъективное отношение к задаче [4]. Принятие или непринятие задачи определяет реагирование на нее по типу оборонительной или ориентировочной реакции. Очевидно, что ориентировочный тип реагирования предполагает развитие продуктивного напряжения, а оборонительная реакция связана с непродуктивным напряжением, являющимся потенциальной причиной стресса. Например, было показано, что падение вариабельности СР при отсутствии каких-либо изменений ЧСС связано с увеличением интенсивности нагрузки, увеличением темпа работы и уровня шума [4]. В данном случае выявлено, что чем интенсивнее физическая и психическая нагрузка, тем меньше разброс RR-интервалов. Однако обнаружено, что интенсификация мышечного напряжения характеризуется падением вариабельности СР и ростом ЧСС, а интеллектуальная нагрузка в ситуации выбора – повышением вариабельности СР и снижением ЧСС. Рост эмоциональной напряженности и увеличение физической нагрузки диагностируется по индексу напряжения, который наиболее чувствителен к значительным изменениям нервно-психического напряжения [4].

ФС 14 (4НВ) и 15 (4НН) характеризуются перевозбуждением (повышенный уровень возбуждения), которое сопровождается состоянием дистресса, увеличивающего общую напряженность функционирования физиологических систем и протекания психических процессов. Такое состояние может сохраняться весь период воздействия как внешних,

так и внутренних стрессорных факторов, а также и после прекращения их воздействия. Различия между ФС 14 и ФС 15 состоят в направленности второй сигнальной системы, которая определяет специфику регуляторных процессов. ФС 14 типично в случае аффекта, возникающего в ответ, например, на субъективно предполагаемую угрозу, которой объективно не существует. ФС 14 отличается перевозбуждением, переходящим в дистресс на фоне эмоционального или умственного напряжения. Для ФС 15 также характерно переутомление, однако появляющееся в ответ на чрезмерное объективно существующее воздействие. Компенсация такого рода переутомления может быть связана или с прекращением воздействия или с резким торможением активности, благодаря механизму запредельного (охранительного) торможения.

Выполнение задачи, вызывающей непродуктивное напряжение, приводит к появлению в вертексе компонента N150 ВП большой амплитуды, этот вертекс-потенциал считается признаком развития неоптимальных ФС [5]. Возникновение непродуктивного напряжения, характерного для высокорезактивных испытуемых, является причиной перенапряжения и дистресса. Сильный психоэмоциональный стресс и большие физические нагрузки можно диагностировать на основе «экспрессивной» гистограммы кардиоинтервалов, которая в этих условиях характеризуется очень узким основанием и заостренной вершиной [4]. Экспериментально продемонстрирована возможность использования ультразвуковой вокализации в качестве показателя наличия физического напряжения у человека [9, 10].

В целом, при стрессе динамика ЭЭГ-показателей и вегетативных показателей зависит от нескольких факторов. Прежде всего, необходимо учитывать тип реагирования субъекта, так как разные стратегии обеспечивают разную степень эффективности адаптации. Важными факторами являются сила и длительность стрессового воздействия, сочетание которых определяет уровень стресса и тяжесть возможных последствий для организма. При стрессе наблюдается преобладание симпатической регуляции, приводящее к усилению функций различных систем организма, в том числе сердечно-сосудистой системы [13]. ЭЭГ-показателем стресса считается динамика пространственных связей областей коры для спектральной мощности медленных ритмов, особенно тета-ритма. Как показано на примере предоперационного стресса, наблюдается перестройка структурных взаимодействий в коре больших полушарий для тета-ритма [12]. В обоих полушариях происходит распад исходных функциональных взаимодействий. В левом полушарии сохраняются связи

между лобными проекциями и нарушаются взаимодействия лобных отделов с сенсорными областями и внутри сенсорных зон (центральные, теменные, височные). Для правого полушария характерно ослабление корреляций спектральной мощности тета-ритма лобных отведений на фоне сохранности связей между сенсорными проекциями [12]. Также было показано, что после операции специфическая картина перестройки не изменяется, а сохраняется, что указывает на наличие постоперационного стресса.

Проведенный анализ позволил представить каждое из рассмотренных ФС в виде набора признаков или симптомов, являющихся необходимыми и достаточными для системного описания определенного ФС в виде синдрома. В данном случае в качестве симптомов использовали показатели активности мозга и динамики вегетативных процессов, измеряемые с помощью электрических и неэлектрических методов. Обобщенное описание ФС в виде синдрома применительно к трехмерной векторной модели представлено в таблице.

Таблица

Описание ФС в виде диагностических синдромов в рамках трехмерной векторной модели

| № п/п | ФС (техническая модель) | ФС (общепринятые представления) | Синдром |
|-------|-------------------------|---------------------------------|---|
| 1. | ФС 1 (1ВВ) | Медленный сон | Сонные веретена и К-комплексы, замедление ритма сердца, дыхания, расширение периферических сосудов |
| 2. | ФС 5 (2ВВ) | Быстрый сон | На фоне дельта активности появления альфа и бета-ритма, быстрые движения глаз на фоне снижения тонуса поперечно-полосатой мускулатуры, повышение ЧСС, АД, МОК и общего сопротивления сосудов при снижении УОК |

| № п/п | ФС (тех-мерная модель) | ФС (общепринятые представления) | Синдром |
|-------|------------------------|--|---|
| 3. | ФС 6 (2НВ) | Спокойное бодрствование, релаксация, расслабление, <i>задумчивость</i> | Преобладание альфа-ритма на фоне синхронизации ритмов ЭЭГ, гистограмма кардиоинтервалов в виде нормального распределения, сдвиг которой указывает на изменение состояния |
| 4. | ФС 7 (2НН) | Спокойное бодрствование, релаксация, расслабление, <i>МОНОТОНИЯ</i> | |
| 5. | ФС 8 (2ВН) | Транс, состояние, возникающее в результате гипнотического воздействия | Тета- и дельта-активность (как при медленном сне) сопровождается появлением альфа и бета-ритма (как при быстром сне), каталепсия, усиление парасимпатической активации, динамика вегетативных показателей зависит от внушенного состояния |
| 6. | ФС 10 (3НВ) | Активное бодрствование, оптимальное ФС для выполнения мыслительной деятельности, решение абстрактных задач | 1) увеличение ЧСС и АД, снижение сопротивления сосудов на фоне выраженного альфа-ритма; 2) метаболическая модуляция СР при низкочастотной ЭЭГ с преобладанием тета-ритма; 3) падение variability СР при снижении ЧСС |
| 7. | ФС 11 (3НН) | Активное бодрствование, оптимальное ФС для выполнения двигательной деятельности, решение конкретных задач | 1) снижение ЧСС и АД, увеличение сопротивления сосудов на фоне депрессии альфа-ритма; 2) высокочастотный дыхательный модулятор СР на фоне гамма-ритма и низкочастотный дыхательный модулятор СР на фоне депрессии ритмов ЭЭГ; 3) снижение variability СР на фоне роста ЧСС |
| 8. | ФС 14 (4НВ) | Перевозбуждение, состояние стресса или дистресса, эмоциональное и умственное напряжение | Перестройки связей между структурами мозга четко различимые для спектральной мощности тета-ритма. В левом полушарии связи внутри лобных отделов сохраняются, нарушаются связи лобных отделений с сенсорными проекциями и внутри сенсорных проекций. Для правого полушария характерно ослабление связей внутри лобных отделов и лобных отделов с сенсорными проекциями при сохранности связей между сенсорными проекциями. «Экспрессивная» гистограмма кардиоинтервалов. Появление сигналов в диапазоне ультразвука (мышечное утомление) |
| 9. | ФС 15 (4НН) | Перевозбуждение, состояние стресса или дистресса, физическое переутомление и напряжение | |

Синдромный анализ необходим для формирования инструментария диагностики ФС на основе имеющихся данных и для определения необходимости проведения дополнительных исследований. В результате синдромного анализа было показано, что большинство ФС, специфицируемые в рамках трехмерной векторной модели, могут быть описаны в виде комплекса определенных инструментальных диагностических процедур.

Оказалось затруднительным определить существенные различия между парами ФС 6 и 7, 10 и 11, 14 и 15 с помощью синдромного анализа. Сравнение парных ФС 6 и 7, 10 и 11, 14 и 15 показало, что состояния внутри каждой пары могут быть специфицированы типом задания. Другими словами, эти парные состояния можно различать при диагностике данного уровня активации с учетом выполняемого задания, так как сами состояния незначительно отличаются внешними проявлениями. Например, ФС 14 и 15 представляют собой состояния дистресса, однако причины этого состояния и последствия значительно отличаются. Перевозбуждение вследствие эмоциональной или умственной перегрузки характеризуется продолжающимся ростом напряжения и довольно длительным сохранением этого состояния [13]. В то время как ФС 15 соответствует переутомление физическое, которое приводит к автоматическому снижению или выключению всех функций вследствие охранительного торможения. Возможно, динамика проявления состояния перенапряжения будет по-разному проявляться у людей, занимающихся определенными видами деятельности, и будет зависеть от индивидуальных различий [13]. В случае профессиональной деятельности,

связанной с умственной нагрузкой, будет наблюдаться большая устойчивость к ней, сопровождающаяся более длительным периодом развития переутомления.

Диагностические различия были найдены для ФС 10 и 11, связанные с направлением фокуса внимания на внешние и внутренние процессы [6]. В отношении других парных ФС экспериментальных данных такого рода не было обнаружено в доступной литературе. Следовательно, для уточнения целесобразности различения парных ФС 6 и 7, 10 и 11, 14 и 15 необходимо провести дополнительные исследования, которые позволят найти адекватные приемы для их дифференцировочной диагностики.

Проведенный анализ позволил сделать следующие **выводы**:

1. На основе теоретических и экспериментальных исследований сформулировали теоретические предпосылки и представили обоснование классификации функциональных состояний, предложенной в рамках трехмерной векторной модели функциональных состояний человека.

2. Осуществление синдромного анализа функциональных состояний, определенных в рамках трехмерной векторной модели, позволило выделить необходимые и достаточные симптомы, типизирующие определенное функциональное состояние.

3. На основе синдромного анализа определили инструментальные способы диагностики функциональных состояний, позволяющие их спецификацию в процессе текущей деятельности, и обосновали необходимость проведения дополнительного поиска способов диагностики состояний, отличающихся направленностью фокусов сигнальных систем.

Список литературы

1. **Бирюкова Е.В.** Регуляция сердечного ритма во время ночного сна у людей юношеского возраста // Автореф. на соиск. уч. степ. к.б.н. - Тамбов. 2004. 19 с.
2. **Варонецкас Г.** Вариабельность сердечного ритма во время сна // Вісн. Харк. нац. ун-та. 2002. № 545. С. 10-34.
3. **Гримак Л.П.** Моделирование состояний человека в гипнозе. - М.: Либроком. 2009. 272 с.
4. **Данилова Н.Н.** Психофизиологическая диагностика функциональных состояний. - М.: Изд-во МГУ. 1992. 192 с.
5. **Данилова Н.Н.** Функциональные состояния: механизмы и диагностика. - М.: Изд-во МГУ. 1985. 287 с.
6. **Данилова Н.Н., Астафьев С.В.** Внимание человека как специфическая связь ритмов ЭЭГ с волновыми модуляторами сердечного ритма // Журн. высш. нерв. деят. 2000. Т. 50. № 5. С. 791-804.
7. **Жемайтите Д.И.** Вегетативная регуляция синусового ритма сердца у здоровых и больных // Анализ сердечного ритма. Под ред. Д. Жемайтите, Л. Тельксниса. - Вильнюс. 1982. С. 22-32.
8. **Жемайтите Д.И.** Клинико-физиологические значения анализа вариабельности сердечного ритма у больных хронической формой ишемической болезни сердца // Вісн. Харк. нац. ун-та. 2002. № 545. С. 59-80.
9. **Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Чудина Ю.А., Стригина М.И., Орлова Н.З.** Физические методы оценки психофункционального состояния человека при электрической и магнитной стимуляции и в условиях сильных электромагнитных полей // Биомедицина. 2012. № 4. С. 106-112.
10. **Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капаназде Г.Д., Чайванов Д.Б.** Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. 2011. № 1. С. 4-23.
11. **Ковальзон В.М.** Основы сомнологии: физиология и нейрохимия цикла «бодрствование-сон». Изд-во «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2012. 239 с.
12. **Комиссаров В.И., Масалева И.О.** Особенности межполушарной асимметрии взаимоотношений ЭЭГ проекционных зон коры головного мозга в условиях предоперационного стресса // Асимметрия. 2012. Т. 6. № 3. С. 16-22.
13. **Китаев-Смык Л.А.** Психология стресса. Психологическая антропология стресса. - М.: Академический проект. 2009. 943 с.
14. **Лейси Дж.А., Лейси Б.К.** Специфическая роль частоты сердцебиений в сенсомоторной интеграции // Нейрофизиологические механизмы поведения. Под ред. Б.Ф. Ломова, Р.Ф.Томпсона, В.Б. Вуркова. - М.: Наука. 1982. С. 434-448.
15. **Невский М.П.** Сравнительный анализ фазовых изменений электрической активности мозга в гипнозе и естественном сне // Вопросы клинической невропатологии и психиатрии. - Челябинск. 1958. С. 243-250.
16. **Невский М.П.** Электроэнцефалографическое изучение гипнотического

- сна у человека: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. - М.: 1962. 30 с.
17. **Павлов И.П.** Лекции о работе больших полушарий головного мозга. - М.: URSS. 2010. 296 с.
 18. **Сакеллион Д.Н., Мухамеджанов Н.З., Султанходжаева Н.Д., Каримбердиев Д.Р., Кадиоров Б.Р.** Обьективизирующие депривацию электроэнцефалографические корреляты моделируемой гипнозом катаlepsии // Журнал неврологии и психиатрии. 2006. Т. 106. № 3. С. 39-47.
 19. **Сакеллион Д.Н., Кадиоров Б.Р.** Психофизиологические критерии гипнотической катаlepsии // Психотерапия. 2010. № 2. С. 37-42.
 20. **Симонов П.В.** Мотивированный мозг. - М.: Наука. 1987. 272 с.
 21. **Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.** Трехмерная векторная модель функционального состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной стимуляции // Биомедицина. 2013. № 3. С. 18-25.
 22. **Чайванов Д.Б., Станкова Н.В.** Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели // Биомедицина. 2013. № 4. С. 164-168.
 23. **Чудина Ю.А., Чайванов Д.Б.** Неэлектрические физиологические маркеры уровня бодрствования // Вестник психофизиологии. 2013. № 2. С. 51-59.
 24. **Singer W., Rauschecker J.P.** Central core control of developmental plasticity in the kitten visual cortex: II. Electrical activation of mesencephalic and diencephalic projections // Experimental Brain Research. 1982; 47(2): 223-233.
 25. **Singer W., Trepper F., Yinon U.** Central gating of developmental plasticity in kitten visual cortex // Journal Physiol. 1982 Mar; 324:221-37.

Syndromic analysis of functional states in terms of the three-dimensional vector model

N.N. Karkischenko, Yu.A. Chudina, D.B. Chayvanov

The classification of functional status suggested in terms of the three-dimensional vector model of human functional states was described in the article. We had compared this classification with others experimental data and as a result of their relative analysis it was revealed that typical combination of diagnostic markers correspond to every functional state.

Key words: the three-dimensional vector model of functional states, syndromic analysis, permanent diagnostics of functional state changes, instrumental methods of diagnostics of functional state, activation level of nervous system, direction of the first signal system (perception), direction of the second signal system (verbal).



Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах при консервации и воздействии озона

В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, И.С. Симутис*, Г.А. Бояринов*,
А.И. Сенюрина

ФГБОУ ВПО Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород

* – ФПКВ ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний
Новгород

Контактная информация: Сенюрина Антонина Игоревна, tonsen@mail.ru

Исследовано действие озона в интервале доз 0,5-11 мг/л в экспериментах *in vitro* на эритроцитарную массу разных сроков хранения. Установлено, что малые концентрации озона (1-3 мг/л) увеличивали содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах при сроках их хранения 7-21 сутки. Повышение концентрации (5-11 мг/л) озона было менее эффективным. При сроках хранения эритроцитарной массы 30 суток озон не вызывал увеличения концентрации АТФ и 2,3-ДФГ.

Ключевые слова: озон, эритроциты разных сроков хранения, АТФ, 2,3-ДФГ.

На сегодняшний день купирование анемий тяжелой степени у больных в критических состояниях, в основном, производится путем трансфузии эритроцитарной массы [2, 8]. Вместе с тем, согласно ряду исследований [14, 15], риск осложнений у критических больных возрастает с увеличением срока хранения трансфузируемых эритроцитов. Установлено, что при хранении эритроцитарной массы содержание функционально и морфологически полноценных эритроцитов снижается [4, 9]. Длительное хранение эритроцитов приводит к уменьшению деформируемости и фильтрабельности эритроцитов, уменьшению в них уровня аденозинтрифосфата (АТФ) и

2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) [18, 12]. Укажем, что 2,3-ДФГ служит важным аллостерическим регулятором связывания кислорода с гемоглобином [13], и увеличение продукции 2,3-ДФГ в эритроцитах облегчает высвобождение кислорода в тканях, что способствует поддержанию pO_2 в крови и тканях на достаточном уровне. Кроме того, необходимо учитывать, что изменение содержания органических фосфатов в клетке вызывает целый ряд структурных перестроек эритроцитарных мембран. Так, АТФ служит донором фосфата для протеинкиназных реакций, осуществляющих фосфорилирование мембранных белков. Повышение содержания АТФ в эритроците

ведет к фосфорилированию спектрина, анкирина и белка полосы 4.1, ослабляя белок-белковые взаимодействия [16]. Активация протеинкиназ и фосфорилирование белков цитоскелета увеличивает деформабильность мембран [19]. Показано, что при высокой деформируемости происходит максимальный перенос кислорода тканям [7]. Кроме того, рост 2,3-ДФГ сопровождается диссоциацией спектрина, увеличением интегральной подвижности белков мембраны эритроцитов, увеличением площади и уменьшением объема клеток [1]. В свою очередь, увеличение деформации с увеличением площади поверхности и уменьшение их объема также будут способствовать улучшению кислородтранспортной функции клеток, реологии крови и микроциркуляции.

Известно, что озонотерапия приводит к восстановлению кислородного транспорта, нормализует обмен веществ, улучшает микроциркуляцию и текучесть крови. При парентеральном введении озона (аутогеомозонотерапия, внутривенное введение озонированного физиологического раствора) в эритроцитах активируется образование 2,3-ДФГ, который облегчает отдачу кислорода оксигемоглобином и, таким образом, улучшает кислородное обеспечение тканей [17]. Однако работ, посвященных исследованию действия озона на хранящиеся эритроциты, в литературе нами не обнаружено. Между тем, можно ожидать, что озонирование эритроцитарной массы при ее хранении может вызвать улучшение функциональных характеристик эритроцитов, что позволит повысить эффективность ее использования в медицинской практике.

Целью работы ставилось исследование действия различных концентраций растворенного в физиологическом растворе озона на содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах разных сроков хранения.

Материалы и методы

Объектом исследования служила стабилизированная гемоконсервантом ЦФДА (Натрия цитрат + Лимонная кислота + Натрия дигидрофосфат + Декстроза + Аденин) в соотношении 1:4 эритроцитарная масса крови человека. Донорскую кровь получали на станции переливания крови. Заготовку крови и получение из нее компонентов производили в соответствии с «Инструкцией по заготовке и консервированию крови», утвержденной МЗ РФ 29.05.1999 г. Эритроцитарная масса хранилась при $T=4^{\circ}\text{C}$ в течение 7, 14, 21 и 30 суток.

Эритроцитарную массу (2 мл) смешивали с озонированным раствором натрия хлорида 0,9% в эквивалентном объеме, содержащем различные концентрации озона (0,5-11 мг/л). Озонирование физиологического раствора производили на установке озонаторной терапевтической автоматической УОТА-60-01-«Медозон» (Россия). Установка изготовлена в соответствии с ТУ 9444-001-11441871-97 и может быть использована в медицинских учреждениях. Озонирование физиологического раствора производили непосредственно перед смешиванием его с эритроцитарной массой и через 60 мин в полученной эритроцитарной взвеси определяли концентрации АТФ и 2,3-ДФГ. При исследовании действия каждой концентрации озона

было проведено 12 проб. Содержание 2,3-ДФГ и АТФ в суспензии отмытых эритроцитов исследовали неэнзиматическим методом, определяя неорганический фосфор в гидролизатах эритроцитов [3]. Определение неорганического фосфора проводили фотоэлектрокалориметрически [10].

Полученные данные были обработаны с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики. Достоверность различий средних определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенного исследования было установлено, что озонирование эритроцитарной массы разных сроков

хранения вызывало изменение концентрации АТФ и 2,3-ДФГ как в зависимости от действующей концентрации озона, так и от сроков хранения эритроцитов (табл. 1, табл. 2).

Как следует из табл. 1, увеличение концентрации АТФ в эритроцитах было наиболее выраженным при действии концентрации озона 1-3 мг/л в сроки 7-21 сутки хранения эритроцитарной массы. Дальнейшее увеличение концентрации озона, также как и хранение эритроцитов 30 суток, было менее эффективным.

Аналогичные изменения были зарегистрированы при анализе содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах (табл. 2). Дозы озона в диапазоне концентраций 1-5 мг/л приводили к увеличению концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах при сроках хранения эритроцитарной массы 7-21 суток.

Таблица 1
Изменение концентрации АТФ в эритроцитарной массе разных сроков хранения при ее озонировании

| Концентрация озона (мг/л) | Содержание АТФ (мкмоль/мл) в зависимости от сроков хранения эритроцитарной массы | | | |
|---------------------------|--|------------|------------|-----------|
| | 7 суток | 14 суток | 21 сутки | 30 суток |
| 0 | 0,86±0,08 | 0,75±0,10 | 0,54±0,10 | 0,46±0,15 |
| 0,5 | 1,09±0,10* | 0,60±0,14 | 0,52±0,12 | 0,33±0,14 |
| 1 | 1,12±0,09* | 1,09±0,13* | 1,05±0,10* | 0,49±0,11 |
| 3 | 1,02±0,10* | 1,13±0,12* | 1,06±0,14* | 0,21±0,16 |
| 5 | 0,99±0,08 | 1,08±0,11* | 0,72±0,16 | 0,25±0,08 |
| 7 | 0,97±0,12 | 0,92±0,16* | 0,89±0,13* | 0,24±0,08 |
| 9 | 0,88±0,15 | 0,80±0,13 | 0,65±0,15 | 0,24±0,09 |
| 11 | 0,74±0,16 | 0,60±0,17 | 0,73±0,17 | 0,20±0,11 |

Примечание: 0,9-1,2 мкмоль/мл – норма содержания АТФ [6].

* – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) с контролем (концентрация озона в смеси 0 мг/л).

Изменение концентрации 2,3ДФГ в эритроцитарной массе разных сроков хранения при ее озонировании

| Концентрация озона (мг/л) | Содержание 2,3ДФГ (мкмоль/мл) в зависимости от сроков хранения эритроцитарной массы | | | |
|---------------------------|---|------------|------------|-----------|
| | 7 суток | 14 суток | 21 сутки | 30 суток |
| 0 | 2,07±0,16 | 2,17±0,14 | 1,73±0,15 | 1,69±0,18 |
| 0,5 | 3,41±0,17* | 2,85±0,15* | 1,87±0,12 | 1,83±0,16 |
| 1 | 3,54±0,11* | 2,97±0,13* | 2,06±0,16* | 1,90±0,20 |
| 3 | 3,73±0,15* | 2,86±0,12* | 1,99±0,13* | 1,53±0,22 |
| 5 | 3,40±0,14* | 2,88±0,13* | 1,89±0,16* | 1,58±0,17 |
| 7 | 2,39±0,17 | 2,59±0,15* | 1,83±0,16 | 1,65±0,16 |
| 9 | 2,16±0,16 | 2,18±0,16 | 1,51±0,26 | 1,70±0,19 |
| 11 | 1,72±0,18 | 2,32±0,12 | 1,71±0,14 | 1,63±0,19 |

Примечание: 3,6-5,0 мкмоль/мл – норма содержания 2,3ДФГ [6].

* – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) с контролем (концентрация озона в смеси 0 мг/л).

При низких концентрациях озона (в пределах содержания озона в физиологическом растворе 1-5 мг/л) регистрировался максимальный уровень 2,3-ДФГ в эритроцитарной массе 7-, 14- и 21-суточного срока хранения, тогда как высокие концентрации озона в смеси не вызывали статистически значимых изменений данного показателя по сравнению с исходными значениями. При увеличении срока хранения эритроцитарной массы (30 суток) озон не вызывал увеличения содержания в ней 2,3-ДФГ при всех режимах озонирования.

Из полученных результатов следует заключить, что применение озонирования хранящейся массы эритроцитов увеличивает срок их хранения, приводя к восстановлению уровня АТФ и 2,3-ДФГ при действии в определенных дозах и сроках хранения. Наблюдаемые эффекты действия озона на содержание в эритроцитах АТФ и 2,3-ДФГ, вероятно, можно объяснить модифицирующим

действием озона на метаболизм эритроцитов. При этом можно предположить, что дополнительно активируются ферменты гликолиза. Показано, что при озонотерапии происходит усиление гликолиза, снижается ацидоз клеток [11]. В свою очередь, реализация такой активизации может быть обусловлена снижением уровня молекулярных продуктов ПОЛ и усилением антиоксидантной системы защиты, установленных при действии озона на кровь *in vitro* [5].

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют, что при действии озона в малых концентрациях улучшается кислород-транспортная функция эритроцитов, как за счет увеличения концентрации 2,3-ДФГ, так и за счет роста содержания АТФ. Наиболее оптимальной концентрацией, на наш взгляд, является доза озона 1-3 мг/л, при которой регистрируется рост обеих форм органического фосфата.

Список литературы

1. **Брызгалов Н.Ю. и др.** Роль цитоплазматических структур эритроцитов в изменение сродства гемоглобина к кислороду / Браже Н.А., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Рубин А.Б. // Биофизика. 2009. Т. 54. № 3. С. 442-447.
2. **Буланов А.Ю., Городецкий В.М.** Протокол терапии острой кровопотери: основные положения // Вестник интенсивной терапии. 2004. № 5. 193 с.
3. **Виноградова И.Л., Багрянцева С.Ю., Дервиз Г.В.** Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах // Лаб. дело. 1980. № 7. С. 424-426.
4. **Гаврилин С.В., Герасимов Г.Л., Бояринцев В.В.** Некоторые спорные вопросы трансфузионной терапии у раненых и пострадавших // Анестезиология и реаниматология. 2005. № 4. С. 40-42.
5. **Гречканев Г.О., Конторщикова К.Н., Качалина Т.С.** Экспериментальное обоснование озонотерапии акушерских осложнений // Ниж. мед. ж. 2002. № 1. С. 68-71.
6. **Иржак Л.И.** Гемоглобины и их свойства. - М.: Наука. 1975. 240 с.
7. **Катюхин Л.Н.** Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования // Росс. физиол. ж. им. И.М.Сеченова. 1995. Т. 81. № 6. С.122-129.
8. **Кожура В.Л., Новодержкина И.С., Кирсанова А.К.** Острая массивная кровопотеря: механизмы компенсации и повреждения // Анестезиология и реанимация. 2002. № 6. С. 9-12.
9. **Колосков А.В.** Современные представления о показаниях для трансфузии эритроцитарных компонентов крови // Гематология и трансфузиология. 2004. № 6. С. 38-42.
10. **Кондрашова М.Н., Лесогорова М.Н., Шноль С.Э.** Метод определения неорганического фосфата по спектрам поглощения молибдатových комплексов в ультрафиолете // Биохимия. 1965. № 3. С.567-572.
11. **Фисталь Э.Я., Носенко В.М.** Патогенетическое обоснование парентерального применения озона при неотложных состояниях в комбустиологии // Медицинские неотложные состояния. 2007. № 3. С. 86-89.
12. **D'Almeida M.S., et al.** A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion / Jagger J., Duggan M., White M., Ellis C., Chin-Yee I.H. // Transfus Med. 2000. № 10. P. 291-303.
13. **Jensen F.B.** Red blood cell pH, the Bohr effect and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport // Acta Physiol. Scand. 2004. V. 182. P. 215-223.
14. **Koch C.G., Li L., Duncan A.I.** Morbidity and mortality risk associated with red blood cell and blood-component transfusion in isolated coronary artery bypass grafting // Crit Care Med. 2006. № 34. P. 1608-1616.
15. **Kuduvalli M., Oo A.Y., Newall N.** Effect of peri-operative red blood cell transfusion on 30-day and 1-year mortality following coronary artery bypass surgery // Eur. J. Cardiothorac Surg. 2005. № 27. P. 592-598.
16. **Mattecci E., et al.** Erythrocyte ATPase enzymes family in normal people / Cocci F., Pellegrini L., Gre-

- gori G., Navalesi R., Giampietro O. // Eur. J. Clin. Invest. 1992. V.22. № 4. P.11-18.
17. **Rokitansky O.** Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy // Hospitalis. 1982. № 52. P. 643-647.
18. **Tinmouth A., et al.** Clinical consequences of red cell storage in the critically ill // Fergusson D., Yee I.C., Herbert P.C. // Transfusion. 2006. № 46. P. 2014-2027.
19. **Wojcicki W.E., Beth A.H.** Structural and binding properties of the stilbene-disulfonate sites on erythrocyte bands 3: an electron paramagnetic resonance study using spin-labeled stilbenedisulfonates // Biochem. 1993. V.32. № 36. P. 9454-9464.

Contents of ATP and 2,3-DPG in erythrocytes for preservation and ozone exposure

V.N. Krylov, A.V. Deryugina, I.S. Simutis, G.A. Boyarinov, A.I. Senyurina

The effect of ozone at a dosage range of 0.5-11 mg/l in experiments in vitro on different erythrocyte mass storage periods. Found that low concentrations of ozone (1-3 mg/l) increased the content of ATP and 2,3-DPG in red blood cells in terms of their storage 7-21 day. Increasing the concentration of ozone was less effective. When red cell storage time to 30 days did not cause any increase in ozone concentration of ATP and 2,3-DPG.

Key words: ozone, the red blood cells of different storage periods, ATP, 2,3-DPG.

Роль макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани лабораторных животных, индуцированной биоматериалом Аллоплант

А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, Е.М. Гареев

ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, Уфа

Контактная информация: к.б.н. Лебедева Анна Ивановна, jeol02@mail.ru

С целью восстановления дефекта скелетной мышечной ткани применялся аллогенный губчатый биоматериал (АГБ). Использовались гистологические, иммуногистохимические и электронномикроскопические методы исследования. Применение АГБ при глубоком повреждении мышцы голени крысы способствовало полноценному восстановлению дефекта. Продукты биодеградации биоматериала являются хемоаттрактантом для резидентных макрофагов (CD68) и стимулируют их фенотипическое созревание, что определяет исход регенерации. В группе животных без использования биоматериала в процессе заживления дефекта наблюдался дефицит CD68 клеток и их функциональная инактивация. Результатом чего являлось образование рубца с дальнейшим перерождением в жировую ткань.

Ключевые слова: регенерация, скелетная мышца, макрофаг, биоматериал Аллоплант.

Проблема посттравматического восстановления скелетных мышц до сих пор остается актуальной. Как правило, заживление заканчивается формированием грубоволокнистого фиброзного рубца, что приводит к нарушению функционирования органа. Одним из наиболее успешно развивающихся направлений в регенеративной медицине является использование биodeградируемых трансплантатов различного происхождения. Весомую роль в биодеградации трансплантатов и ремоделировании скелетной мускулатуры выполняют клетки системы мононуклеарных фагоцитов [12, 15].

Целью исследования явилось определение ультраструктурных особенностей макрофагов и их количественной динамики при регенерации скелетной мышечной ткани после применения аллосухожильного губчатого биоматериала (АГБ).

Материалы и методы

Для исследования использовали половозрелых аутбредных крыс линии Wistar обоего пола массой 0,18-0,2 кг. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАМН.

Животных содержали в виварии, оборудованной согласно требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.77), «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого

обращения» от 01.01.1997 г. Животные содержались в одинаковых стандартных конвенциональных условиях, в пластиковых клетках с автопоилками, получали гранулированный полноценный комбикорм ПКЗ-92 и очищенную водопроводную воду без ограничений. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев.

Работу проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13 ноября 1984 г. № 724). В опытной серии (n=36) после разреза кожных покровов на задней поверхности голени производилось выделение икроножной мышцы и пяточного сухожилия, а также малоберцового нерва, который не повреждали. Затем на брюшко мышцы в средней трети наносился дефект длиной 3–4 мм. В толщу между проксимальной и дистальной культями укладывался АГБ соответствующих размеров и фиксировался нитевидным сухожильным трансплантатом. В контрольной серии (n=36) в области икроножной мышцы был нанесен дефект длиной 3–4 мм. Малоберцовый нерв не повреждали. После чего на кожу накладывали швы Vicryl 6-0. Из опыта животные выводились путем инсуффляции летальной дозы паров раствора фторотана. Забор биопсийного материала проводили через 3, 7, 14, 30, 60 и 90 суток после эксперимента. АГБ был изготовлен в данном случае из сухожилий крысы и обработан методом лиофилизации, что позволяет добиться модификации структуры в губчатую форму с увеличением объема в 6 раз. Нитевидный сухожильный трансплантат также был аллогенного происхождения, изготовлен из сухожилия крысы и пред-

ставлял собой нить, которая применялась для фиксации трансплантируемого АГБ к культям мышцы. Все трансплантаты были обработаны по оригинальной запатентованной технологии Аллоплант, разработанной в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ (Патент РФ на изобретение № 189257, ТУ 9398-001-04537642-2011).

Гистологические срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, по Маллори. Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах толщиной 4 мкм. Для этого биопсийный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия). Окраску проводили на автоматизированном стайнере для иммуногистохимии и гибридации *in situ* Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первичных поликлональных антител применяли CD68 в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, США). CD68 (высокогликозилированный трансмембранный гликопротеин, локализующийся в лизосомах). Экспрессия молекулы CD68 является маркером моноцитов/макрофагов и представляет собой гомолог мышинового макросиалина, члена семейства LAMP (лизосом-ассоциированных мембранных протеинов). Локализована преимущественно в мембране поздних эндосом [11]. Кроме того, показано, что данная молекула процессирует антиген путем постепенного ферментного расщепления фагоцитируемых клеткой объектов [9]. Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биоти-

новую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первичных антител. Подсчет клеток производили в 20-ти полях зрения каждого образца ($n=6$) при увеличении $\times 400$. После проведения иммуногистохимической реакции срезы заключали в синтетическую среду Bio Mount (Bio Optica, Италия).

Все микроскопические исследования проводились с использованием светового микроскопа AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и морфометрической программой анализа изображений Axiovision (C. Zeiss, Германия) и светового микроскопа со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения Leica DMD 108 (Германия).

Для электронно-микроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, приготовленном на какодилатном буфере (рН 7,2-7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO_4 на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим на 2,5% растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для обработки полученных числовых данных использовали параметрический дисперсионный анализ по Р. Фишеру при помощи критерия Fd [4, 6] и непараметрический (ранговый) дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллесу с использованием для сравнения отдельных выборок рангового критерия Манна-Уитни [4, 6, 8].

Результаты исследований

В контрольной группе в начальные сроки эксперимента в ране обнаруживались очаги острого воспаления и кровоизлияния. Резецированные мышечные волокна подвергались деструктивным изменениям. Пролиферативная стадия (7-14 суток) характеризовалась развитием грануляционной ткани, представленной толстыми фуксинофильными пучками коллагеновых волокон, инфильтрированных соединительнотканными и иммуногенными клетками – лимфоцитами. Среди клеток соединительной ткани преобладали клетки фибробластического ряда: мезенхимные клетки, юные фибробласты, фибробласты с активной коллагенсинтетической деятельностью (коллагенобласты II типа), в также лимфоциты и макрофагальные клетки. Определялись макрофаги секреторного и фагоцитарного типов. Причем, фагоцитарные макрофаги обнаруживались с признаками функционального истощения и перенапряжения ультраструктур. В округлом ядре гетерохроматин конденсировался вдоль кариолеммы. Цитоплазма была заполнена большим количеством разнокалиберных осмиофильных вторичных телец и фагоцитарных вакуолей. Митохондрии были набухшие, округлой формы, в просветленном матриксе выявлялись разрушенные кри-

сты. Укороченные каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума были вакуолизированы. В светлой цитоплазме обнаруживались единичные рибосомы в малом количестве, цитоскелет был представлен тоно- и микрофиламентами. Цитолемма – с локальными разрушениями (рис. 1). В грануляционной ткани отмечался скудный васкулярный рисунок. Резецированные мышечные волокна запечатывались коллагеновыми волокнами за счет наплыва сарколеммы.

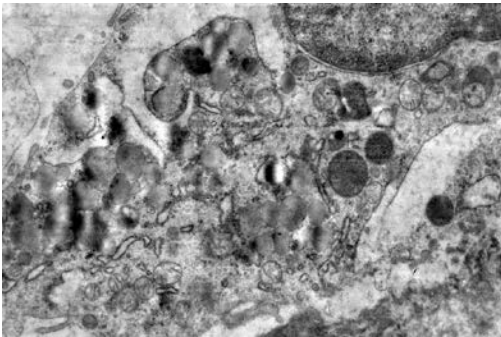


Рис. 1. Фагоцитарный макрофаг с признаками функционального истощения через 7 суток после нанесения дефекта скелетной мышечной ткани. Электронограмма. Увеличение x 15000.

Через 21 сутки макрофагальные клетки трансформировались в эпителиоидные. Длинные тонкие выросты цитолеммы образовывали интердигитации, посредством которых они взаимодействовали друг с другом, а в дальнейшем объединялись в функционально инертные гигантские клетки инородных тел (рис. 2). В зоне дефекта грануляционная ткань замещалась плотной волокнистой соединительной тканью, в которой обнаруживались жировые капли. Спустя 30 суток в области дефекта обнаружился регенерат, состоящий из мышечной, плотной волокнистой соединительной и жировой тканей (рис. 3).

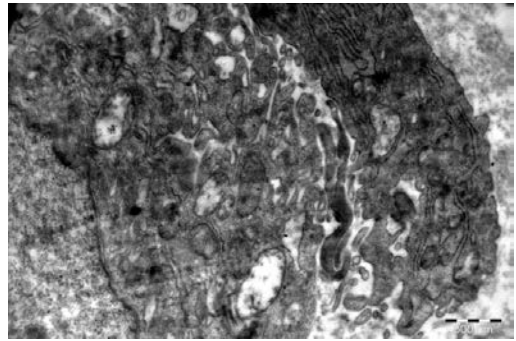


Рис. 2. Скопление макрофагальных клеток. Эпителиоидная и гигантская клетка инородных тел. Через 21 сутки после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Электронограмма. Увеличение x6000.

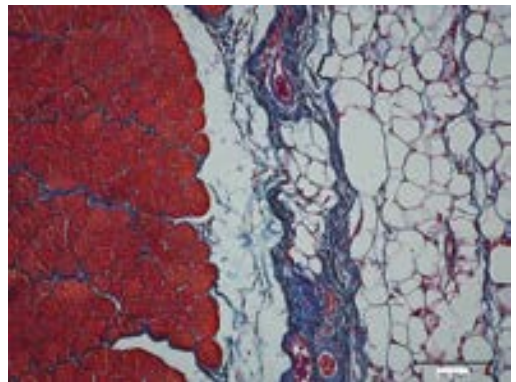


Рис. 3. Жировое перерождение соединительной ткани через 30 суток после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Окраска по Маллори.

В опытной группе через трое суток после пересадки АГБ в паратравматической зоне обнаруживались дилатация и повышенная проницаемость кровеносных сосудов, нейтрофильная инфильтрация, отек межпучковых пространств, разрушения миоцитов, кровоизлияния. В зоне трансплантата выявлялся фуксинофильный тканевый экссудат, пронизанный фибриновыми нитями в виде тонковолокнистой сети. Проницаемость кровеносных сосудов способствовала клеточной элимина-

ции, набуханию и ферментативному воздействию на трансплантат. Через 7 суток воспалительная инфильтрация в реактивной зоне и в самом трансплантате замещалась на макрофагально-фибробластическую на фоне развитой рыхлой сети тонких коллагеновых волокон. Выявлялись фибробласты с умеренно расширенными каналами гранулярного эндоплазматического ретикулума и классифицировались как коллагенобласты I типа – клетки с умеренным синтезом коллагена. Выявлялись отростчатые макрофаги преимущественно фагоцитарного типа, которые контактировали с клетками фибробластического ряда. Округлое ядро макрофагов было заполнено мелкозернистым эухроматином. В цитоплазме выявлялись короткие каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума, округлые митохондрии с затемненным матриксом и параллельно ориентированными четкими кристами, цистерны комплекса Гольджи, многочисленные свободные рибосомы, фагосомы и вакуоли (рис. 4).

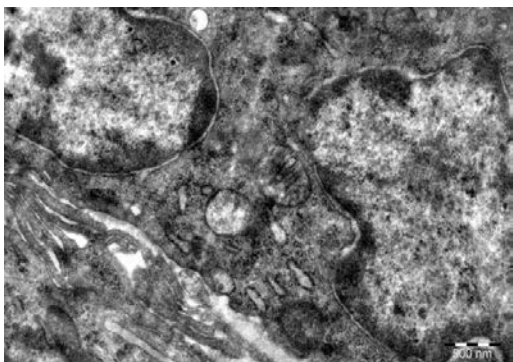


Рис. 4. Макрофаг фагоцитарного типа во взаимодействии с фибробластом через 14 суток после имплантации в скелетную мышцу крысы АГБ. Электронограмма. Увеличение $\times 6000$.

Наряду с соединительнотканными клетками обнаруживались малодифференцированные клетки без определенной специализации, а также клетки миогенной дифференциации – миосателлитоциты II типа и миобласты. После лизиса и резорбции балок АГБ макрофагами происходило постепенное разрастание обильно васкуляризированной рыхлой неоформленной соединительной ткани. Спустя 14 суток выявлялось замещение АГБ от периферии по всей ее площади. Наблюдались признаки формирования мышечно-соединительнотканного регенерата с преобладанием рыхлой соединительной ткани, инфильтрированной фибробластами и многочисленными макрофагами (рис. 5). Строму сопровождала обильная сеть гемокapилляров, свободные миоциты, образующие почки роста и тяжи новообразованных тонких мышечных волокон.

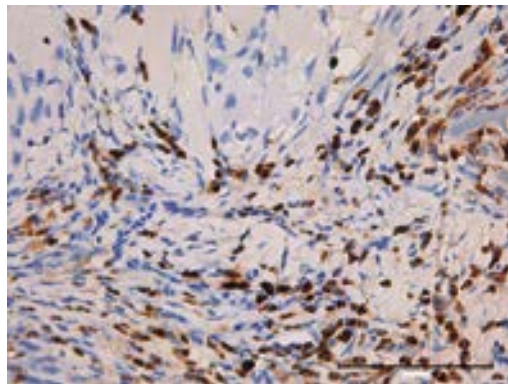


Рис. 5. Массивная инвазия $CD68^+$ макрофагов в реактивной зоне через 14 суток после имплантации в скелетную мышцу крысы АГБ. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления $CD68^+$ клеток с докраской гематоксилином.

Через 30 суток в очаге трансплантации обнаруживался мышечно-соединительнотканый регенерат с

преобладанием мышечной ткани. Пространственная ориентация растущих миосимпластов была параллельна балкам предсуществующего биоматериала. Через 60-90 суток регенерат был представлен пучками мышечных волокон, окутанных эндо- и перимизием (рис. 6).

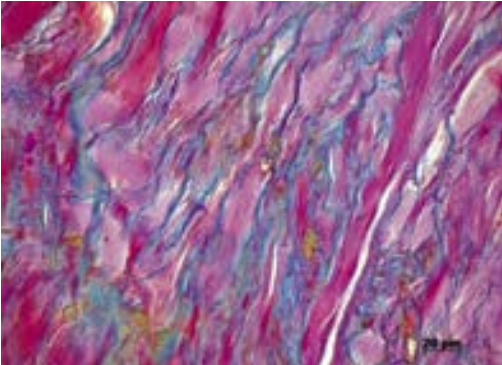


Рис. 6. Новообразованная мышечная ткань в зоне трансплантации АГБ спустя 90 суток. Параллельно ориентированные пучки мышечных волокон окутаны эндо- и перимизием. Окраска по Маллори.

Численность CD68+ клеток в контрольной и опытной группах в начальные сроки эксперимента (3 суток) практически находилась на одном уровне: 61 ± 29 ($p > 0,60$) и 67 ± 28 ($\eta^2 = 22\%$, $F = 18,2$, $p < 0,001$), критерий Манна-Уитни составлял $Z = 0,79$, $p > 0,43$ соответственно. Через 7 суток после применения АГБ доля CD68+ удваивалась до 115 ± 21 клеток ($p < 0,0002$), в то время как в контрольной группе численность данных клеток была достоверно ниже, в 1,5 раза (75 ± 32 , $p < 0,001$). По мере заживления дефекта в скелетной мышечной ткани число клеток параллельно снижалось. Причем, после применения АГБ CD68+ клетки обнаруживались в период 30-90 суток ($9 \pm 9 - 1,6 \pm 1,6$, $\eta^2 = 14\%$, $F = 5,8$, $p < 0,005$), а в контроле отсутствовали ($1 \pm 0,5$, $\chi^2 = 15,2$, $p < 0,002$) (рис. 7).

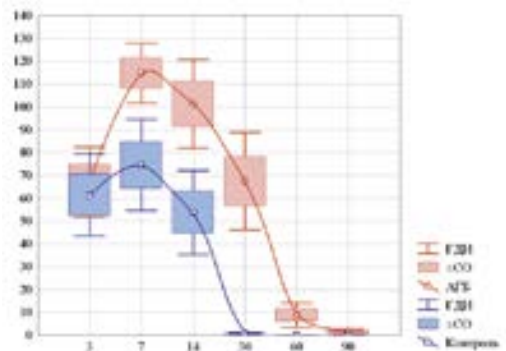


Рис. 7. Динамика численности CD68+ клеток после применения АГБ и в контроле. По оси абсцисс – сроки наблюдения в днях. По оси ординат – среднее число клеток. ГДИ – границы доверительного интервала для средних, $\pm CO$ – стандартная ошибка среднего значения.

Обсуждение результатов

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в контрольной группе животных стадия острого воспаления трансформировалась в фазу пролиферации с образованием гранулематозной ткани, в которой наиболее усиленной является деятельность фибробластов. Выраженная фибробластическая реакция и дифференциация их в коллагенобласты II типа инициирует усиленное коллагенообразование. Дефицит и фенотипическая незрелость макрофагов способствует незавершенному фагоцитозу и привлечению иммунокомпетентных клеток, дифференциации в неактивные гигантские формы с низкой фагосекреторной активностью. Выявленные скопления эпителиоидных клеток можно расценить как признак развития компенсаторно-адаптивной клеточной реакции, выражающейся в гипертрофии макрофагов. Последующая их трансформация в гигантские клетки инородных тел свидетельствует

о развитии гранулематозного воспаления, исходом которого является фиброзирование дефекта и развитие рубца [3]. Ишемия тканей, развившаяся из-за редукции гемокapилляров, также может способствовать распаду мышечных волокон и их массовой гибели, что также провоцирует развитие фиброза [1].

Биоматериалы Аллоплант изготавливаются из волокнистых соединительнотканых кадаверных тканей. При биодеградации биоматериала Аллоплант происходит дозированная элиминация коллагена, протеогликанов и гликозаминогликанов, основную долю которых составляет гиалуроновая кислота [7]. В опытной группе животных при замещении АГБ у реципиента формируется соединительнотканно-мышечный регенерат, где доля собственной органотипической рыхлой волокнистой соединительной ткани со временем снижается за счет ее замещения мышечной. Макрофагальная реакция в начальные сроки эксперимента (3-е суток) не отличается от контрольных значений и является признаком острого воспаления, обусловленного оперативным вмешательством. Спустя 7 суток динамика роста количества CD68⁺-клеток значительно превосходит контрольные значения, т.к. продукты биодеградации АГБ являются хемоаттрактантами для резидентных макрофагов и способствуют их фенотипическому созреванию в клетки фагоцитарного типа. По мере резорбции биоматериала и ремоделирования регенерата численность макрофагальных клеток снижается. В многочисленных исследованиях, касающихся регенерации скелетной мышечной ткани, им отводится большое значение как клеткам, определяющим репаративную эф-

фективность [14, 15]. Активированные макрофаги, в свою очередь, влияют на фенотип фибробластов и ингибируют избыточный синтез коллагена [5].

По некоторым данным, макрофаги также способствуют успешному приживлению миогенных клеток предшественников в раннем периоде заживления скелетной мускулатуры [10, 13, 14]. В опытной группе животных происходит ранняя активация миосателлитоцитов и их дифференциация в зрелые миоциты. Новообразованные миосимплеты сопровождают коллагеновые волокна и свободно проникают между ними. За счет удлинения и гипертрофии мышечных волокон они постепенно вытесняют новообразованную рыхлую соединительную ткань на периферию мышечного пучка. Так формируется эндомизий и перимизий. В данном случае соединительная ткань выступает «в качестве источника индукционно-формативной тканевой регуляции», а мышечная ткань является регулируемой системой [2].

Выводы

После глубокого повреждения скелетной мышечной ткани выявляется дефицит CD68⁺-клеток и их функциональная инактивация. Вследствие чего развивается процесс хронического воспаления и рубцевания дефекта с дальнейшим перерождением в жировую ткань. В противовес этому, при замещении дефекта в мышце аллогенным губчатым биоматериалом продукты его резорбции стимулируют усиленную миграцию фенотипически зрелых CD68⁺-макрофагов к очагу повреждения, что способствует полноценному миогенезу.

Список литературы

1. **Данилов Р.К.** Раневой процесс: гистогенетические основы. – СПб: ВМедА им. С.М. Кирова. 2008. 308 с.
2. **Клишов А.А.** Гистогенез и регенерация тканей. - Л.: Медицина. 1984. 232 с.
3. **Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А.** Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза // Биомедицина. № 4. 2013. С. 114-123,
4. **Реброва О.Ю.** Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. - М.: МедиаСфера. 2002. 312 с.
5. **Серов В.В., Шехтер А.Б.** Соединительная ткань. - М.: Медицина. 1981. С. 312.
6. **Халфин А.А.** Statistica 6. Статистический анализ данных. - М.: ООО «Бином-Пресс». 2008. 512 с.
7. **Хасанов Р.А.** Инъекционная форма аллотрансплантатов серии «Аллоплант». Получение, анализ и биологическая активность: Автореф. дисс. ... к.фарм.н. - Пермь. 1999. 24 с.
8. **Холлендер М., Вульф Д.** Непараметрические методы статистики. - М.: Финансы и статистика. 1983. 518 с.
9. **Holness C.L., da Silva R.P., Fawcett J., Gordon S., Simmons D.L.** Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9661-9666.
10. **Lesault P.F., Theret M., Magnan M., et al.** Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cell into MDX skeletal muscle // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. 46698 p.
11. **Linehan S.A.** The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs // BMC Immunol. 2005. V. 6. P. 1471-1477.
12. **Novak M.L., Weinheimer-Haus E.M., Koh T.J.** Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury // J. Pathol. 2014. V. 232. № 3. P. 344-355.
13. **Segawa M., Fucada S., Yomamoto Y.H., et al.** Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis // Experimental cell research. 2008. V. 314. P. 3232-3244.
14. **Stefater J.A., Ren S., Lang R.A., Duffield J.S.** Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration // Trends Mol. Med. 2011. V. 17. № 12. P. 743-752.
15. **Wang H., Melton D.W., Porter L., et al.** Altered macrophage phenotype transition impairs skeletal muscle regeneration // Am J. Pathol. 2014. V. 184. № 4. P. 1167-1184.

The role of macrophages in the regeneration of skeletal muscle tissue laboratory animals, induced by the Alloplant biomaterial

A.I. Lebedeva, S.A. Muslimov, L.A. Musina, E.M. Gareev

In order to restore defect skeletal muscle tissue was used allogeneic spongy biomaterial (AGB). Used histological, immunohistochemical and electron microscopic methods. The use of AGB in a deep damage to the muscles of the calf rats contributed to a full restoration of the defect. The products of biodegradation of biomaterial are chemoattractant for resident macrophages (CD 68) and stimulate their phenotypic maturation that determines the outcome of regeneration. In the group of animals without the use of biomaterial in the healing process of the defect were scarce CD 68 cells and their functional inactivation. The result was the formation of a scar with a further degeneration in the adipose tissue.

Key words: regenerate skeletal muscle, the macrophage, the Alloplant biomaterial.

Влияние синтетического нанопептида на сперматогенез у осетровых рыб

А.В. Лабенец¹, Г.Д. Капанадзе², Э.В. Бубунец³

¹ - ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

² - ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

³ - ФГБУ «Центральное управление по рыбохозяйственной экспертизе и нормативам по сохранению, воспроизводству водных биологических ресурсов и акклиматизации», Москва

Контактная информация: д.б.н. Капанадзе Гия Джемалиевич, giyak@yandex.ru

Однократные инъекции нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ в дозировке 2 см³ раствора концентрацией 5 мкг/мл (10 мкг/особь) стабильно индуцируют спермиацию у самцов осетровых рыб в условиях культивирования. Стандартные критерии качества эякулятов и результаты функционального тестирования показали их физиологическую полноценность и пригодность для использования в процессе воспроизводства.

Ключевые слова: нанопептид $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$, осетровые рыбы, индукция спермиации, качество спермы.

Синтетические нанопептиды находят все более широкое применение в практике животноводства и медицины [5]. Растет использование веществ этой группы и в аквакультуре.

Воспроизводство многих наиболее ценных видов рыб осуществляется при помощи искусственной индукции созревания половых продуктов, реализуемой путем инъекций гормональных препаратов. Начиная с 30-х гг. прошлого века, для данной цели использовались нативные гипофизы соответствующих видов рыб, а позднее – получаемые из них препараты. Возникающие по мере распространения этой практики вопросы, такие как проблема стандартизации активности препаратов гипофиза, растущий дефицит сырья для их производства и др., длительное время не находили удовлетворительного решения. На этом

фоне возросла актуальность адекватной замены гипофизарных препаратов. Наиболее эффективным подходом здесь оказался поиск заменителей гипофизов рыб среди гормонов совсем иной природы, чем гонадотропины.

Исследование механизмов, обеспечивающих регуляцию деятельности гонад, позволило установить, что синтез и выведение гонадотропных гормонов гипофиза находятся под контролем гипоталамуса, который осуществляет эту функцию с помощью рилизинг-гормонов. Последние являются пептидами, состоящими всего из 10 аминокислот [2]. Многие их синтетические аналоги, выпускаемые в настоящее время, обладают многократно большей биологической активностью, чем естественные рилизинг-гормоны. В отечественной аквакультуре наибольшее распростра-

нение получил синтетический аналог лютеинизирующего гормона – рилизинг гормона (ЛГ-РГ) млекопитающих – «Сурфагон» ($C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$).

Несмотря на наличие определенных проблем, он широко применяется в современной практике воспроизводства многих видов рыб [1]. Основное внимание здесь уделяется отработке оптимальных схем использования препарата для стимулирования овуляции ооцитов и анализу получаемых при этом результатов. Исследования особенностей эякулятов, получаемых в результате индукции спермиации нанопептидом, до настоящего времени привлекают неоправданно мало внимания [6].

Целью работы являлось изучение эякулятов культивируемых осетровых рыб, продуцируемых при индукции спермиации синтетическим нанопептидом $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$.

Материалы и методы

Для получения исследованных эякулятов использовались половозрелые самцы ряда видов осетровых, выращенные и содержащиеся в предприятиях Московской области – Можайском производственно-экспериментальном рыболовном заводе и рыболовном хозяйстве Электрогорской ГРЭС-3 им. Р.Э. Классона. Регламент преднерестового содержания и условия среды в целом соответствовали нормативным значениям [7].

Для стимулирования созревания применялся препарат «Сурфагон» производства ЗАО «Мосагроген», одноименное действующее вещество которого имеет структурную формулу ([des-Gly10, D-Ala6]–LHRH ethylamide) и является, соответственно, синтетическим нанопептидом, так как содержит

на одну аминокислоту меньше, чем естественный рилизинг-гормон.

Индукция спермиации осуществлялась путем однократного инъектирования производителей в спинную мышцу (рис. 1) раствором сурфагона (5 мкг/мл) в 0,9 % растворе хлорида натрия. Дозировка составляла 2 см³ на особь. Продолжительность экспозиции составляла от 18 до 30 ч в зависимости от температуры воды.



Рис. 1. Инъектирование самца стерляди раствором нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$.

Получение спермы проводилось при помощи силиконового катетера, вводимого в семяпровод. Для сбора эякулятов использовались полиэтиленовые пробирки (рис. 2).



Рис. 2. Получение спермы у самца русского осетра.

Изучение эякулятов проводили с использованием методик, имеющих широкое применение в работах такого рода [3]. Соотношение живых и мертвых спермиев определялось путем глазмерной оценки спермы под микроскопом с использованием 5-балльной шкалы. Количество спермиев в единице объема определялась путем их подсчета в камере Горяева с разбавлением эякулята в 200 раз 4% раствором формалина в эритроцитном меланжере.

Активность спермиев оценивалась по длительности двух фаз: I – до перехода большей части спермиев (>50-60%) от поступательного движения к колебательному; II – до полного прекращения движения большинства спермиев. Продолжительность движения измерялись с использованием электронного секундомера под микроскопом с увеличением 400×. Для определения сперматокрыта, которое проводилось немедленно после получения эякулятов, использовалась центрифуга МГЦ-8 и стандартные гематокритные капилляры [3, 8]. Обработка полученных данных проведена с использованием пакета программ «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение

Основные показатели качества эякулятов осетровых рыб при индукции спермиации синтетическим нанопептидом приведены в таблице. Визуальная оценка полученных эякулятов показала их близкое к среднему качество. Существенный разброс данных (2-5 баллов) и весьма высокая их вариабельность обусловлены, по-видимому, спецификой сперматогенеза у отдельных самцов.

Важным элементом оценки качества спермы является определение

концентрации спермиев в единице объема эякулята. Как показывают приведенные в табл. данные, у всех использованных в экспериментах видов (за некоторым исключением стерляди) величины этого показателя были близки к средним видовым значениям, обычно рассматриваемым в качестве нормативных [7]. Сперматокрыт, как показатель довольно тесно коррелирующий с концентрацией спермиев, в большинстве случаев закономерно соответствовал величинам последнего параметра. Высокая изменчивость исследованных эякулятов по этим параметрам, очевидно, детерминировалась индивидуальными особенностями продуцировавших их самцов и наличием объективных различий в физиологическом статусе рыб.

Активность спермиев, оцениваемая по времени их подвижности, в значительной степени определяется внешними факторами, которые в условиях культивирования могут существенно отличаться от характерных для естественных условий. В первую очередь, это касается температуры воды и некоторых гидрохимических показателей [4]. Однако, несмотря на несколько меньшую, по сравнению со считающейся типичной, длительность обеих фаз движения спермиев, время их поступательного движения следует рассматривать как вполне достаточное для эффективного оплодотворения.

Решающим критерием оценки качества эякулятов является их функциональное тестирование, т.е. определение оплодотворяющей способности спермы. В процессе проведения данной работы оплодотворяемость икры (оценивавшаяся на стадии второго деления)

составила в разных партиях: у белуги – 30-97, у русского осётра – 82-92, севрюги – 50-94, сибирского осётра – 78-85 и стерляди – 60-81%. Таким образом, значения этого важнейшего показателя у всех исследованных видов не имели значимых отличий от современных нормативов [7].

Выводы

1. Применение нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ для индукции спермиации у самцов осетровых рыб обеспечива-

ет продуцирование физиологически полноценных эякулятов, соответствующих по исследованным показателям производственным нормативам и обладающих высокой оплодотворяющей способностью.

2. Использование нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ в условиях аквакультуры достаточно эффективно для гормональной стимуляции созревания самцов таких видов осетровых, как севрюга и белуга, до настоящего времени считающихся проблемными.

Таблица

Показатели качества эякулятов

| Показатель | | Белуга | Русский осётр | Севрюга | Сибирский осётр | Стерлядь | |
|---|---------------------------|--------------|---------------|------------|-----------------|------------|------------|
| Визуальная оценка эякулята, балл | Lim: min-max | 3-5 | 2-5 | 3-4 | 3-5 | 3-4 | |
| | M±m | 3,9±0,3 | 4,6±0,1 | 3,5±0,2 | 4,0±0,6 | 3,3±0,2 | |
| | Cv±mCv | 16,7±5,3 | 14,5±1,9 | 14,3±3,8 | 28,9±10,2 | 13,6±4,3 | |
| Концентрация спермиев, млрд/см ³ | Lim: min-max | 0,7-1,8 | 0,5-6,2 | 0,9-3,6 | 0,6-3,7 | 0,2-0,7 | |
| | M±m | 1,1±0,2 | 1,6±0,2 | 2,5±0,4 | 1,9±0,8 | 0,3±0,1 | |
| | Cv±mCv | 40,2±12,7 | 72,1±9,1 | 37,5±10,1 | 82,8±29,3 | 69,9±22,1 | |
| Спермато-крит, % | Lim: min-max | 1,9-6,0 | 2,6-10,9 | 2,0-4,7 | 2-18 | 2-4 | |
| | M±m | 3,9±0,8 | 5,8±0,3 | 3,4±0,4 | 8,5±3,9 | 2,6±0,4 | |
| | Cv±mCv | 47,1±14,9 | 32,3±4,1 | 29,1±7,8 | 92,9±32,8 | 34,4±10,9 | |
| Активность спермиев | Подвижность, сек. фаза I | Lim: min-max | 70-120 | 28-224 | 33-120 | 60-180 | 60-180 |
| | | M±m | 87,2±8,9 | 95,4±9,2 | 50,9±11,6 | 135,0±25,9 | 120,0±18,9 |
| | | Cv±mCv | 22,7±7,2 | 54,4±6,8 | 60,6±16,2 | 38,5±13,6 | 35,4±11,2 |
| | Подвижность, сек. фаза II | Lim: min-max | 110-540 | 77-1667 | 74-480 | 420-840 | 300-540 |
| | | M±m | 269,8±88,3 | 301,5±75,7 | 153,6±54,8 | 660,0±88,3 | 384,0±44,9 |
| | | Cv±mCv | 73,2±23,2 | 112,3±17,8 | 94,4±25,2 | 26,8±9,5 | 26,2±8,3 |

Список литературы

1. **Баранникова И.А., Тренклер И.В., Дюбин В.П.** Значение метода гормональной стимуляции созревания для сохранения и воспроизводства рыбных запасов // Актуальные проблемы рыбоводства в работах Центральной лаборатории по воспроизводству водных биоресурсов (1938-2008 гг.), к 70-летию работы. - СПб. 2008. С. 17-24.
2. **Гончаров Б.Ф.** Использование метода гипофизарных инъекций в рыбоводстве. Некоторые итоги и перспективы // Исследования размножения и развития рыб. - М.: Наука. 1981. С. 16-48.
3. **Казаков Р.В., Образцов А.Н.** Методы оценки половых клеток рыб: рыболовная оценка спермы // Обзорная информация. Сер. марикультура. ВНИ-ЭРХ. 1990. № 4. С. 1-54.
4. **Лабенец А.В., Чагай В.Н., Шишанова Е.И.** Качество эякулята самцов русского осетра, выращенных в садковом хозяйстве // Мат-лы междунаучно-практ. конф. «Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности» (Москва, 11-13 апреля 2005 г.). Т. 2. - М. 2005. С. 58-63.
5. **Лисин В.И., Сушко А.Б.** Результаты применения Сурфагона в практике искусственного осеменения кроликов // Научно-технический бюллетень ИТ НААН. 2013. № 109 (1). С. 174-181.
6. **Тренклер И.В., Груслова А.Б.** Применение Сурфагона для гормональной стимуляции созревания русского осетра // Мат-лы и докл. междунауч. симп. «Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата» (Астрахань, 16-18 апреля 2007 г.). - Астрахань: Изд-во АГТУ. 2007. С. 371-373.
7. **Чебанов М.С., Галич Е.В.** Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб. Технические доклады ФАО по рыбному хозяйству и аквакультуре. № 558. Анкара: ФАО. 2013. 297 с.
8. **Scott A.P., Baynes S.M.** A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa // J. of Fish Biol. 1980. Vol. 17. № 6. P. 707-739.

Effect of synthetic nanopptide on spermatogenesis in sturgeons

A.V. Labenets, G.D. Kapanadze, E.V. Bubunets

Single injections of nanopptide $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ in a dosage of 2 cm^3 of solution concentration of 5 mkg/ml (10 mkg / an individual) steadily induce a sperm allocation at males of sturgeon fishes in the conditions of cultivation. Standard criterions of quality ejaculate and results of functional testing showed their physiological full value and suitability for use in the course of reproduction.

Key words: nanopptide $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$, sturgeons, induction of a sperm allocation, quality of sperm.

Использование гидробионтов для моделирования патологии паренхиматозных органов

Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹, Г.Д. Капанадзе¹,
О.В. Баранова¹, О.И. Степанова¹

¹ - ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² - ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

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

Показана возможность использования пойкилотермных гидробионтов для проведения модельных экспериментов. Проведено успешное моделирование патологии печени и поджелудочной железы у карпов, гепатопанкреаса речных раков.

Ключевые слова: рыбы, речные раки, моделирование патологии, паренхиматозные органы, печень, поджелудочная железа, гепатопанкреас.

При исследованиях в области медицины нередко возникает необходимость вызывать патологию для нахождения оптимальных способов лечения различных болезней, углубленного изучения функций органов и систем [5, 1].

Для этого используется комплексное моделирование доклинических и клинических испытаний, в т.ч. лекарственных препаратов, выполненных на классических и альтернативных биологических объектах, и экстраполяция на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных.

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

- по этическим соображениям, т.к. эти организмы находятся на более низкой ступени эволюционного древа;

- они являются более доступными объектами исследования;
- у них легче вызвать патологию, т.к. 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 [22, 13, 10, 15, 21]. Относительно восприятия болевых импульсов у рыб ведутся дебаты, однако большинство авторов склонны считать, что у рыб понижен болевой порог чувствительности [19, 11, 23].

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, биологии, связанной с развитием, экологии, экологической токсикологии, эндокринологии, геронтологии, генетики, молекулярного развития, нейробиологии и фармакологии [20, 8].

Перспективным направлением биомоделирования является использование беспозвоночных животных, которые

химатозных органов (поджелудочной железы и печени) у рыб и гепатопанкреаса речных раков.

Материалы и методы

Экспериментальные объекты исследовались методом моделирования.

В качестве объекта нами выбраны двухлетки карпа (*Cyprinus carpio* L.), выращенные в аквариальных условиях с фазы сеголеток. Рыбы содержались в аквариальных условиях при температуре +14-16 °С. А также исследовались длиннопалые речные раки (*Pontastacus leptodactylus*).

Патология поджелудочной железы и печени рыб вызывалась однократным внутрибрюшинным введением аллоксана в дозе 200 мг/кг.

Патология печени рыб моделировалась парацетамолом. Препарат вводился *per os* по следующей схеме, представленной в табл. 1.

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 15 г/кг + 1 мл 50% спирта | 1 мл 50% спирта | Парацетамол 15 г/кг + 1 мл дистиллированной воды |

обладают сопоставимостью физиологической реакции с высшими животными, а также специфическими свойствами, позволяющими расширить представления о спектре действия тестируемого фактора на биосистему. Они удовлетворяют современным этическим представлениям и нормам, ограничивающим область применения высших животных в экспериментальных исследованиях.

Целью настоящих исследований являлось моделирование патологии парен-

химатозных органов (поджелудочной железы и печени) у рыб и гепатопанкреаса речных раков вызывалась ведением аллоксана в дозе 100 мг/кг в вентральный синус однократно.

Кровь для анализа отбиралась из хвостовой вены рыб прижизненно. Гемолимфу речных раков получали *in vivo* путем пункции вентрального синуса.

Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) проводился в окрашенных по Паппенгейму мазках

периферической крови, осуществлялся микроскопически на цифровом микроскопе Optika DM 15.

Биохимические анализы (глюкоза) проводились на глюкометре Ассu-Сhek Active.

Внутренние органы фиксировались в 10% растворе формалина. Затем, после обезвоживания и заливки в парафин готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином. Гистологические исследования проводились с помощью цифровой микроскопии.

Обработка полученных результатов проводилась методом вариационной статистики по Стьюденту с использованием программы Excel пакета Microsoft Office. Достоверными считались различия показателей при $p < 0,05$.

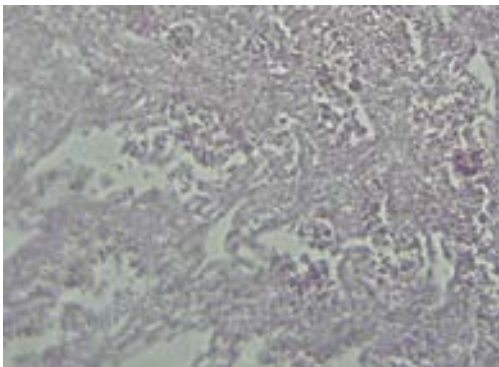
Результаты и их обсуждение

На всем протяжении эксперимента (53 дня) гибели исследуемых сеголетков карпа (с введенным аллоксаном) не наблюдалось.

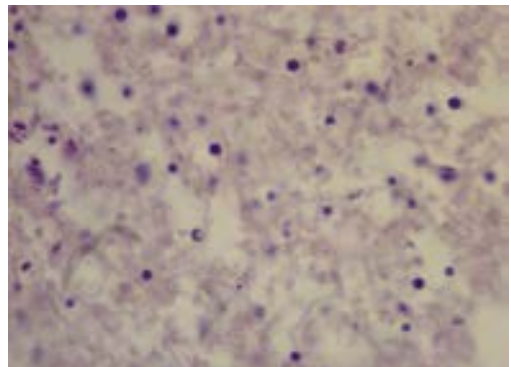
Гистологические исследования показали разрушение структуры островков Лангерганса (рис. 1А).

При воздействии аллоксана были обнаружены патологические изменения в гистоструктуре печени карпа. Гистология показала полное нарушение архитектоники органа. Жировые капли замещают собой клетки печеночной паренхимы. Пустоты на месте экстрагированного жира во всех направлениях пронизывают ткань, создавая в ней многочисленные разрывы. Количество ядер гепатоцитов существенно меньше по сравнению с нормой (рис. 1Б).

Результаты исследований речных раков показали, что через 3 дня после введения аллоксана содержание глюкозы в гемолимфе было невелико, что характерно для здоровых особей. Затем, к 7-му дню, наступает повышение уровня глюкозы в гемолимфе и остается таким до конца эксперимента. На 3-й и 23-й дни после введения 100 мг/кг аллоксана наблюдалась гибель двух речных раков.



А. Поджелудочная железа.
Увеличение x 100.



Б. Печень.
Увеличение x 640.

Рис. 1. Гистологическая картина внутренних органов карпа при воздействии аллоксана

Патологоанатомические изменения гепатопанкреаса: увеличение органа, дряблая консистенция, серо-зеленоватый цвет (рис. 2). У здорового речного рака гепатопанкреас имеет плотную консистенцию и красновато-коричневый цвет.

Патологоанатомические изменения гепатопанкреаса: увеличение органа, дряблая консистенция, серо-зеленоватый цвет (рис. 2). У здорового речного рака гепатопанкреас имеет плотную консистенцию и красновато-коричневый цвет.

Гистологические исследования показали, что в ткани гепатопанкреаса происходит вакуолизация цитоплазмы R-клеток после введения аллоксана (рис. 3).



Рис. 2. Вскрытие погибшего речного рака *Pontastacus leptodactylus* L.

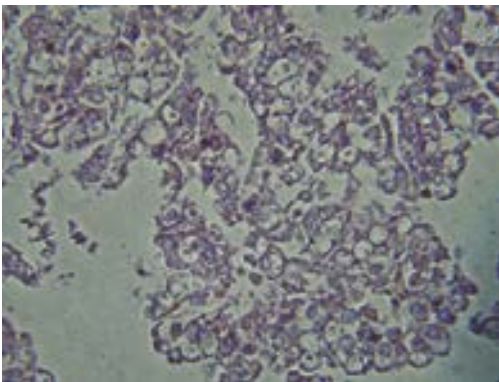


Рис.3. Гистологическая картина гепатопанкреаса длиннопалого речного рака *Pontastacus leptodactylus* L. Вакуолизация цитоплазмы R-клеток. Увеличение x 400.

Результаты исследований с парацетамолом показали, что через 1 мес. эксперимента (через 2 недели после окончания медикаментозного курса) в опытных группах рыб (2 и 4) отмечается снижение индекса печени (рис. 4), т.к. в органе происходит детоксикация препарата.

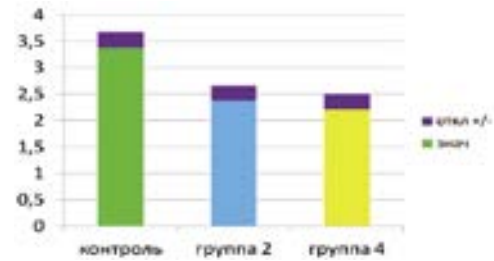


Рис.4. Индексы печени рыб через 1 мес. эксперимента.

У этих рыб наблюдалась дряблость печени и некротизированные участки в ней. А также отложения и инкапсуляция парацетамола диаметром 2-5 мм в печени (рис. 5), а у рыб 2-й группы – и в почках. Почки рыб 4-й группы дряблой консистенции.



Рис. 5. Включение парацетамола в печени экспериментального карпа.

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. Соответственно, индекс желчного пузыря с содержимым в этих группах был высоким (табл. 2).

Таблица 2
Индексы желчного пузыря
экспериментальных карпов, %

| Контроль | Группа 2 | Группа 4 |
|-----------|------------|------------|
| 0,28±0,02 | 0,59±0,09* | 0,45±0,07* |

Примечание: * различия достоверны по сравнению с контролем.

Отмечались нарушения морфологии клеток периферической крови у опытных рыб (рис. 6).

Уровень лейкопоза, судя по относительному количеству бластных форм лейкоцитов (миелобластов, промиелоцитов), наименее интенсивен в группе 2 (табл. 3). Вероятно, введение парацетамола со спиртом затормозило данный процесс. В лейкограмме экспериментальных карпов велика доля эозинофилов. Вероятно, причина – в активации системы комплемента при детоксикации. В группе рыб 3, получавших 50% спирт без парацетамола, снижена доля зрелых сегментоядерных нейтрофилов. В литературе имеются сведения об активации апоптоза и, следовательно, разрушения нейтрофилов у людей при злоупотреблении алкоголя [3].

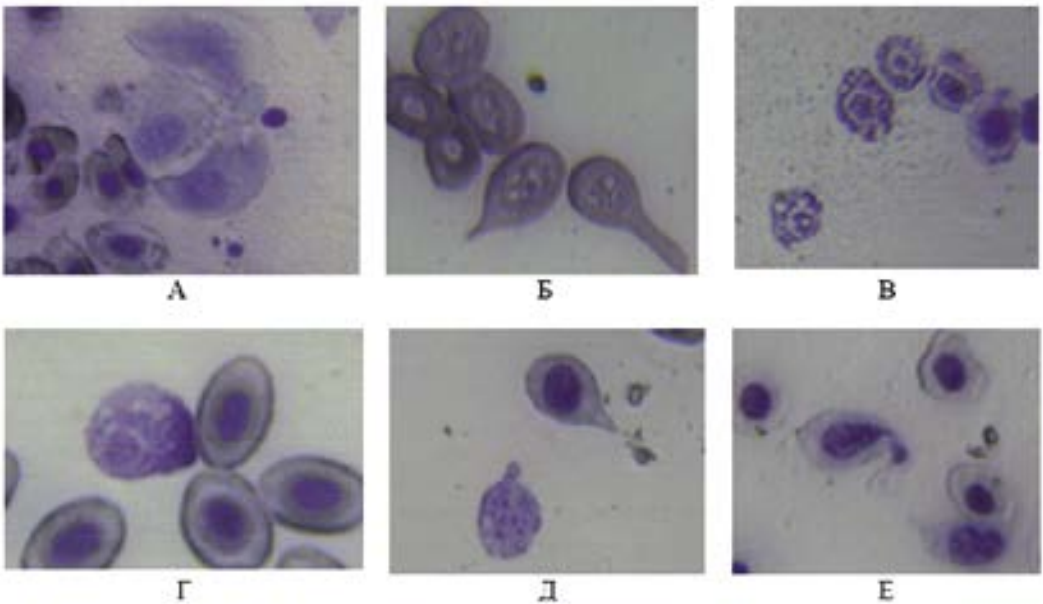


Рис. 6. Клетки периферической крови. Увеличение х 600. А, Б, В – клетки крови карпов 4 группы (А – гемоцитобласты, разрушение и деформация эритроцитов; Б – эритроциты с псевдоподиями, в ядрах глыбки хроматина; В – вакуолизация и эозинофилия цитоплазмы эритроцитов). Г, Д, Е – клетки крови рыб 2 группы (Г – эозинофил, начало лизиса цитоплазмы; Д – клетки крови с псевдоподиями: эритроцит, базофил меньших размеров; Е – гемоцитобласт и моноцит с псевдоподиями).

Лейкограмма молоди карпа

| Показатели | Группы рыб | | | |
|---------------------------|------------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 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 |

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

Выводы

Таким образом, введение аллоксана вызывает патологические изменения поджелудочной железы и печени рыб. В поджелудочной исследуемых гидробионтов наблюдается нарушение структуры островков Лангерганса. Ткань печени карпа и окуня характеризуются накоплением жировых включений в гепатоцитах, пикнозом их ядер, деструкцией самих гепатоцитов, выделением массы фагоцитов в паренхиму органа, интенсивной инфильтрацией форменными элементами крови и нарушением архитектоники органа. В печени карпа встречаются участки, обнаруживающие практически полную дегенерацию большей части клеток.

При введении аллоксана в дозе 100 мг/кг отмечается патология гепатопанкреаса длиннопалых речных раков. Это обнаружено по динамике уровня глюкозы в крови, а также по результатам гистологических исследований.

Введение парацетамола per os в дозе 15 г/кг семикратно в течение 14 дней у молоди карпа вызывает нарушения как на органном, так и на клеточном уровне. Действие препарата усиливается смешиванием с 50% спиртом.

Список литературы

1. *Адо А.Д.* (Ред.) Патологическая физиология. - М.: Триада-Х. 2000. 574 с.
2. *Артюков А.А., Мензорова Н.И., Козловская Э.П., Кофанова Н.Н., Козловский А.А., Рассказов В.А.* Ферментный препарат из гепатопанкреаса промышленных видов крабов и способ его получения. Патент № 2280076, заявка № 2004135771 от 20.07.2006 г.
3. *Жернова Е.В., Вялова Н.М., Иванова 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.
4. **Корягина Н.Ю., Пронина Г.И., Ревякин А.О.** Сравнительная характеристика альтернативных биомоделей по гематологическим и биохимическим показателям // Биомедицина. 2010. № 2. С. 68-70.
 5. **Крыжановский Г.Н.** Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // Вест. Рос. АМН. 1997. № 5. С. 60-62.
 6. **Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л.** Молекулярная биология. - М.: «МИА». 2003.
 7. **Тамкявичене Е.А.** Некоторые количественные закономерности питания широкопалого рака. Литв.: Сб. научн. тр. // Ин-т Зоол. и Паразитол. АН ЛитССР. 1979. С. 67-76.
 8. **Bolis C., Piccoletta M., Dalla Valle A.Z., Rankin J.C.** Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research*. 2001. 44. P. 265-280.
 9. **Bormann I.** In Bolk: Hand der vergleichenden Anatomie der Wirbeltierer 3. 1937.
 10. **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.
 11. **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 neurotransmitters // *Journal of Comparative Neurology* 297. 1990. P. 210-218.
 12. **Elsner M., Tiedge M., Guldbakke B., et al.** Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan // *Diabetologia*. 2002. Vol. 45. № 11. P. 1542-49.
 13. **Evans D.H., Claiborne J.B.** *The Physiology of Fishes*. 3th edn. 2005. 616 p.
 14. **Harrison F.W., Humes A.G.** *Microscopic anatomy of invertebrates. Decapoda Crustacea*. - New York: Willey-Liss Inc. 1992. Vol. 10. 459 p.
 15. **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. P. 323-340.
 16. **Kroncke K.D., Fehsel K., Sommer A., et al.** Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitrosourea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1995. Vol. 376. № 3. P. 179-185.
 17. **Laguesse E.** Structure du pancreas intrahépatique chez les poissons // *C.R. Acad.*, 112. 1891. 440 p.
 18. **Lazarow A., Cooperstein J.** Studies on the isolated islet tissue of fish // *Biol. Bull*. 1951. Vol. 100. No 3. P. 191-198.
 19. **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.
 20. **Ostrander G.** *The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals)*, 678 pp. Waltham, MA, USA: Academic Press Inc. 2000.

21. **Posner L.P.** Pain and distress in fish: A review of the evidence // Institute for Laboratory Animal Research Journal 50. 2009. P. 327-328.
22. **Powers D.A.** Fish as model systems. Science. New York. 246. 1989. P. 352-358.
23. **Snow P.J., Plenderlaith M.B., Wright. L.L.** Quantitative study of primary sensory neurone populations of three species of elasmobranch fish // Journal of Comparative Neurology. 334. 1993.
24. **Szkudelski T.** The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas // Physiol. Res. 2001. Vol. 50. № 6. P. 536-546.

Use of hydrobionts for modelling pathology of parenchymatous bodies

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, O.B. Baranova, O.I. Stepanova

Possibility of use the poyciloterms hydrobionts for carrying out model experiments is shown. Successful modeling of pathology of a liver and pancreas at carps, hepatopancreas crawfishes is carried out.

Key words: fishes, crawfishes, pathology modeling, parenchymatous bodies, liver, pancreas, hepatopancreas.



Стероидная регуляция нейронной возбудимости в переднем кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга у крыс линии WAG/Rij

И.И. Садртдинова, З.Р. Хисматуллина

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Контактная информация: Садртдинова Индира Илдаровна, indira-asp@yandex.ru

Работа посвящена изучению динамики судорожной активности при различных концентрациях половых стероидов с помощью электроэнцефалографического метода. Впервые в экспериментальном исследовании на животных – самках крыс линии WAG/Rij, представляющих генетическую модель генерализованной абсансной эпилепсии у человека, показано влияние женских половых гормонов в норме, при их дефиците и после проведения заместительной гормональной терапии препаратами 17 β -эстрадиол и прогестерон на количественные и качественные характеристики пик-волновых разрядов. Экспериментально установлено, что эстроген и прогестерон принимают участие в механизмах формирования пик-волновых разрядов, которые сопровождаются абсансными судорогами у самок крыс линии WAG/Rij.

Ключевые слова: абсансная эпилепсия, крысы линии WAG/Rij, электроэнцефалограмма, 17 β -эстрадиол, прогестерон, пик-волновые разряды.

Абсансная эпилепсия – генерализованная неконвульсивная форма эпилепсии. Основной ее диагностический признак – генерализованные билатерально симметричные и синхронные разряды пик-волна (3-4 Гц) на электроэнцефалограмме, регистрируемые в обоих полушариях мозга и длящиеся от 2-5 до 15-30 с (в среднем, 12 с) [14, 20, 21].

Спайковые потенциалы возникают в момент достижения мембраной нейрона некоторого критического уровня деполяризации, при котором наступает электрический «пробой» мембраны и начинается самоподдерживающийся

процесс распространения возбуждения в нервном волокне [4].

Характерными особенностями пик-волновых разрядов (*spike-wave discharges, SWD*) являются их высокая амплитуда, спонтанность, генерализованность, небольшая длительность. В экспериментах с животными было показано, что SWD возникают в кортико-таламо-кортикальной сети [4, 17, 20]. Главным же условием появления пик-волновых разрядов является повышенная возбудимость коры головного мозга [17].

В многолетних электрофизиологических и фармакологических исследова-

ниях показано, что пик-волновые разряды у крыс линии WAG/Rij состоят из элементов, характерных для SWD человека. Это свидетельствует об аналогичных проявлениях судорожной активности у данной генетической модели и у пациентов с абсанс-эпилепсией [14].

Крысы линии WAG/Rij – инбредная линия с генетически детерминированной абсансной эпилепсией, выведенная в результате скрещивания крыс линии Wistar (Wistar Albino Glaxo, Великобритания). Они являются уникальной и признанной моделью генерализованной абсансной эпилепсии [19].

В настоящее время актуальным и недостаточно исследованным является влияние половых гормонов на возникновение абсансных приступов. Получено значительное число данных, свидетельствующих о наличии у клеток головного мозга рецепторов к стероидным гормонам, в связи с чем мозг рассматривается как их орган-мишень [3, 9]. Стероидные гормоны имеют нейроактивные свойства, которые модулируют нейронную возбудимость путем нарушения ионной проницаемости мембран нейронов с последующим изменением их биоэлектрической активности, а также с помощью изменения внутриклеточного нейронального метаболизма [15, 23] и участвуют в механизмах формирования SWD у крыс линии WAG/Rij [10].

Среди структур, реагирующих на изменение гормонального фона, выделяют две наиболее важные, потенциально эпилептогенные области — миндалевидный комплекс мозга и гиппокамп [1].

В ранее проведенных нами исследованиях на крысах линии Wistar с помощью морфологических и электрофизиологических методов впервые были

выявлены стероидзависимые зоны миндалевидного комплекса мозга, включающиеся в деятельность нейроэндокринной регуляции репродуктивных процессов. В миндалевидном комплексе мозга одной из основных структур относящейся к числу элементов нейроэндокринной системы является переднее кортикальное ядро (COa). Нейросекреторные нейроны COa имеют рецепторы к половым стероидам. Их электронномикроскопические характеристики изменяются в ответ на колебания в крови уровней этих гормонов, которые происходят в эстральном цикле. Нейроны реагируют изменением своих кардиоэлектрических показателей на гонадэктомию и в динамике эстрального цикла [2], что хорошо объяснимо на основании данных о наличии у нейронов COa рецепторов к половым стероидам [24].

На основании этого, большой научный интерес представляет исследование роли COa в регуляции пик-волновой активности в норме и при экспериментально вызванном дефиците половых гормонов, а также после заместительной гормональной терапии у самок крыс линии WAG/Rij с генетической абсансной эпилепсией.

Материалы и методы

Опыты проведены на половозрелых самках инбредной линии крыс WAG/Rij, признанные генетической моделью абсансной эпилепсии, массой 200-220 г, n=48, в возрасте 6 мес., выращенных в группе по 5 особей в стандартных пластиковых клетках в условиях вивария кафедры физиологии человека и зоологии Башкирского государственного университета, характеризующихся постоянством комнатной температуры

(20-22 °С) и уровнем влажности. Еду и питье крысы получали *ad libitum*. Эксперименты выполнены в соответствии с этическими требованиями, предъявляемыми к работе с лабораторными животными.

В течение месяца ежедневно проводили исследование влагалищных мазков, которые брали строго в определенное время (12:00), и по их цитологической картине определяли стадии эстрального цикла [5]. Продолжительность цикла у самок крыс, содержащихся изолированно от самцов, в среднем, равна 4-5 дням. Так как после овариоэктомии животные находятся в хроническом диэструсе, запись ЭЭГ для контрольной группы осуществляли на стадии диэструса.

С целью регистрации суммарной электрической активности мозга крыс было произведено стереотаксическое вживление хронических электродов в переднее кортикальное ядро переднего отдела миндалевидного комплекса (в стерильных условиях). В качестве наркоза использовали хлоралгидрат (400 мг/кг внутривенно). В качестве местно-анестезирующего средства применяли новокаин 2% раствор для инъекций, подкожно. После скальпирования вживляли электроды из изолированной нихромовой проволоки с поперечным сечением 0,1 мм. Активный электрод устанавливали по стереотаксическим координатам атласа мозга крысы Паксиноса-Уотсона [22] в *COa* (AP = -1,6; LM = 3,5; H = 9,5), референтный электрод имплантировали в затылочную кость черепа над мозжечком. Для фиксации электродов использовали протакрил-М.

После периода заживления, который составлял 7-8 дней, регистрировали фо-

новую ЭЭГ в условиях свободного поведения.

Далее самки с вживленными в мозг электродами были подвергнуты двухсторонней гонадэктомии [5]. Спустя 1 мес. повторно проводили записи ЭЭГ. Заместительная терапия гонадэктомированным самкам включала в себя инъекции 17 β -эстрадиола (в дозе 10 мкг/100 г массы) один раз в сутки в течение двух дней, а затем (на третьи сутки) введение 17 β -эстрадиола с прогестероном (доза 5 мг/100 г массы). Запись ЭЭГ проводилась после двух инъекций 17 β -эстрадиола (на второй день, через 3 ч после инъекции), на третий день, через 3 ч после введения 17 β -эстрадиола с прогестероном и через пять дней.

Все записи тщательно анализировали, участки ЭЭГ, содержащие артефактные эпохи, были исключены из дальнейшего анализа. Далее проводился визуальный анализ по следующим параметрам: количество пик-волновых разрядов в единицу времени, общая длительность пик-волновых разрядов, средняя продолжительность одного *SWD*, пик-волновой индекс, выраженный в %.

Продолжительность одного *SWD* (с) – это длительность разряда от первой пик-волны до последней.

Пик-волновой индекс – это процент времени, занятый разрядами. Для расчета индекса находили сумму длительности всех пик-волновых разрядов на протяжении всего файла, за 100% принимали продолжительность файла (50 эпох по 10 с).

Количество *SWD* определяли в каждом анализируемом файле.

По окончании всех опытов до анализа ЭЭГ производили морфологический

контроль с целью проверки локализации кончика электрода в мозге крысы.

Все полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с помощью программы *Statistica 5.5*. Достоверность определяли с помощью параметрического критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты визуального анализа ЭЭГ показали, что на всех анализируемых ЭЭГ крыс линии *WAG/Rij* присутствовали спонтанные пик-волновые разряды (рис. 1).

Полученные результаты по количеству пик-волновых разрядов, продолжительности каждого комплекса и общей продолжительности по ходу всей записи (500 сек) представлены на графиках, отображающих динамику изменения пик-волновой активности на ЭЭГ.

Приведенные данные на рис. 2 показывают, что в контрольной группе среднее количество пик-волновых разрядов в *COa* составило $3,44 \pm 0,17$. После проведения операции овариоэктомии происходит их снижение – $2,00 \pm 0,15$ ($p < 0,05$).

Анализ средней продолжительности пик-волновых разрядов по ходу эксперимента показал, что продолжитель-

ность *SWD* у самок контрольной группы равняется $2,57 \pm 0,49$, у гонадэктомированных самок достоверно снижается до $1,84 \pm 0,06$ (рис. 3).

Таким, образом, после овариоэктомии происходит снижение количества *SWD* и одновременное сокращение их средней продолжительности.

Следующим этапом эксперимента было исследование воздействия эндогенных нейростероидов на пик-волновые разряды. После введения гонадэктомированным самкам эстрадиола нами не выявлено достоверных различий. Вероятно, он не оказывает влияния на количественные и качественные характеристики *SWD*, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [12, 13]. Далее мы исследовали влияние комплексного введения прогестерона с 17β -эстрадиолом на уровень пик-волновой активности. На ЭЭГ, зарегистрированных через 3 ч после инъекции, было выявлено нарастание количества и средней продолжительности пик-волновых разрядов: $4,00 \pm 0,71$ и $3,47 \pm 0,47$ соответственно. Мы предполагаем, что это связано с эффектом эндогенных нейростероидов, которые вырабатываются в ответ на стресс инъектирования. На пятый день после проведения заместительной гор-



Рис. 1. Характерные для абсансной эпилепсии пик-волновые комплексы (указаны стрелкой) из *COa* на фоновой ЭЭГ крыс. Калибровка 1с, 500 мкВ.

мональной терапии наблюдалось снижение судорожной чувствительности мозга: количество *SWD* сократилось до $1,33 \pm 0,03$ ($p < 0,05$), длительность одного комплекса в среднем составила $2,4 \pm 0,14$ (рис. 2-3). В данном случае прогестерон следует рассматривать как антиконвульсант, т.е. благоприятно воздействует на течение судорожных состояний.

После анализа полученных результатов на всех этапах эксперимента (количества пик-волновых разрядов и их средней продолжительности) представлялось интересным выяснить, сколько же времени занимают пик-волновые комплексы по ходу всей записи ЭЭГ, т.е. за 500 сек (рис. 3). Общая продолжительность пик-волновых разрядов в контрольной группе составила $9,29 \pm 0,53$. После оперативного вмешательства мы наблюдали сокращение

общей их продолжительности в записях электроэнцефалограммы, и она составила $4,52 \pm 0,69$ (при $p < 0,05$). Как уже было выше сказано, в нашем эксперименте 17β -эстрадиол был неэффективным. Инъекции 17β -эстрадиола в комбинации с прогестероном увеличивали общую продолжительность пик-волновых комплексов до $13,79 \pm 0,48$, а на пятые сутки отмечали их снижение до $3,46 \pm 0,07$ ($p < 0,05$).

Одним из основных показателей в оценке эпилептиформной активности на ЭЭГ является пик-волновой индекс: после гонадэктомии он достоверно снижался, после проведения заместительной терапии эстрадиолом достоверных различий не наблюдали. После инъекции 17β -эстрадиола с прогестероном через 3 ч он достоверно повышался, а на пятые сутки вновь понижался (результаты представлены на рис. 4).

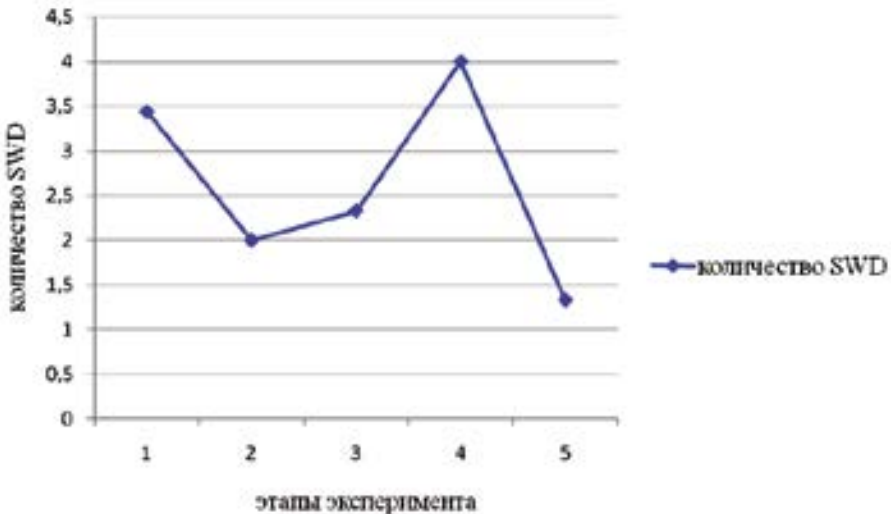


Рис. 2. Количественные характеристики *SWD* у самок крыс линии *WAG/Rij* на разных этапах эксперимента. Обозначения: 1 – контроль; 2 – гонадэктомия; 3 – 17β -эстрадиол; 4 – 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект через 3 ч после инъекции); 5 – 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект на пятые сутки после инъекции).

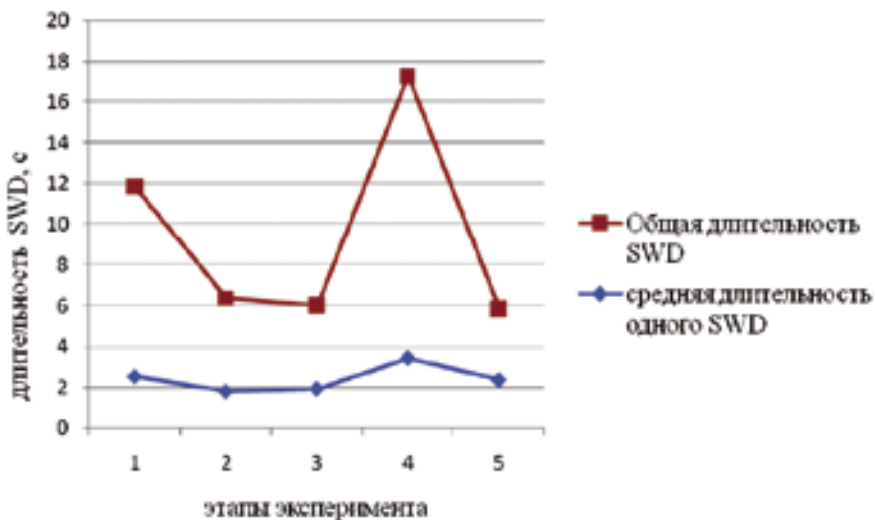


Рис. 3. Изменения средней продолжительности одного комплекса пик-волна и средней длительности всех пик-волновых разрядов по ходу всей записи ЭЭГ, т.е. за 500 с. Обозначения: 1 – контроль; 2 – гонадэктомия; 3 – 17β -эстрадиол; 4 – 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект через 3 ч после инъекции); 5 – 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект на пятые сутки после инъекции).

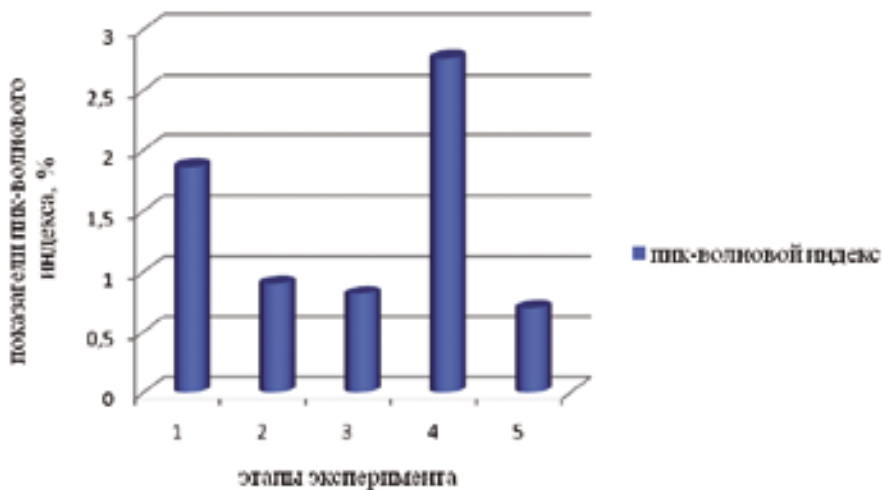


Рис. 4. Показатели пик-волнового индекса (%) у самок крыс линии WAG/Rij. Обозначения: 1 – контроль; 2 – гонадэктомия; 3 – 17β -эстрадиол; 4 – 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект через 3 ч после инъекции); 5 – 17β -эстрадиол и прогестерон (эффект на пятые сутки после инъекции).

Известно, что половые стероидные гормоны по-разному влияют на порог электросудорожной готовности мозга [7, 25]. Результаты нашего исследования демонстрируют следующее: эстрогены выступают как проконвульсанты, т.е. снижают электросудорожный порог, а прогестерон — как антиконвульсант, т.е. повышает электросудорожный порог.

Механизм противосудорожного действия прогестерона является дискуссионным, в ряде исследований получены разные эффекты его влияния. Одни авторы описывали дозозависимое повышение числа и общей продолжительности пик-волновых разрядов у самок крыс линии *WAG/Rij* при внутривентральном введении прогестерона [12, 13, 18]. В других экспериментальных исследованиях показан антиконвульсивный эффект прогестерона [8, 9, 11]. Было выявлено, что дозы прогестерона, превышающие его физиологический уровень, предохраняют экспериментальных животных от развития судорог, вызванных электрошоком [16].

Предложено несколько возможных механизмов его влияния на судорожную активность: 1) блокирование восходящей ретикулярной формации ствола головного мозга; 2) дисбаланс нейротрансмиттеров [25]. Согласно работам других авторов, одним из возможных механизмов изменения порога судорожной готовности мозга при назначении половых стероидов может быть влияние на уровень глюкозы в мозге [6, 7].

Резюмируя накопленные факты и на основании полученных нами данных по анализу суммарной ЭЭГ, которая отражает функциональную активность популяций нервных клеток, т.е. функциональное состояние головного мозга, можно сделать вывод, что колебание уровней овариальных стероидов, несомненно, играют важную роль в деятельности головного мозга, влияя на пик-волновую активность его отдельных областей при абсанс-эпилепсии, в частности переднего кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга.

Выводы

Электрофизиологическим методом в условиях свободного поведения установлено, что в *COa* у самок крыс линии *WAG/Rij*, представляющих генетическую модель генерализованной абсансной эпилепсии:

1. Овариоэктомия снижает судорожную активность, что проявляется в сокращении числа и продолжительности абсансных разрядов, а также показателей пик-волнового индекса.

2. Заместительная терапия 17 β -эстрадиолом в дозе 10 мкг/100 г массы животного в течение двух дней не влияла ни на количество, ни на продолжительность пик-волновых разрядов.

3. Заместительная терапия 17 β -эстрадиолом в комбинации с прогестероном (5 мг/100 г) через три часа после их введения вызывали достоверное повышение частоты и продолжительности *SWD*.

4. Введение 17 β -эстрадиола в комбинации с прогестероном на пятые сутки показало антиконвульсивный эффект прогестерона (снижение количества и продолжительности пик-волновых комплексов и пик-волнового индекса), т.е. десинхронизирующее влияние на биоэлектрическую активность головного мозга.

Список литературы

1. *Авякан Г.Н., Олейникова О.М., Неробкова Л.Н. и др.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. 2002. № 3. С. 37-42.
2. *Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б.* Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. - М.: Наука. 1993. 269 с.
3. *Бабичев В.Н.* Нейроэндокринный эффект половых гормонов // Успехи

- физиологических наук. 2005. Т. 36. № 1. С. 54-67.
4. **Зенков Л.Р.** Клиническая электроэнцефалография (с элементами эпилептологии). Руководство для врачей. 3-е изд. - М.: МЕДпрессинформ. 2004. 368 с.
 5. **Кабак Я.М.** Практикум по эндокринологии. - М.: Изд-во МГУ. 1968. 275 с.
 6. **Карлов В.А., Власов П.Н.** Клинические, электроэнцефалографические, гормональные особенности и терапия катамениальных эпилептических припадков // Неврологический журнал. 1997. № 4. С. 19-23.
 7. **Крыжановский Г.Н., Глебов Р.Н.** Гормоны и эпилептическая активность. Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1984. Т. 84. Вып. 6. С. 930-937.
 8. **Лекомцева Е.В.** Патогенетические механизмы участия гиппокампальной формации и стриарного комплекса при нарушениях центральной нейроэндокринной регуляции // Український медичний часопис. 2006. № 2. С. 57-64.
 9. **Меньшикова Н.С., Серова О.Ф., Власов П.Н.** Особенности функции яичников у больных эпилепсией // Российский вестник акушера-гинеколога. 2007. № 4. С. 40-44.
 10. **Толмачева Е.А.** Роль половых стероидов в регуляции спайк-волновой активности у крыс линии WAG/RIJ: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. - М. 2006. 24 с.
 11. **Филатова Ю.Б., Воронина Т.А., Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Ридер Ф.К., Клодт П.М., Кудрин В.С., Авакян Г.Г., Гайдуков И.А.** Изменение содержания тормозных и возбуждающих аминокислот и эпилептической активности в структурах мозга самок крыс с кобальтовой эпилепсией в зависимости от фазы эстрального цикла // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2012. № 1. С. 29-33.
 12. **Чепурнов С.А., Чепурнова Е.А., Толмачева Е.А. и др.** Беременность крыс линии WAG/Rij – изменения уровней прогестерона и эстрадиола и генерализованной абсансной эпилепсии // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 88. № 6. С. 741-750.
 13. **Bazyan A.S., Luijtelaaar G.** Neurochemical and behavioral features in genetic absence epilepsy and in acutely induced absence seizures // Neurology. 2013; 48 pp.
 14. **Coenen A.M., Van Luijtelaaar E.L.** Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. Behav Genet 2003;33(6):635-655.
 - Herzog A.G.** Disorders of reproduction in patients with epilepsy: primary neurological mechanisms. Seizure 2008;17(2):101-110.
 15. **Hopkins A.** Epilepsy. London: Chapman & Hall Medical. 1987. 585 p.
 16. **Kostopoulos G.K.** Spike-and-wave discharges as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. Clin. Neurophysiol. 2000;111 (Suppl 2):527-538.
 17. **Luijtelaaar G., van, Budziszewska B., Jaworska-Feil L., Ellis J., Coenen A., Lason W.** The ovarian hormones and absence epilepsy: a long-term EEG study and pharmacological effects in a genetic absence epilepsy model. Epilepsy research 2001;46(3):225-239.
 18. **Luijtelaaar E.J.L.M., van Coenen A.M.L.** Two types of electrocortical

- paroxysms in an inbred strain of rats. *Neurosci. Lett.* 1986; 70:393-397.
19. *Meeren H.K., van Luijtelaar E.L., Lopes da Silva F.H., Berdiev R.K., Chepurnova N.E., Chepurnov S.A. & Coenen A.M.* The cortico-thalamic theory for generalised spike-wave discharges. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* 2004;35(1):3-19.
20. *Panayiotopoulos C.P.* Typical absence seizures and related epileptic syndromes: assessment of current state and directions of future research. *Epilepsia* 2008. 49(12): 2131-2139.
21. *Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney. Academic Press. 1998.
22. *Pierson R.C., Lyons A.M., Greenfield L.J. Jr.* Gonadal steroids regulate GABAA receptor subunit mRNA expression in NT2-N neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005. 138(2):105-115.
23. *Vreeburg J.T.M., Schretlen P.J.M., Baum M.J.* Specific, high-affinity binding of 17 β -estradiol in cytosols from several brain region and pituitary of intact and castrated adult male rats. *Endocrinology* 1975; 97(4): 969-977.
24. *Wang Q.* The roles of estrogen and progesterin in epileptogenesis and their mechanisms of action. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 2000; 31(3): 231-233.

Steroid regulation of neuronal excitability in the anterior cortical nucleus of the brain's amygdala in WAG/Rij rats

I.I. Sadrtdinova, Z.R. Khismatullina

The present paper studies the seizure activity dynamics at different concentrations of sex steroids using electroencephalographic method. For the first time the experimental animal study shows the influence of normal level of female sex hormones with their deficit and after hormone replacement therapy with 17 β -estradiol and progesterone on the quantitative and qualitative characteristics of spike-wave discharges. The animals being observed are WAG/Rij female rats representing a genetic model of generalized absence epilepsy in humans. It has been experimentally established that estrogen and progesterone are involved in the spike-wave discharges formation mechanisms accompanied with absence seizures in WAG/Rij female rats.

Key words: absence epilepsy, WAG/Rij rats, electroencephalogram, 17 β -estradiol, progesterone, spike-wave discharges.



Взаимовлияния микроэлементов в печени лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении

А.О. Ревякин¹, Н.Н. Каркищенко¹, Е.Б. Шустов¹, В.Н. Каркищенко¹,
Д.А. Ксенофонов²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, ar_info@mail.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 - 4].

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 фармакологических 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 гранулированный полнорационный 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.

Полнорационный 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 содержание металлов методом атомно-абсорбционной спектрометрии [5] (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 совмест-

Таблица 1.

Статистические характеристики содержания металлов в тканях печени крыс при нормальном и избыточном его пищевом потреблении.

| Статистический параметр | Ca | Cu | Mn | Fe | Mg | Zn |
|--|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Среднее | 2,51 | 1,50 | 0,53 | 104,6 | 6,49 | 3,89 |
| Стандартная ошибка | 0,10 | 0,09 | 0,02 | 3,6 | 0,14 | 0,16 |
| Медиана | 2,48 | 1,37 | 0,54 | 105,8 | 6,45 | 3,92 |
| Мода | 2,10 | 1,30 | 0,53 | 129,0 | 5,34 | 5,30 |
| Стандартное отклонение | 0,54 | 0,50 | 0,08 | 19,8 | 0,78 | 0,88 |
| Дисперсия выборки | 0,30 | 0,25 | 0,01 | 395,1 | 0,60 | 0,78 |
| Экссесс | 0,024 | 2,446 | -0,545 | -0,573 | -0,589 | -1,203 |
| Асимметричность | 0,307 | 1,602 | -0,164 | -0,378 | 0,266 | 0,134 |
| Интервал | 2,25 | 2,01 | 0,30 | 74,7 | 2,8 | 3,2 |
| Минимум | 1,51 | 0,91 | 0,38 | 58,6 | 5,3 | 2,4 |
| Максимум | 3,76 | 2,92 | 0,68 | 133,3 | 8,1 | 5,6 |
| Коэффициент вариации. | 0,22 | 0,33 | 0,15 | 0,18 | 0,12 | 0,22 |
| Счет | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Нижняя граница среднего уровня, мг/100 г ткани | 2,0 | 1,1 | 0,45 | 85,0 | 6,0 | 2,9 |
| Нижняя граница верхнего уровня | 3,0 | 2,0 | 0,60 | 125,0 | 7,2 | 4,9 |

ной инкубации при комнатной температуре 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 печени лабораторных животных.

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

Анализ таблицы 1 показывает, что основная масса металлов (за исключением меди и цинка) имеет характер распределения содержания в печени близкий, к кривой нормального распределения (близкие значения средней величины, медианы и моды распре-

Таблица 2.

Влияние уровня металла в тканях печени животных на содержание других металлов в печени

| Металл независимый | Металл зависимый | Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания независимого металла в печени | | | Кoeffици- ент детер- минации модели, D | Уровень значи- мо- сти, p |
|--------------------|------------------|--|---------|---------|---|------------------------------------|
| | | низкий | средний | высокий | | |
| Кальций | Медь | 1,30 | 1,51 | 1,59 | 0,03 | 0,68 |
| | Марганец | 0,44 | 0,56 | 0,52 | 0,26 | 0,02 |
| | Железо | 100 | 104 | 112 | 0,03 | 0,67 |
| | Магний | 7,17 | 6,34 | 6,63 | 0,14 | 0,14 |
| | Цинк | 3,45 | 4,03 | 3,68 | 0,06 | 0,42 |
| Медь | Кальций | 2,72 | 2,41 | 2,81 | 0,09 | 0,29 |
| | Марганец | 0,57 | 0,53 | 0,53 | 0,03 | 0,66 |
| | Железо | 106 | 104 | 109 | 0,01 | 0,91 |
| | Магний | 6,29 | 6,57 | 6,41 | 0,02 | 0,74 |
| | Цинк | 4,27 | 3,92 | 2,97 | 0,15 | 0,11 |
| Марганец | Кальций | 1,71 | 2,75 | 2,31 | 0,45 | 0,0003 |
| | Медь | 1,37 | 1,60 | 1,31 | 0,07 | 0,38 |
| | Железо | 109 | 103 | 109 | 0,02 | 0,75 |
| | Магний | 7,58 | 6,36 | 6,24 | 0,31 | 0,007 |
| | Цинк | 2,92 | 3,84 | 4,61 | 0,32 | 0,005 |
| Железо | Кальций | 2,36 | 2,49 | 2,72 | 0,04 | 0,53 |
| | Медь | 1,18 | 1,65 | 1,36 | 0,16 | 0,09 |
| | Марганец | 0,57 | 0,51 | 0,60 | 0,24 | 0,02 |
| | Магний | 5,63 | 6,74 | 6,62 | 0,30 | 0,006 |
| | Цинк | 4,36 | 3,58 | 4,38 | 0,20 | 0,06 |
| Магний | Кальций | 2,23 | 2,74 | 2,18 | 0,24 | 0,03 |
| | Медь | 1,24 | 1,61 | 1,44 | 0,08 | 0,32 |
| | Марганец | 0,57 | 0,56 | 0,43 | 0,43 | 0,0005 |
| | Железо | 83 | 110 | 114 | 0,37 | 0,002 |
| | Цинк | 4,57 | 3,90 | 3,08 | 0,31 | 0,007 |
| Цинк | Кальций | 2,47 | 2,57 | 2,22 | 0,05 | 0,51 |
| | Медь | 2,27 | 1,40 | 1,28 | 0,38 | 0,002 |
| | Марганец | 0,51 | 0,54 | 0,58 | 0,05 | 0,47 |
| | Железо | 101 | 109 | 87 | 0,14 | 0,13 |
| | Магний | 6,63 | 6,61 | 5,72 | 0,16 | 0,09 |

ления, не высокие значения параметров «эксцесс» и «асимметрия»), и, следовательно, в отношении содержания в печени кальция, марганца, железа и магния не выявляются значимые внешние факторы воздействия. На распределение же значений содержания меди и цинка имеются влияния каких-либо внешних факторов (таблица 2).

Анализ таблицы 2 показывает, что уровень кальция в печени оказывает достоверное влияние на уровень марганца в печени (низкому уровню кальция соответствует и низкий уровень марганца, среднему и высокому уровню кальция соответствует средний уровень марганца, коэффициент детерминации модели 0,26, $p=0,02$). Такое взаимоотношение может объяснено, если синтез тканевых структур, с которыми связывается в печени марганец, зависит от кальция.

Существует и обратная взаимосвязь: уровень марганца оказывает аналогичное достоверное и еще более выраженное влияние на содержание кальция в печени (низкому уровню марганца соответствует и низкое значение кальция, средним и высоким значениям уровня марганца в печени соответствуют средние значения уровня кальция, коэффициент детерминации модели 0,45, $p=0,0003$).

Для меди не было выявлено никакого влияния на содержание исследованных металлов в печени.

Между содержанием марганца и магния в печени выявлены конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции между значениями $r=-0,53$): низкому содержанию марганца соответствуют высокие значения содержания магния, и увеличение содержания марганца в печени ведет к снижению содержания в ней магния (коэффициент де-

терминации модели 0,31, $p=0,007$). Эта конкуренция проявляется и в обратном направлении – высокому содержанию магния в крови соответствует более низкий уровень марганца (коэффициент детерминации модели 0,43, $p=0,0005$). На основании таких взаимосвязей можно предположить, что в печени марганец и магний конкурируют за места связывания в тканевом депо, причем белки-носители этого тканевого депо более афинны к магнию (при низком уровне марганца преобладает связывание с магнием, при среднем уровне содержания марганца наблюдается примерно равнозначная оккупация сайтов связывания обоими металлами, а высокий уровень магния в печени ведет к вытеснению марганца из депо).

Марганец оказывает влияние на содержание цинка в печени (коэффициент корреляции между значениями $r=+0,64$) – чем выше концентрация марганца, тем выше и концентрация цинка (коэффициент детерминации модели 0,32, $p=0,005$).

Для железа установлено умеренное влияние на содержание меди, марганца, магния и цинка. Более отчетливо оно проявляется в отношении магния (коэффициент корреляции между значениями $r=+0,57$): низкому уровню железа соответствует и более низкий уровень магния в печени, среднему и высокому значению содержания железа в печени соответствует умеренно повышенное содержание магния в печени (коэффициент детерминации модели 0,30, $p=0,006$).

Можно предположить, что при более низких значениях железа в печени нарушается формирование тканевого депо магния, а при увеличении содержания железа тканевое депо магния в

печени функционирует полноценно. В то же время существует и аналогичное обратное влияние магния на содержание железа в печени (при низком уровне магния депо в печени для железа не способно его кумулировать на среднем уровне концентраций).

Особый интерес могут представлять данные о конкурентных взаимоотношениях на уровне печеночных тканевых депо между магнием и цинком (коэффициент корреляции между значениями $r=-0,52$). Низкому уровню содержания магния в крови соответствует высокое содержание цинка, при увеличении содержания магния в печени содержание цинка в ней достоверно снижается (коэффициент детерминации модели 0,31, $p=0,007$). В то же время, высокое содержание цинка в печени сопровождается вытеснением магния из этого тканевого депо (коэффициент детерминации модели 0,16, $p=0,09$).

Аффинитет печеночного тканевого депо к цинку более высокий (насыщение происходит при более низких концентрациях металла), но степень связи

у магния более прочная (вытеснение магния из депо происходит только на высоких уровнях концентрации цинка в печени).

В свою очередь цинк оказывает конкурентное влияние на содержание меди в печени (при низких значениях цинка содержание меди в печени более высокое, увеличение концентрации цинка до среднего уровня сопровождается понижением содержания меди также до среднего уровня, дальнейшее повышение уровня цинка в печени способствует вытеснению меди из тканевого депо (коэффициент корреляции между значениями этих показателей $r=-0,52$, коэффициент детерминации модели 0,37, $p=0,002$).

Для оценки интегрального влияния металлов на их содержание в печени были рассчитаны два индекса – индекс влияния и индекс зависимости, которые определялись как среднеквадратичное значение соответствующих коэффициентов детерминации при факторном анализе возможного влияния металлов друг на друга. Полученные индексы отражены на рис. 1.

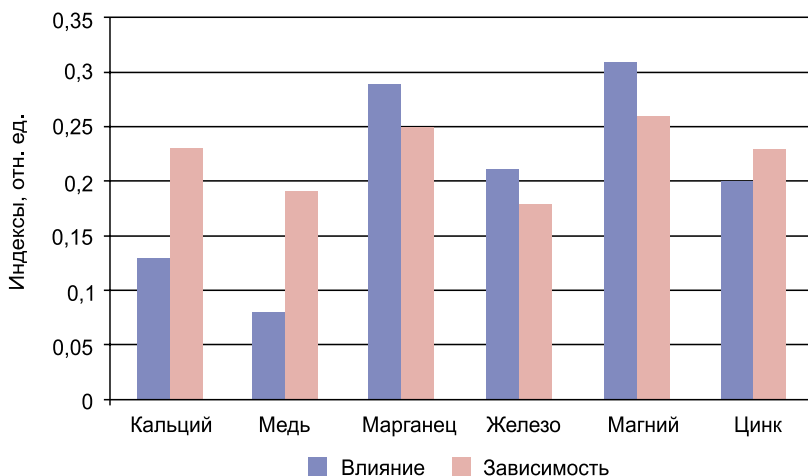


Рис. 1. Интегральная оценка влияния и зависимости металлов друг от друга в печени крыс

Анализ рисунка 1 показывает, что меньше всего влияют на концентрацию в печени других металлов медь и кальций (их возможное влияние находится в диапазоне до 15% всей вариативности содержания других металлов в печени). Средняя степень влияния имеют железо и цинк (их возможное влияние находится в диапазоне 20-25% всей вариативности содержания других металлов в печени). Наиболее выраженное влияние на содержание других металлов в печени оказывают магний и марганец (29-31% вариативности).

В то же время зависимость металлов от содержания в печени других металлов может быть отнесена как средняя (для всех металлов индекс зависимости находится в диапазоне 0,18-0,26 отн.ед). Чуть более зависимыми можно считать уровни магния и марганца в печени. Интересно, что эти же металлы являются и наиболее влияющими на другие металлы в печени.

В обобщенном виде взаимовлияния металлов на их содержание в печени представлены на рис. 2.

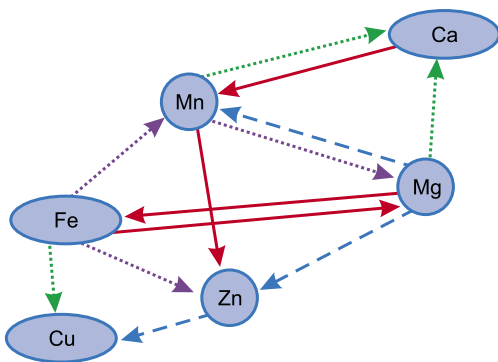


Рис. 2. Граф взаимовлияний металлов на их содержание в печени. Обозначения: непрерывная красная линия – влияние по типу усиления, синяя пунктирная линия – влияние по типу конкуренции, зеленая точечная линия – «куполообразный» тип влияния, фиолетовая точечная линия – «чашеобразный» тип влияния.

ВЫВОДЫ:

Статистический анализ характеристик значений содержания металлов в крови животных при нормальном или избыточном их пищевом потреблении показал, что для кальция, марганца, железа и магния распределение значений соответствует распределению случайной величины (они не испытывают дополнительного влияния каких-либо внешних факторов). Наибольшее влияние внешних факторов характерно для содержания меди и цинка в крови. Низкая вариативность показателей содержания в крови магния, железа и марганца отражает существование жестких механизмов их гомеостатического регулирования.

Между содержанием марганца в печени и уровнем магния в этой ткани существуют конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции $r = -0,53$), которые могут быть объяснены конкуренцией веществ за места связывания в белках тканевых депо при доминирующей роли в этой паре магния. Аналогичные конкурентные взаимоотношения выявлены в парах магний-цинк и цинк-медь. При этом аффинитет печеночного тканевого депо к цинку более высокий (насыщение происходит при более низких концентрациях металла), но степень связи у магния более прочная (вытеснение магния из депо происходит только на высоких уровнях концентрации цинка в печени). Повышение уровня цинка в печени способствует вытеснению меди из тканевого депо.

Выявлено влияние марганца на содержание цинка в печени, что может быть связано с его влиянием на синтез цинк-связывающих белков.

Взаимодействие железа с другими металлами в тканях печени носит сложный, не линейный характер, что необходимо учитывать при применении препаратов железа в клинической практике.

Для меди не было выявлено никакого влияния на содержание исследованных металлов в печени.

ЛИТЕРАТУРА

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., Ксенофонтов 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., Ксенофонтов 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. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонтов Д.А., Касинская Н.В. Взаимовлияния микроэлементов в крови лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении // Биомедицина, 2014. - №1. – С. 61-66.
5. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ. Л.: Химия, 1983. – 144с.

Interferences of trace elements in liver of laboratory animals at normal and excess food consumption

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

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

Key words: metallochelates, trace elements, quantity of trace elements in liver, nuclear and absorbing spectrometry.

Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей

Сообщение 2: Исследование последствий острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей

Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко

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

Контактная информация: к.б.н. Семенов Хызыр Хысаевич, scbmt@yandex.ru

Работа посвящена исследованию последствий влияния острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки лабораторных крыс и мышей. В эксперименте были использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии НУ/У, выведенные и поддерживаемые в НЦБМТ ФМБА России, и мыши линии С57ВL/6У, поддерживаемые также в нашем Центре. Виргинных самок крыс и мышей на 9-16 дни постгипоксического периода спаривали с интактными самцами, чтобы выявить последствия влияния общей гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки. Учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводили, вскрывая самок на 19-20 дни беременности. Установлено, что при общей смертности эмбрионов в постимплантационном периоде развития в 39,1% у самок крыс и в 38,7% у самок мышей доля смертности эмбрионов, обусловленная влиянием острой гипоксии, составила 32,89% и 31,76% соответственно. Потери из числа овулировавшихся яйцеклеток на доимплантационной стадии у самок в опыте составили у крыс 14,3%, у мышей – 26,7%. Таким образом, суммарные потери под влиянием острой гипоксии на репродуктивные клетки самок крыс были равны 47,16%, у самок мышей – 58,45%. Следует также отметить, что 6 самок крыс и 4 самки мышей в опыте «прохолостились», т.е. при вскрытии у них не обнаружено ни одного имплантанта вообще, в то время как у контрольных животных обоих видов не выявлено ни одного случая их отсутствия. Объясняется это, видимо, воздействием гипоксии на самку в период ее особо чувствительной стадии овогенеза, что, вероятно, находит подтверждение в широком размахе величины этого показателя изменчивости от 0 до 100% у самок опытных групп (рис. А-Е).

Ключевые слова: острая гипобарическая гипоксия, женские репродуктивные клетки, эмбриональная смертность.

Период дифференциации мужских и женских генеративных клеток протекает постоянно. Знание длительности отдельных стадий сперматогенеза и овогенеза позволяет оценить чувствительность клеток на каждой стадии. При этом используется метод доминантных леталей (ДЛ), что обозначает наследственные изменения в половых клетках

родительских особей, которые вызывают смерть потомков первого поколения во время эмбрионального развития. ДЛ приводят к увеличению эмбриональной смертности и, соответственно, снижению выживаемости эмбрионов и плодовитости самок. ДЛ могут быть индуцированы как в мужских, так и в женских репродуктивных клетках, и в каждый

конкретный момент при обработке животного мутаген воздействует на клетки, находящиеся на разных стадиях сперматогенеза. После однократного мутагенного воздействия самца спаривают с интактными самками и затем исследуют эмбриональную смертность. Изменение эмбриональной смертности будет отражать чувствительность клеток на каждой стадии сперматогенеза [1]. Таким образом, было экспериментально установлено, что наиболее чувствительны репродуктивные клетки у мышей на второй неделе (поздние сперматиды) сперматогенеза. Ранее, исследуя частоты ДЛ, индуцированных тиофосфамидом в половых клетках самцов крыс, нами было установлено, что наибольшей чувствительностью обладают поздние и средние сперматиды (вторая и третья недели) [3]. Исходя из изложенного и учитывая, что процессы сперматогенеза и овогенеза у мелких грызунов (мышей и крыс) протекают одинаково, и по причине отсутствия аналогичных исследований у самок крыс и мышей мы ставили **целью** своей работы изучить влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки у самок крыс и мышей на второй и начале третьей недели постгипоксического периода.

Материалы и методы

Эксперимент был проведен на крысах низкоустойчивой к гипоксии линии (НУ/У), выведенных и поддерживаемых в НЦБМТ ФМБА России, а также на мышях линии C57BL/6Y, поддерживаемых в нашем Центре. В опыте и в контроле были использованы половозрелые животные обоих видов, которые содержались в конвенциональных условиях, в пластмассовых клетках Т2 с автопилка-

ми и получали гранулированный комбикорм фирмы «Лабораторкорм» *ad libitum*. Дополнительно к нему еженедельно им выдавали белково-витаминную подкормку (состав: овсянка, сухое молоко, витамины А, Д, Е в масле). Для исследования последствий влияния острой гипобарической гипоксии виргинных самок крыс и мышей подвергали воздействию гипоксии. На 9-16 дни постгипоксического периода самок подсаживали к интактным самцам на ночь (в соотношении 1:1 у крыс и 2:1 у мышей), чтобы зафиксировать точный срок беременности. Утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс и влагалищных пробок у самок мышей отбирали и вели отсчет срока беременности. Для учета эмбриональной смертности в утробном периоде развития самок крыс вскрывали на 20-й день, самок мышей – на 19-й день беременности. В эмбриологический анализ не были включены 6 самок крыс и 4 самки мышей из-за полного отсутствия имплантантов. Таким образом, было исследовано по 60 самок крыс и мышей в опыте и по 50 в контроле.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством

по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [4]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии Центра. Исследования направлены на изучение последствий влияния острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей.

Моделирование острой гипобарической гипоксии для самок крыс осуществляли в барокамере при разрежении атмосферы в 145 мм рт. ст., что соответствует высоте 11500 м над уровнем моря. Подъем на «высоту» длился 1 мин. У низкоустойчивых животных время жизни на «высоте» не превышает 60 сек., что, естественно, не может являться значимой мерой воздействия, способной оказать существенное влияние на репродуктивные клетки. Поэтому после подъема самки на критическую «высоту» и с момента, когда она начинала биться в

агонии, во избежание ее гибели, «опускали» до предельной для нее «высоты» — 9000-9500 м и продолжали подвергать гипоксии, которая длилась 8-10 мин.

Что касается воздействия острой гипобарической гипоксии на самок мышей, то оно отличалось от крыс только тем, что «высота» подъема для них не превышала 8000 м.

Результаты и их обсуждение

В настоящем эксперименте виргинных самок крыс и мышей подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии и на 9-16 дни постгипоксического периода спаривали с интактными самцами, чтобы изучить последствия влияния гипоксии на женские репродуктивные клетки. Для учета эмбриональной смертности в утробном периоде развития самок вскрывали на 19-20 дни беременности. Результаты проведенного эмбриологического анализа представлены в таблице.

Таблица

Последствия влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самок крыс и мышей

| Показатель | Крысы | | Мыши | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Опыт | Контроль | Опыт | Контроль |
| Число самок | 60 | 50 | 60 | 50 |
| Число мест имплантации | 497 | 483 | 341 | 387 |
| Среднее число эмбрионов на 1 самку (M±m) | 8,42±0,39 | 9,66±0,27 | 6,32±0,27 | 7,74±0,18 |
| Коэффициент вариации | 35,7 | 19,82 | 31,05 | 16,30 |
| Число живых эмбрионов (всего) | 303 | 453 | 209 | 360 |
| Среднее число живых эмбрионов (M±m) | 5,12±0,35 | 9,06±0,27 | 3,87±0,35 | 7,20±0,18 |
| Коэффициент вариации | 51,4 | 20,76 | 65,79 | 17,57 |
| Мертвых эмбрионов, | | | | |
| всего (число) | 194 | 30 | 132 | 27 |
| % к общему числу | 39,1 | 6,21 | 38,71 | 6,98 |
| в том числе погибло от гипоксии | | | | |
| число | 163 | - | 108 | - |
| % от общего числа имплантов | 32,89 | - | 31,67 | - |

Согласно полученным экспериментальным данным, среднее число всех имплантатов на 1 самку крыс составило в опыте $8,42 \pm 0,39$, в контроле – $9,66 \pm 0,27$; у мышей – соответственно, $6,32 \pm 0,27$ и $7,74 \pm 0,18$. Из этого следует, что потери до имплантации у крыс равнялись 14,3%, у мышей – 26,7%. Для сравнения приведем аналогичные данные, полученные в нашем предыдущем сообщении [2], где самки обоих видов до спаривания с самцами не подвергались воздействию гипоксии, т.е. в опыте и контроле находились в идентичных условиях. Как показали результаты анализа, среднее число живых и мертвых эмбрионов на самку у крыс опыте и контроле составило $8,57 \pm 0,021$ и $8,60 \pm 0,17$; у самок мышей – соответственно, $7,45 \pm 0,19$ и $7,44 \pm 0,20$.

Равные показатели по числу имплантатов на самку в опыте и контроле у обоих видов животных свидетельствуют об отсутствии у них доимплантационных потерь. Значительные потери до имплантации в настоящем эксперименте, видимо, были вызваны либо овуляцией аномальных яйцеклеток, не способных к оплодотворению, либо уже будучи оплодотворенными, в силу каких-то причин прекратившими дальнейшее развитие. В любом варианте, без сомнения, они обусловлены влиянием острой гипоксии. Кроме того, согласно полученным в эксперименте данным, смертность эмбрионов в постимплантационном периоде развития у самок крыс опытной группы, в целом, составила 39,1%, у самок контрольной группы (спонтанная эмбриональная смертность) – 6,21%. Аналогичные показатели у мышей равнялись 38,79% и 6,98% соответственно. Следовательно, правомерно полагать, что разница по уровню эмбриональной смертности на

постимплантационной стадии развития у самок опытных и контрольных групп обоих видов была обусловлена влиянием гипоксии. У крыс опытной группы она составила 32,89%; у мышей – 31,75%. Таким образом, суммарная эмбриональная смертность, вызванная воздействием острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки, у самок крыс была равна 47,16%; у самок мышей – 58,45%.

Вместе с тем, необходимо указать, что у 6 самок крыс и у 4 самок мышей в опытных группах при вскрытии не обнаружено имплантатов вообще (рис.). По этой причине они не могли быть включены в таблицу результатов вскрытия. У самок контрольных групп обоих видов не выявлено ни одного случая их отсутствия. Полученные данные позволяют утверждать, что эффект гипоксии определяется, главным образом, стадией овогенеза у самки в момент ее воздействия. Если самка подвергалась воздействию острой гипобарической гипоксии в наиболее чувствительную стадию овогенеза, то эффект ее влияния будет максимальным и наоборот (рис. А-Е). На иные причины, способные вызывать столь высокие колебания числа имплантатов у самок, едва ли можно сослаться у высокоинбредных животных, каковыми являются исследуемые виды.

Выводы

Проведенные исследования убедительно показали существенное влияние острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки у лабораторных крыс и мышей, вызывая высокую эмбриональную смертность на постимплантационной стадии развития. Уровень смертности эмбрио-

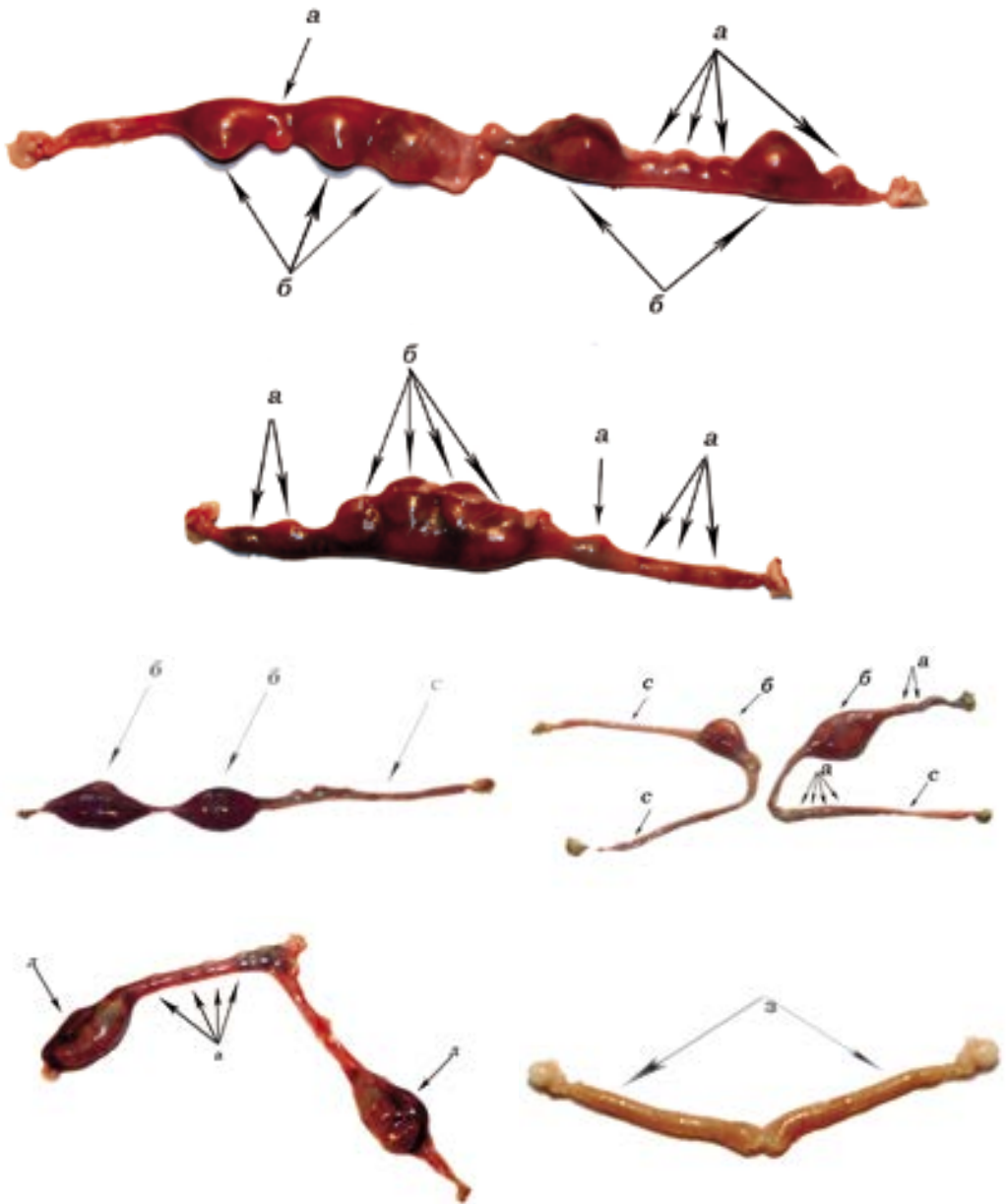


Рис. Матки самок крыс, подверженных острой гипобарической гипоксии, вскрытых на 20-й день беременности, на которых хорошо видно, что остановка эмбрионов в развитии происходит в наиболее уязвимые периоды эмбриогенеза:

- а – период имплантации – 4-6-й день развития, едва заметны децидуамы;
- б – период раннего органогенеза – 10-14-й день развития;
- в – отсутствие имплантантов – «остановка» в развитии на доимплантационной стадии;
- г – эмбрионы, пережившие гипоксию.

нов после имплантации под влиянием острой гипоксии у крыс составил 32,89%, у мышей – 31,75%. Доля потерь на доимплантационной стадии у самок опытных групп составила: у крыс – 14,3%, у мышей – 26,7%. Таким образом, суммарные потери, обусловленные влиянием острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки, составили: у крыс 47,18%, у мышей – 58,45%. При этом следует также указать на высокую изменчивость уровня эмбриональной смертности на постимплантационной стадии развития у животных опытных групп обоих видов.

Список литературы

1. **Малашенко А.М., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б.** Определение мутагенной активности химических соединений с использованием лабораторных мышей. Методические рекомендации. - М. 1985.
2. **Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Матвеев Е.Л., Капанадзе Г.Д.** Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. Сообщение 1: Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза на жизнеспособность эмбрионов у самок крыс и мышей // Биомедицина. № 3. 2012. С. 73-78.
3. **Семенов Х.Х., Уолкер Д.** Индукция доминантных леталей в половых клетках самцов крыс тиофосфамидом // Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции. - М. 1987. Часть I. 124 с.
4. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.

Influence of acute hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice

Message 2: research of consequences of acute hypobaric hypoxia on female gametes of rats and mice

Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko

Work is devoted to research of consequences of influence of acute hypobaric hypoxia on female gametes of rats and mice. In experiment the rats of the strain HY/Y low-steady against a hypoxia removed and supported in SCBMT and a mouse strain C57BL/6Y, supported also in our Center were used. Virgin females of rats and mice for 9-16 days of the post-hypoxemic period coupled to intact males to reveal consequences of influence of the general hypobaric hypoxia on female gametes. The accounting of embryonic mortality in the uterine period of development carried out, opening females for 19-20 days of pregnancy. As a result of the conducted research the following is established. At the general mortality of embryos in the post-implantation period of development in 39,1% at females of rats and – 38,73% at females of mice, the share of mortality of the embryos, caused by influence of a sharp hypoxia, made at them 32,89% and 31,76%, respectively. Losses from among ovulated ova at a preimplantation stage at females in experience made at rats 14,3%, at mice – 26,7%. Thus, under the influence of acute hypoxia on females gametes of rats females of mice had total losses equal 47,16%, – 58,45%. It should be noted also that 6 females of rats and 4 females of mice in experience had no any implant in general. While at control animals of both types it isn't revealed any case of their absence. It is explained, apparently, by that it, was caused by impact of a hypoxia on a female in the period of her especially sensitive stage of an ovogenesis that probably finds confirmation in wide scope of a variation of size of this indicator at females of skilled groups.

Key words: acute hypobaric hypoxia, female gametes, embryonic mortality.

Особенности вегетативной регуляции сердечной деятельности у мини-свиней

Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе, В.Н. Каркищенко, Н.В. Станкова,
А.Е. Ким, С.Г. Полещук

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

Контактная информация: д.м.н., проф. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Проведено изучение основных параметров ритмографического исследования сердечной деятельности мини-свиней в обычных условиях пребывания в виварии и в условиях стресс-индуцированной тахикардии физической нагрузки и его математического анализа, а также применения непрямого холиномиметика галантамина и холинолитика метацина. Показано, что вегетативная регуляция работы сердца в условиях стресс-индуцированной тахикардии и фармакологического воздействия принципиально не отличается от аналогичной перестройки у людей, что позволяет считать мини-свиней адекватной биологической моделью для оценки влияния фармакологических средств на вегетативную нервную систему при проведении различных модельных исследований кратковременных патологических процессов.

Ключевые слова: ЭКГ, мини-свиньи, стресс-индуцированная тахикардия, биологические модели, ритмограмма, спектрограмма, скаттерграмма, вегетативная регуляция.

В ходе ранее выполненных исследований [4] мы обратили внимание, что, во-первых, в состоянии относительного покоя ЭКГ мини-свиней демонстрирует преобладание парасимпатической системы (по влиянию на водители ритма и проводящую систему сердца) и, во-вторых, адекватно реагирует на стрессовую симпатическую стимуляцию сердечной деятельности. Возникло предположение, что механизмы вегетативной регуляции сердечной деятельности у мини-свиней могут быть близкими к таковым у человека, и, следовательно, мини-свиньи могут выступать в качестве адекватной биологической модели для исследования вегетотропных фармакологических средств.

Для человека одним из основных методов детального изучения вегетативной регуляции деятельности сердца

является вариационное ритмографическое исследование с последующей математической обработкой (спектральный анализ ритма сердца методом Фурье-преобразований, анализ временных последовательностей по методологии управляемого хаоса и т.д.) [1-3, 5]. Однако на мини-свиньях особенности их вегетативной регуляции практически не изучены, а методика вариационной ритмографии ранее не применялась.

Материалы и методы

Исследование было проведено в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» в соответствии с нормативной документацией. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией Центра.

Эксперименты выполнялись на самцах лабораторных светлогорских мини-свиней в количестве 59 голов, масса животных перед началом эксперимента составляла $16,0 \pm 1,5$ кг. Животных содержали в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». Животные содержались в стационарных клетках, индивидуально. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для свиней ПК 58. Водопроводная очищенная вода давалась в поилках *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22 °С и относительная влажность воздуха 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное, 12-часовой световой цикл.

ЭКГ у мини-свиней регистрировалось в отведениях от конечностей, так как из-за анатомических особенностей грудной клетки животных зарегистрировать у них ЭКГ в грудных отведениях практически невозможно (крайне низкий вольтаж зубцов). Для ритмографического исследования использован аппаратный комплекс «ВНС-Микро» производства компании Нейрософт (Россия, Иваново). Продолжительность непрерывной записи ЭКГ составляла не менее 5 мин.

В исследовании анализировались особенности ЭКГ 26 мини-свиней, записанных в положении стоя при обычном пребывании в манипуляционном блоке вивария. Для мини-свиней сама процедура перевода в манипуляционный блок и накладывание электродов является стрессом, поэтому записан-

ные ЭКГ не характеризуют состояние покоя у животных и не могут быть прямо экстраполированы на ЭКГ человека в состоянии покоя лежа, обычно используемые в клинической практике. Для человека в обычных условиях жизни и профессиональной деятельности также характерна определенная мобилизация регуляторных систем, в том числе и стресс-реализующих, поэтому фоновые (в обычных условиях) записи ЭКГ мини-свиней вполне могут быть соотнесены с характеристиками ЭКГ человека в процессе активного дневного бодрствования.

Результаты и их обсуждение

С учетом особенностей записи ЭКГ у мини-свиней (запись с конечностей в положении стоя при обычном пребывании), на ЭКГ в качестве артефактов часто фиксируются миограммы, связанные с шевелением животных, которые требуют исключения из дальнейшего компьютерного анализа. Использовать какие-либо приемы обездвиживания животных не представляется возможным, так как любые попытки ограничения для мини-свиней являются выраженными стрессорами, что находит свое отражение в картинах ЭКГ и ритмограммах.

Однако даже в комфортных для животных условиях отмечается выраженная нестабильность ритма сокращений сердца животных, что находит свое отражение в более заметной амплитуде колебаний на ритмограмме (рис. 1).

Однако достаточно часто даже в условиях комфорта у мини-свиней могут встречаться спонтанно возникающие эпизоды как тахикардии (рис. 2), так и брадикардии (рис. 3).

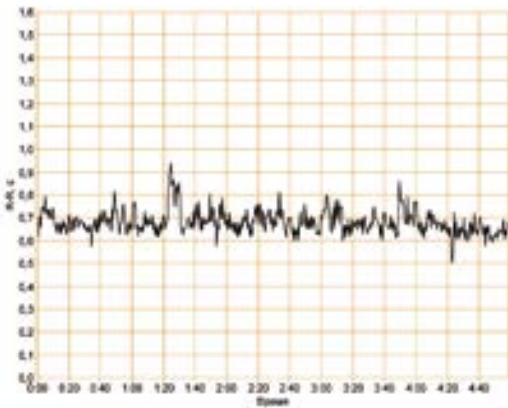


Рис. 1. Типичная ритмограмма мини-свиньи в состоянии комфорта.

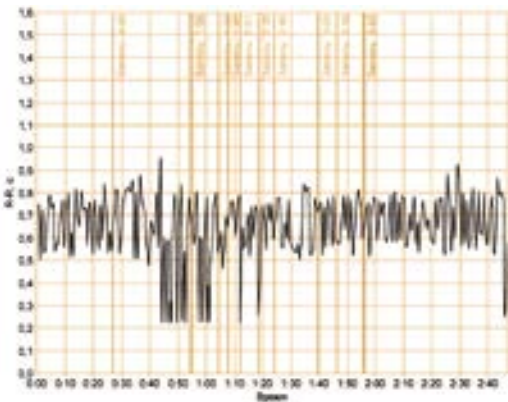


Рис. 2. Эпизоды спонтанной тахикардии у мини-свиней в комфортном состоянии. *Примечание:* на этой и других ритмограммах вертикальные полосы – зоны исключенных из анализа артефактов миограммы.

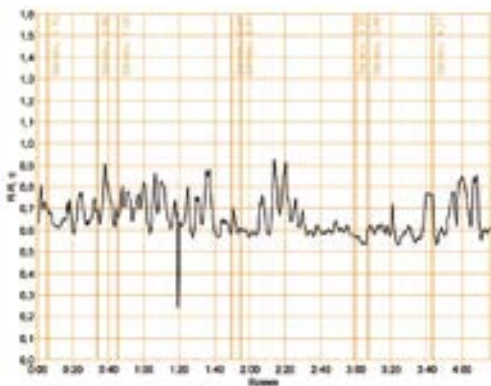


Рис. 3. Ритмограмма мини-свиньи в комфортном состоянии с эпизодами брадикардии.

Сопоставление ритмограмм у различных мини-свиней в состоянии комфорта позволило выделить среди них достаточно большую подгруппу (38% обследованных животных) мини-свиней с «расторможенной» вегетатикой, характеризующейся более высокой амплитудой разбросов на ритмограмме (рис. 4).

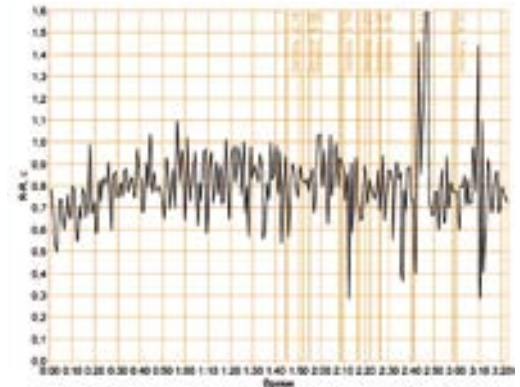


Рис. 4. Ритмограмма мини-свиньи с «расторможенной» вегетатикой.

Типичная спектрограмма регуляторных влияний на ритм сердца мини-свиней (рис. 5А) содержит те же диапазоны спектральных ритмов, что и спектрограмма человека в состоянии покоя (рис. 5Б). Так, отчетливо выделяются высокочастотные (HF) ритмы (частоты более 0,15 Гц), связанные с парасимпатическими влияниями; низкочастотные ритмы (LF) I (частоты от 0,06 до 0,14 Гц, связанные с постганглионарными симпатическими волокнами) и II поддиапазонов (частоты от 0,01 до 0,06 Гц, связанные с ритмами эндокринной регуляции и мозговым веществом надпочечников), и ультранизкочастотные (VLF) ритмы (диапазон от 0,0005 до 0,01 Гц), связанные с активностью диэнцефальных центров мозга.

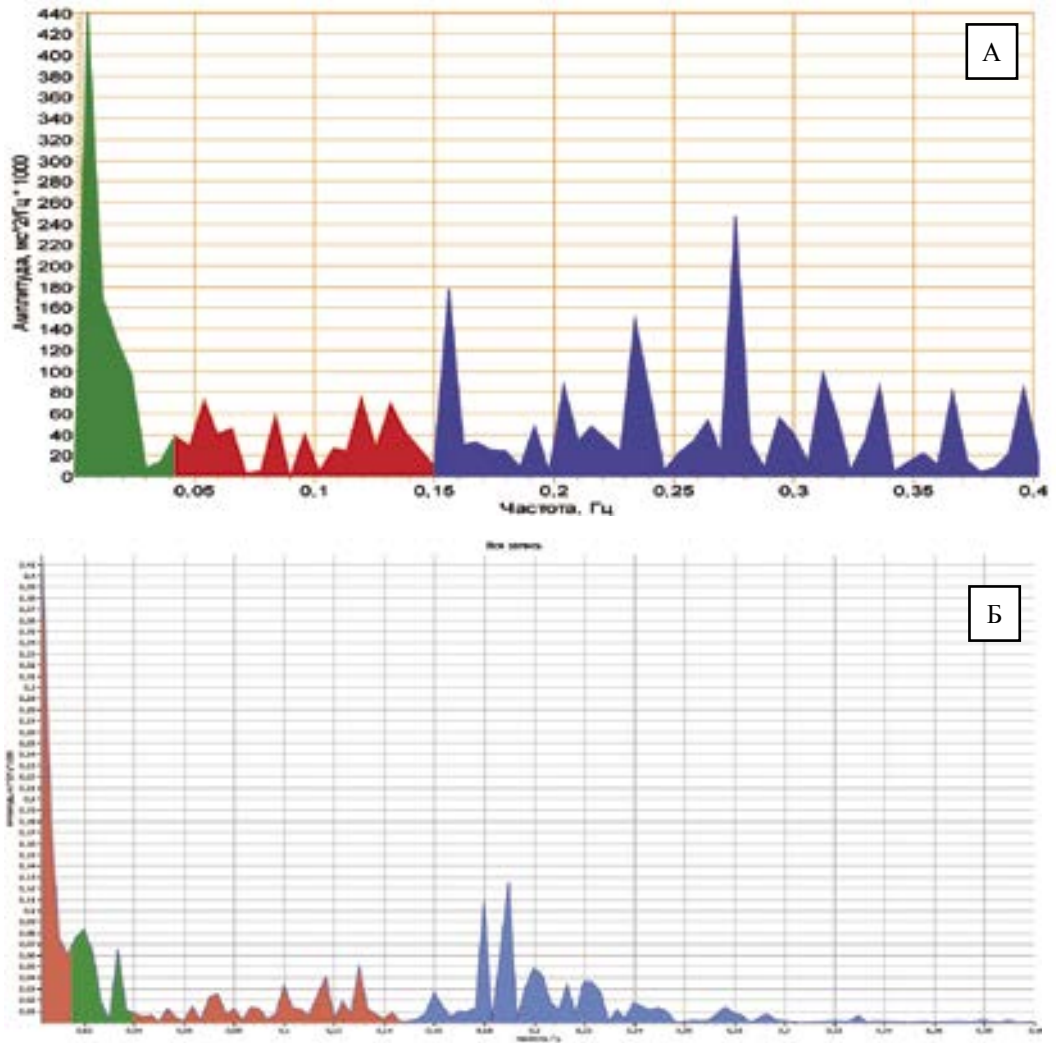


Рис. 5. Спектрограммы мини-свиньи (А) и человека (Б) в условиях относительного покоя и комфорта.

Скаттерграма, характеризующая напряженность механизмов регуляции с точки зрения методологии управляемого хаоса, для человека и мини-свиньи, находящихся в комфортных условиях относительного покоя, существенно отличаются (рис. 6).

Сопоставление скаттерграмм позволяет сделать вывод, что у мини-свиней система вегетативной регуляции сердеч-

ного ритма находится в неустойчивом, не сформированном, хаотичном состоянии.

С целью дальнейшего анализа роли различных уровней вегетативной регуляции в регуляции variability ритма сердца мини-свиньи мы «выключили» высшие центры нервной регуляции путем введения мини-свиньи в состояние наркоза (внутривенное введение общего анестетика Zoletil 100 в стандарт-

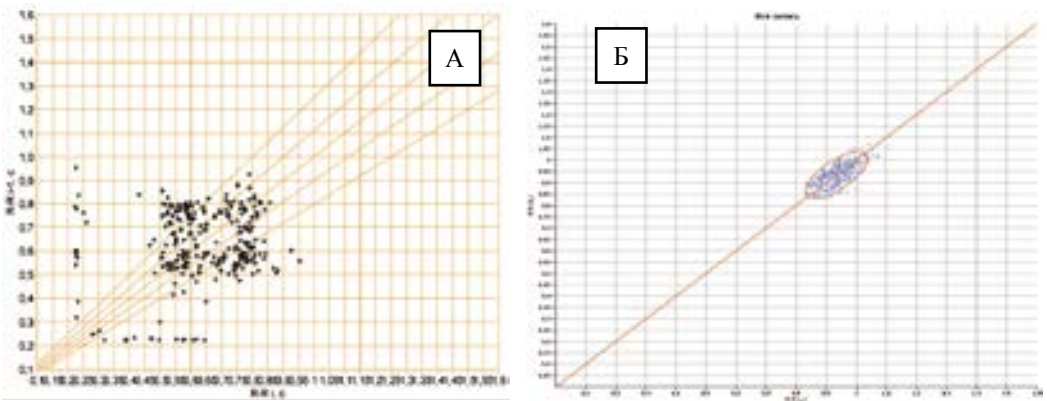


Рис. 6. Скаттерграмма мини-свиньи (А) и человека (Б) в состоянии относительного покоя и комфорта.

ных рекомендуемых дозах). Полученная картина вариабельности сердечного ритма и его математического анализа представлена на рис. 7. Ритмограмма

(рис. 7А) демонстрирует стойкий ровный ритм с коэффициентом вариации 3,7% и частотой сердечных сокращений на уровне 100 уд./мин.

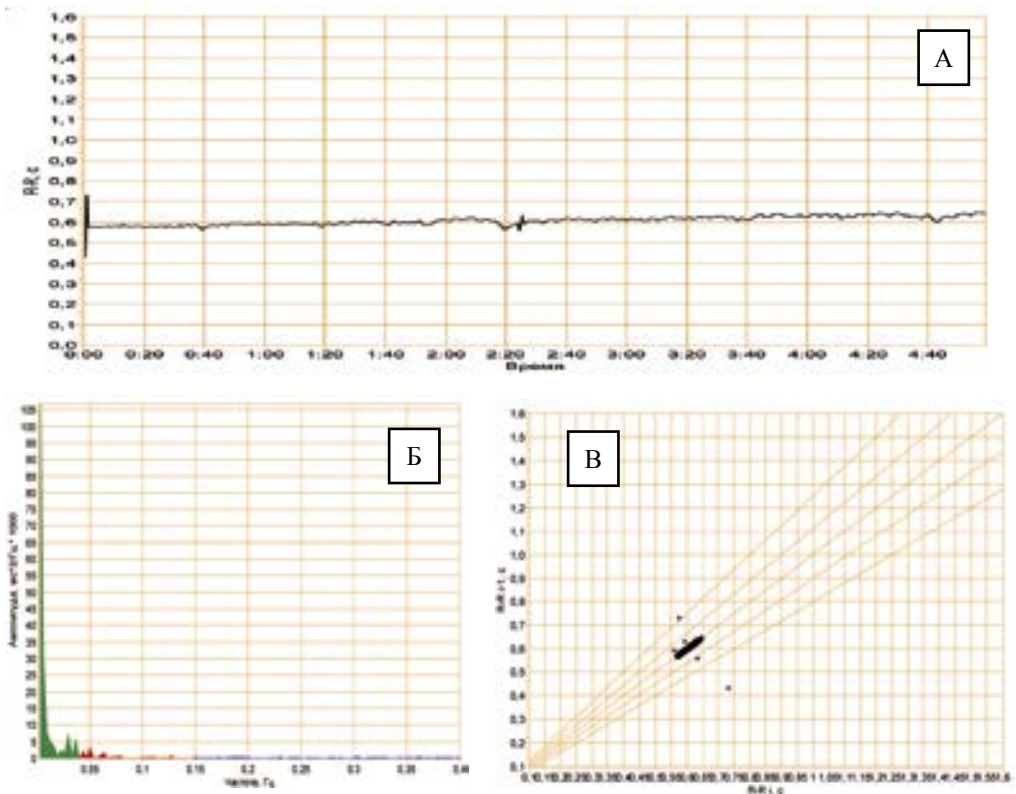


Рис. 7. Влияние наркоза на вегетативную регуляцию ритма сердца мини-свиньи (А – ритмограмма, Б – спектрограмма, В – скаттерграмма).

При анализе спектрограммы (рис. 7Б) обращает на себя влияние практически полное нивелирование ритмов как симпатической, так и парасимпатической зоны. В то же время, более отчетливым становится регуляторное влияние регуляторных факторов эндокринного диапазона (0,02-0,05 Гц), обеспечивающих минимальный уровень вариабельности. Скорее всего, в связи с выключением под наркозом гипоталамо-гипофизарной системы, выявленные пики в эндокринном диапазоне могут быть связаны с базовой секрецией адреналина мозговым веществом надпочечников, секрецией ренина и натрийуретического фактора.

Анализ скаттерграммы (рис. 7В) показывает, что выявленное ранее состояние хаоса в вегетативной регуляции связано исключительно с высшими вегетативными центрами (их выключение наркозом устраняет хаотичность регуляции), что свидетельствует об их эволюционной незрелости. При этом выявляется один доминирующий центр регулирования, находящийся в зоне относительного превалирования катехоламиновой системы (смещение облака скаттерграммы в левый нижний квадрант).

С целью дальнейшего анализа механизмов вегетативной регуляции сердечной деятельности у мини-свиньи мы использовали фармакологические агенты вегетативного действия. Выбор агентов представлял собой достаточно сложную задачу, так как было необходимо заранее исключить такие фармакологические средства, которые могут прямо влиять на ритм сердечных

сокращений, возбудимость, проводимость и сократимость миокарда. В связи с этим, в исследовании не могли быть использованы адrenoагонисты и адреноблокаторы, метилксантинны, блокаторы медленных кальциевых каналов, активаторы калиевых каналов, сердечные гликозиды, негликозидные кардиотоники, препараты с противоритмическим действием.

В итоге, в качестве фармакологических анализаторов нами были выбраны следующие препараты: галантамин (непрямой холиномиметик преимущественно центрального действия – обратимый ингибитор холинэстеразы с преобладанием действия в области N-холинорецепторов); метацин – периферический неселективный M-холиноблокатор. Применение галантамина будет вести к активации парасимпатических влияний на уровне постганглионарных и ганглионарных волокон, а также активации трофотропных и эрготропных вегетативных центров мозга. Метацин будет устранять вегетативные влияния на уровне постганглионарных парасимпатических волокон.

С целью резкой активации симпатических и эрготропных регуляторных структур мы были вынуждены использовать стрессовую для животных истощающую физическую нагрузку, вызывающую у животных, как было ранее нами показано, выраженную симпатическую реакцию [4].

Под влиянием галантамина (0,26 мг/кг внутримышечно) наблюдалась картина усиления парасимпатических влияний на регуляцию сердечного ритма (рис. 8).

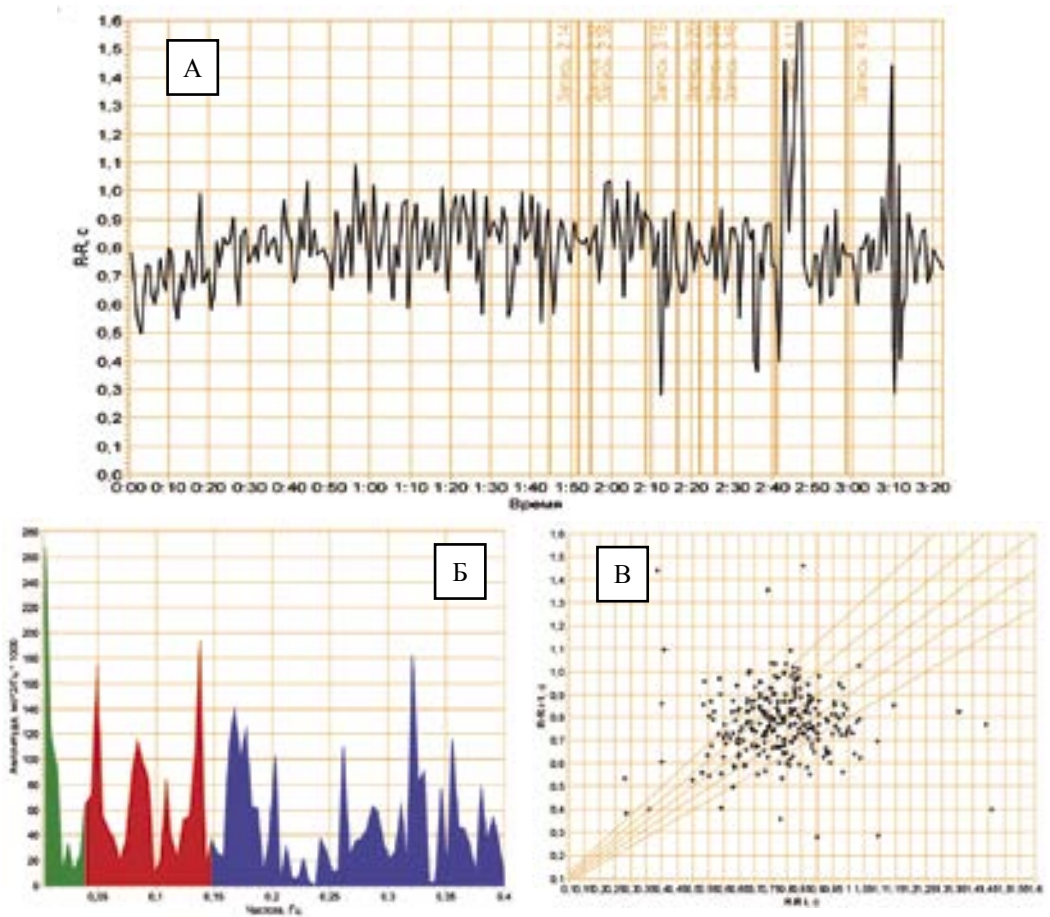


Рис. 8. Влияние галантамина на регуляцию variability сердечного ритма мини-свиней (А – ритмограмма, Б – спектрограмма, В – скаттерграмма).

При сопоставлении со спокойным комфортным состоянием (рис. 1) ритмограмма мини-свиньи напоминает ритмограмму «расторможенной» вегетатики. При этом частота сердечных сокращений стабилизируется на уровне 75 уд./мин, что для этих животных соответствует выраженной брадикардии (рис. 9).

При сопоставлении спектрограмм (рис. 5А и рис. 8Б) отмечается увеличение амплитуд и площадей пиков парасимпатического диапазона, а также повышение амплитуд пиков симпатического диапазона. В усредненном

варианте соотношение спектральной мощности по диапазонам у мини-свиньи в состоянии относительного покоя следующее: VLF – 46%, LF – 31%, HF – 23%. При применении галантамина соотношение спектральных мощностей изменилось и было близким к следующим значениям: VLF – 14%, LF – 33%, HF – 53%, что свидетельствует о выраженном повышении парасимпатических влияний.

Скаттерграмма при применении галантамина (рис. 8В) отражает отсутствие напряженности в работе меха-

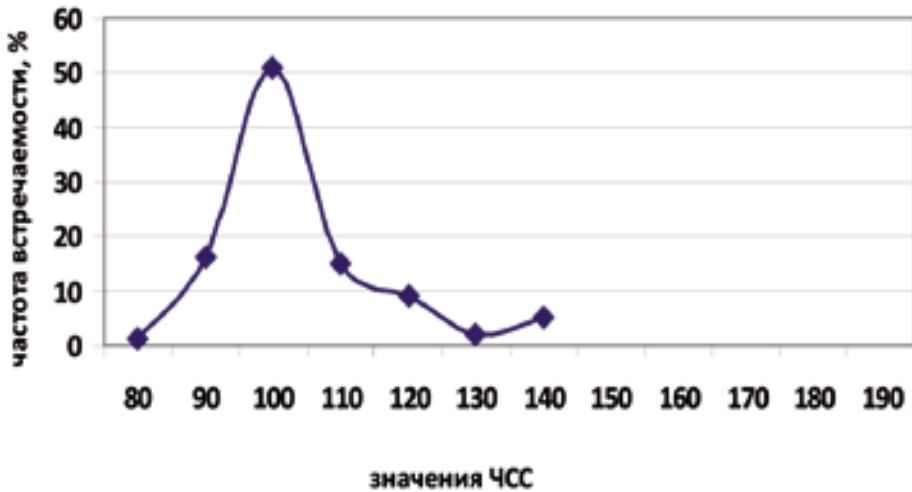


Рис. 9. Частотный анализ встречаемости значений ЧСС у мини-свиньи в состоянии относительного покоя и комфорта.

низмов регуляции (облако рассеивания практически находится в допустимых пределах) и преобладания хаотичности в последовательных рядах кардиоинтервалов. Для человека характеристики такого рода отражают глубокое трофотропное состояние, состояние «избыточного накопления» функциональных резервов, преобладание трофотропных (и связанных с ними парасимпатических центров) над эрготропными (центрами обеспечения деятельности и связанными с ними симпатическими) регуляторными системами.

Влияние холинолитика метацина (0,35 мг/кг внутрь) на механизмы регуляции ритма сердца мини-свиней отражено на рис. 10.

Ритмограмма мини-свиней, получавших метацин, характеризуется приближением к «идеальной» ритмограмме, характеризующей состояние комфортного покоя (рис. 1), при этом значение частоты сердечных сокращений стабилизируется на уровне 85-95 уд./мин, что

соответствует нормальному (наиболее частому) диапазону (рис. 9). Коэффициент вариации сердечного ритма находится в диапазоне 7-10%.

На спектрограмме отчетливо видно снижение амплитуд и площади пиков парасимпатического диапазона. При применении метацина соотношение спектральных мощностей было близким к следующим значениям: VLF – 33%, LF – 43%, HF – 24%, что свидетельствует о выраженном подавлении парасимпатических влияний.

Облако рассеивания на скаттерграмме (рис. 10B) становится более компактным, что свидетельствует о более правильной организации регуляторных процессов, меньшей их хаотичности.

Влияние стрессовой физической нагрузки на регуляцию сердечного ритма мини-свиней отражено на рис. 11. При этом на ритмограмме фиксируются множественные мышечные артефакты, требующие удаления из анализа. Следовательно, из-за уменьшения количе-

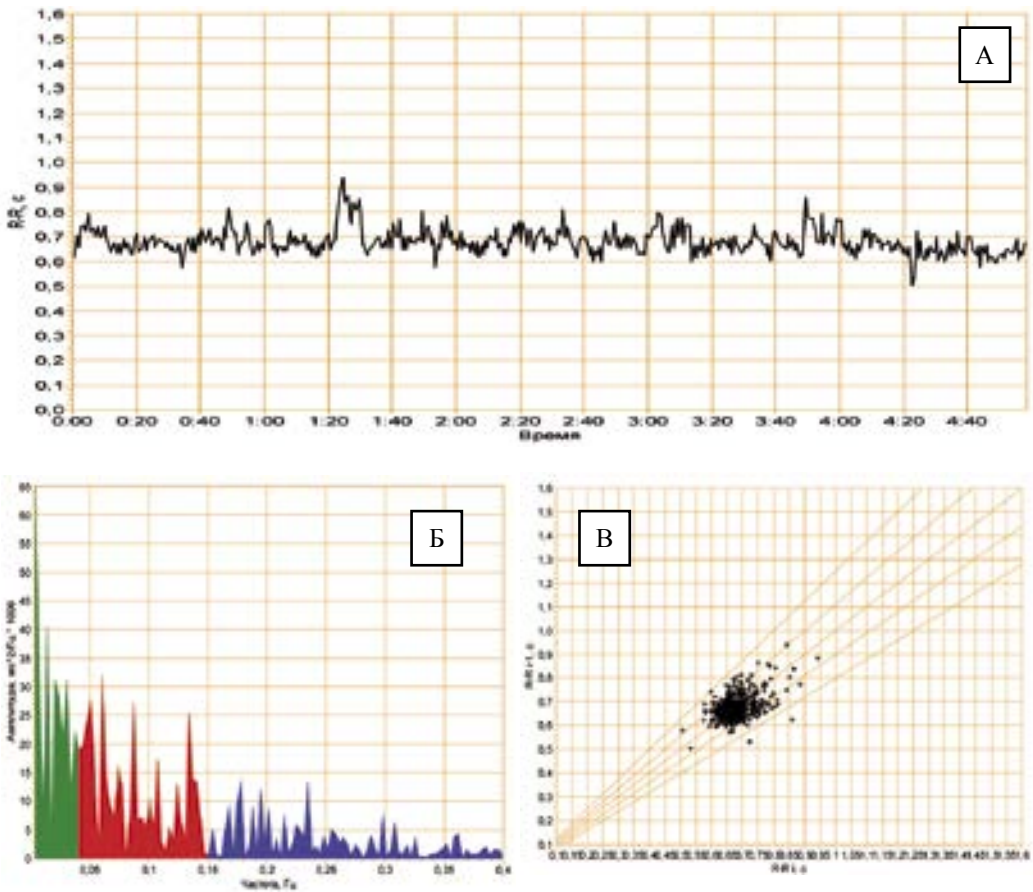


Рис. 10. Влияние холинолитика метацина на регуляцию ритма сердца мини-свиней (А – ритмограмма, Б – спектрограмма, В – скаттерграмма).

ства анализируемых комплексов может снизиться достоверность математического анализа ритмограммы (в области ультрамедленноволновых процессов) и возникает необходимость компенсаторного увеличения длительности записи с 5 до 7 мин, что может привести к регистрации начала фазового процесса восстановления. Регулярно возникающие «всплески» на ритмограмме свидетельствуют о параллельной активации и парасимпатических регуляторных влияний, возможно, связанных с дыхательными волнами.

На спектрограмме регистрируется увеличение амплитуды симпатических ритмов при резком снижении диэнцефальных. После предельно переносимой физической нагрузки у мини-свиней соотношение спектральных мощностей было близким к следующим значениям: VLF – 15%, LF – 48%, HF – 37%, что свидетельствует о выраженном подавлении высших регуляторных влияний, активизации симпатических постганглионарных структур и, возможно, компенсаторное, повышение активности и парасимпатических центров.

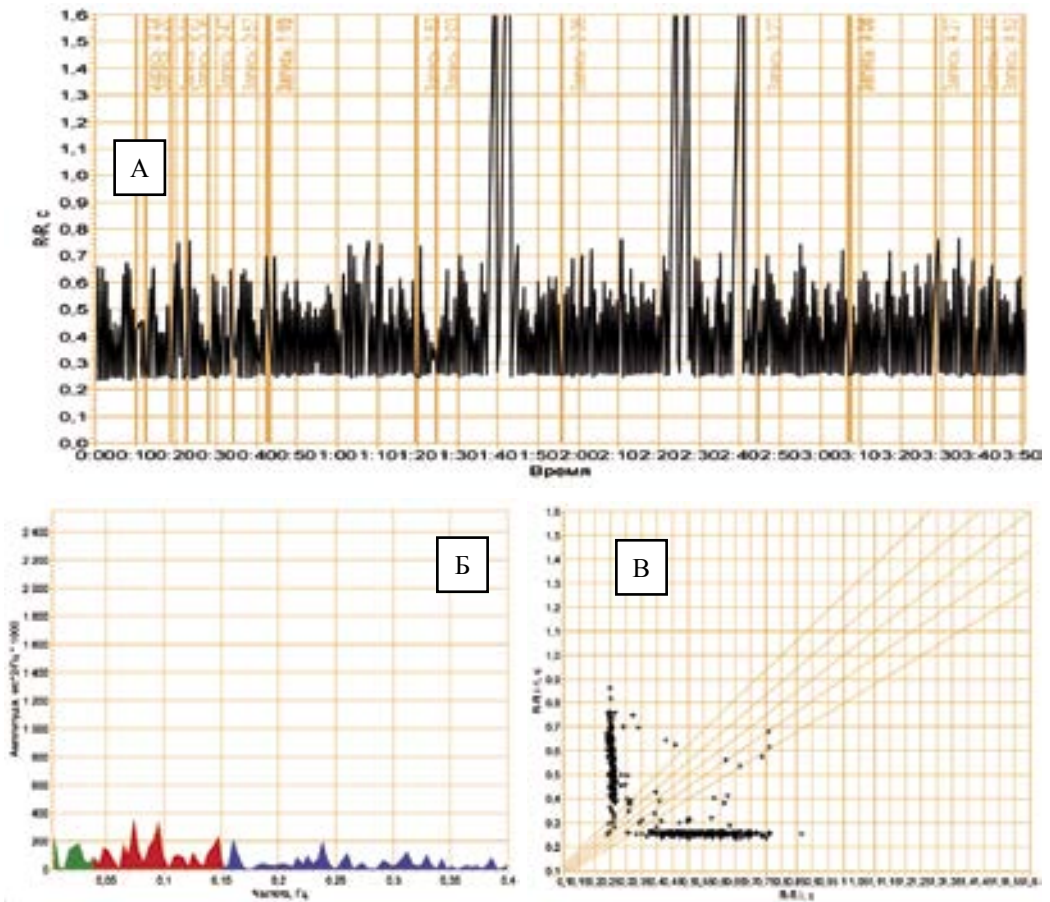


Рис. 11. Влияние предельно переносимой физической нагрузки на вегетативную регуляцию ритма сердца (А – ритмограмма, Б – спектрограмма, В – скаттерграмма).

Скаттерграмма (рис. 11В) свидетельствует о полной дезорганизации работы регуляторных механизмов в отношении вариации ритма сердца, наличии как минимум 2 конкурирующих, независимых друг от друга программ регуляции.

В статистически обработанном виде результаты исследования представлены в таблице. Для удобства интерпретации рядом представлены данные, характерные для практически здоровых людей в состоянии покоя.

Сопоставление данных, характерных для человека в состоянии покоя, и мини-свиней в условиях относительного покоя и комфорта, выявляет следующие принципиальные отличия:

Для мини-свиней характерна высокая вариативность ритмограммы (коэффициент вариации RR-интервалов для мини-свиньи в разы превышает аналогичный показатель для человека). Общая картина ритмограммы во многом напоминает картину человека с вегетативной дистонией, при преобладании вагоинсулярной симптоматики.

Таблица

Влияние физической нагрузки и фармакологических анализаторов (галантамин, метацин) на показатели вариационной ритмографии мини-свиней

| Показатель | Человек * | Мини-свинья ** | | | |
|------------------------------|------------------|---------------------|----------------|------------|-----------|
| | | относительный покой | после нагрузки | галантамин | метацин |
| Условия регистрации | покой | | | | |
| ЧСС, уд/мин | 65-80 | 88±3 | 129±4 | 64±5 | 83±2 |
| RRmin, мс | | 261±38 | 158±19 | 542±37 | 354±67 |
| RRmax, мс | | 1676±446 | 1440±238 | 1348±102 | 1212±98 |
| RRnp, мс | 750-950 | 683±23 | 464±16 | 958±81 | 723±17 |
| dRR, мс | | 1415±467 | 1282±252 | 806±125 | 858±151 |
| CV, % | 5,3 | 30±11 | 46±4 | 18±2 | 24±7 |
| Mo, с | | 0,59±0,04 | 0,38±0,14 | 0,82±0,12 | 0,64±0,12 |
| AMo, % | | 23±2 | 23±2 | 15±2 | 23±6 |
| Tr, 1000*мс ² /Гц | 3466±1018 | 72,7±50,3 | 43,2±10,2 | 27,2±9,4 | 35,5±16,6 |
| LFnorm, ед | 54±4 | 43±4 | 37±3 | 28±12 | 40±8 |
| HFnorm, ед | 29±3 | 56±4 | 62±3 | 72±12 | 59±8 |
| LF/HF, отн.ед. | 1,5-2,0 | 0,85±0,15 | 0,60±0,07 | 0,58±0,39 | 0,83±0,29 |
| % VLF | 33 | 30±5 | 40±9 | 15±4 | 26±3 |
| % LF | 28 | 29±2 | 23±4 | 22±8 | 29±5 |
| % HF | 39 | 41±5 | 37±6 | 63±12 | 45±8 |
| ИВР | | 28±6 | 19±4 | 20±4 | 37±17 |
| ВПР | | 1,84±0,25 | 2,47±0,26 | 1,76±0,35 | 2,32±0,42 |
| ИН | | 23±4 | 29±5 | 13±2 | 27±12 |
| ПАРП | | 42±6 | 79±24 | 19±1 | 41±10 |

Примечание: * – по данным Михайлова В.М. [3], ** – по собственным данным.

Общая мощность спектрального ритма, отражающая возможный объем регуляторных влияний, у мини-свиньи примерно в 100 раз ниже, чем у человека, что отражает эволюционную незрелость вегетативной регуляции.

Нормированные значения для высокочастотных (парасимпатических) влияний и их долевого вклад в общую систему регуляции у мини-свиней превалирует над аналогичными показателями симпатoadреналовой системы, активность структур которых для человека может считаться ведущей. Наиболее отчетливо

это проявляется в показателях индекса симпатикотонии, находящихся у человека в симпатическом диапазоне, а у мини-свиней – в парасимпатическом.

Несмотря на выявленные отличия, использованные фармакологические и физиологические анализаторы вызывают у мини-свиньи такие же ответы как и у человека.

Так, интенсивная физическая нагрузка ведет к повышению частоты сердечных сокращений и смещению диапазона RR-интервалов в сторону более низких значений. Вегетативный показатель

ритма, показатель адекватности процессов регуляции имеют динамику, отражающую повышение роли симпатических регуляторных центров, а индекс напряжения – централизацию управления сердечной деятельностью, что подтверждается ростом вклада диэнцефальных структур в общую систему регуляции. Вероятно, с учетом регистрации ритмограмм на этапе восстановления после нагрузки, по некоторым показателям (индекс вегетативного равновесия, нормированная мощность парасимпатического диапазона спектра) отмечается нарастание парасимпатических влияний, что может носить компенсаторный характер.

При применении галантамина отмечаются закономерное усиление парасимпатических влияний (урежение частоты сердечных сокращений, увеличение RR-интервалов и сокращение размаха их колебаний, коэффициента вариации ритмограммы, увеличение значения моды их распределения, увеличение нормированной мощности высокочастотного спектрального диапазона при снижении мощности низкочастотного, преобладание парасимпатических влияний в общей системе регуляции сердечного ритма).

Применение холинолитика метацина сопровождалось восстановлением значений частоты сердечных сокращений, частичным восстановлением колебаний RR-интервалов и их коэффициента вариации, моды распределения, спектральной мощности парасимпатического диапазона как в нормированном, так и относительном выражении. Необходимо отметить, что выключение парасимпатической регуляции метацином сопровождалось повышением вклада

симпатических влияний по интегральным показателям ритмографического исследования (ИВР, ВПР).

Выводы:

1. Ритмографическое исследование, проводимое на мини-свиньях, может быть использовано для доклинической оценки вегетотропных лекарственных средств, несмотря на эволюционную незрелость высших центров вегетативной регуляции у этих животных, так как тестовые фармакологические и физиологические воздействия на показатели математического анализа ритма сердца (ритмограмма, вариационные характеристики, спектральный анализ, скаттерграмма) носят закономерный характер.

2. В вегетативной регуляции ритма сердца у мини-свиней преобладающей является парасимпатическая регуляция.

3. Вклад эндокринного (гуморального) контура регуляции сердечного ритма у мини-свиней может быть оценен ритмографическими методами в состоянии наркоза животных препаратом Zoletil 100.

Список литературы

1. *Баевский Р.М., Кириллов О.И., Клетский С.З.* Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе. - М.: Наука. 1984. 188 с.
2. *Котельников С.А., Ноздрачев А.Д., Одинак М.М., Шустов Е.Б., Коваленко И.Ю., Давыденко В.Ю.* Вариабельность ритма сердца: представления о механизмах // Физиология человека. 2002. Т. 28. № 1. С. 130-143.

3. *Михайлов В.М.* Вариабельность ритма сердца: опыт практического применения. - Иваново: Ивановская ГМА. 2002. 290 с.
4. *Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Каркищенко В.Н., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Ким А.Е.* Изменение параметров сердечной деятельности по данным ЭКГ у мини-свиней в условиях стресс-индуцированной тахикардии // Биомедицина. 2013. № 4. С. 126-133.
5. *Шустов Е.Б., Филатов Н.А., Филатов В.Н.* Математические методы анализа variability сердечного ритма и возможность их применения для оценки функционального состояния специалистов авиакосмического профиля // Вестник образования и развития науки РАЕН. 2006. № 1. С. 10-28.

Features vegetative regulation of cardiac activity in mini-pigs

Е.В. Shustov, G.D. Kapanadze, V.N. Karkischenko, N.V. Stankova, А.Е. Kim, S.G. Poleschuk

The study of the basic parameters of rhythmographic research mini-pigs cardiac under normal conditions of stay in the vivarium conditions and stress-induced tachycardia exercise and its mathematical analysis, and the use of indirect anticholinergic and cholinomimetic galantamine metatsina. It is shown that the autonomic regulation of the heart during stress-induced tachycardia and pharmacologic effects not fundamentally different from similar adjustment in people that allows us to consider a mini-pigs adequate biological model to assess the effects of pharmacological agents on the autonomic nervous system during various modeling studies of short-term pathological processes.

Key words: ECG, mini-pigs, stress-induced tachycardia, biological models, rhythmogram, spectrogram, scaterogram, vegetative regulation.



Токсикологическая характеристика антигипертензивных средств, влияющих на ренин-ангиотензиновую систему

О.И. Авдеева¹, М.Н. Макарова¹, О.В. Афонькина¹, И.Е. Макаренко¹, В.Г. Макаров¹, Г.Д. Капанадзе²

¹ – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Ленинградская область

² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Авдеева Ольга Ильинична, avdeeva1376@yandex.ru

В статье обобщены экспериментально полученные данные о токсичности представителей различных групп ингибиторов системы РААС: ингибиторов ренина (алискирен), ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (эналаприл, фозиноприл), блокаторов ангиотензин II (АТII) рецепторов (валсартан, лозартан, телмисартан, ирбесартан). Исследования токсичности проведены на аутбредных крысах при однократном и многократном (30 дней) внутрижелудочном введении в дозах, эквивалентных 1, 10 и 20 высшим терапевтическим для человека. По результатам исследований все изученные представители отнесены к классу малотоксичных лекарственных средств. Токсическое воздействие выявлено после многократного введения препаратов в дозах 10 и 20 высших терапевтических. Основные органы-мишени токсического воздействия: сердечно-сосудистая система, почки, в меньшей степени печень.

Ключевые слова: антигипертензивные средства, ингибиторы системы РААС, доклинические исследования, острая и хроническая токсичность на крысах.

Лекарственные препараты-ингибиторы ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) относятся к числу современных и наиболее эффективных антигипертензивных средств, обладающих ценными фармакологическими свойствами.

Ингибиторы РААС выгодно отличаются от других гипотензивных препаратов следующими свойствами: отсутствие синдрома отмены; отсутствие угнетения центральной нервной системы; эффективное уменьшение гипер-

трофии левого желудочка, что устраняет фактор риска развития ишемии миокарда; отсутствие влияния на обмен углеводов, благодаря чему их целесообразно назначать при сочетании артериальной гипертензии с сахарным диабетом (у этих больных они предпочтительнее); отсутствие нарушения обмена холестерина; отсутствие или минимальная выраженность угнетения половой функции, что обычно вызывается, например, тиазидными диуретиками, адреноблокаторами, симпатолитиками (резерпин,

октадин, метилдофа); повышение качества жизни больных, установленное в многочисленных исследованиях [1].

Сообщается о низкой токсичности препаратов-ингибиторов системы РААС [2, 3], однако, на наш взгляд, имеется недостаточно данных, характеризующих токсикологические свойства данной группы лекарственных средств (например, зачастую отсутствуют данные об острой токсичности), что недопустимо, учитывая «букет» заболеваний, сопутствующих гипертонической болезни, в частности, заболевания сердечно-сосудистой системы, почек, обмена веществ и другие [4].

Целью данного исследования было обобщение экспериментально полученных данных о токсичности представителей различных групп ингибиторов системы РААС: ингибиторов ренина (алискирен); ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) (эналаприл, фозиноприл); блокаторов ангиотензин II (АТII) рецепторов (валсартан, лозартан, телмисартан, ирбесартан).

Материалы и методы

Исследования были проведены на аутбредных крысах (самцах и самках) массой 180-250 г, полученных из питомника РАМН «Рапполово». Животных содержали в стандартных условиях с соблюдением полноценного пищевого рациона и свободного доступа к воде. При изучении острой токсичности препараты вводили однократно внутрижелудочно, при изучении хронической токсичности препараты вводили ежедневно внутрижелудочно в течение 30 дней в дозах, эквивалентных 1, 10 и 20 высшим терапевтическим для человека. На 15-й день после однократного введе-

ния и через сутки после окончания курсового введения (31-й день) животных подвергали эвтаназии. Эвтаназия осуществлялась с помощью CO_2 -камеры.

Для оценки общетоксического действия препаратов регистрировали летальность животных в ходе эксперимента, клиническую картину интоксикации, динамику массы тела, показатели массовых коэффициентов внутренних органов, кроме того, после курсового введения оценивали гематологические и биохимические показатели периферической крови, проводили гистологическое исследование тканей внутренних органов. Гематологические показатели определяли в цельной крови с антикоагулянтом на гематологическом анализаторе «ABACUS juniorvet» (Австрия), биохимические показатели крови определяли на биохимическом анализаторе «А-25» (Испания) с использованием реагентов фирмы BioSystems (Испания) в сыворотке крови без следов гемолиза. Для гистологической обработки ткани внутренних органов очищали, заливали в парафин, нарезали, окрашивали гематоксилином и эозином и микроскопировали.

Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, USA).

Результаты и их обсуждение

Результаты изучения острой токсичности представлены в табл. 1 (приведены доступные литературные данные и полученные экспериментально).

Таким образом, по показателям средних летальных доз исследуемые препараты были отнесены к IV классу малотоксичных веществ по классификации Hodge и Sterner [9], $500 < \text{ЛД}_{50}$

Летальные дозы препаратов-ингибиторов системы РААС при в/ж введении крысам

| Препарат | Летальные дозы | |
|-------------|-----------------------------------|--|
| | По литературным данным | Экспериментальные |
| Алискирен | Нет данных | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг, ЛД ₁₀ = 900 мг/кг |
| Эналаприл | Нет данных | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг |
| Фозиноприл | Нет данных | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг |
| Валсартан | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг [5] | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг |
| Телмисартан | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг [6] | ЛД ₅₀ = 1100-1600 мг/кг |
| Лозартан | МПД = 2000 мг/кг [7] | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг МПД = 1000 мг/кг |
| Ирбесартан | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг [8] | ЛД ₅₀ > 2000 мг/кг |

(в/ж, крысы) < 5000 мг/кг и к III классу умеренно опасных веществ 151 < ЛД₅₀ (в/ж) < 5000 мг/кг по ГОСТ 12.1.007-76 [10].

Отмечены следующие основные признаки клинической картины интоксикации при применении исследуемых препаратов: угнетение общего состояния, гиподинамия, кратковременное угнетение дыхания, редко одышка, дезориентация, единичные случаи носового кровотечения, бледность или цианоз кожных покровов и видимых слизистых. Вскрытие погибших животных показало картину острой гипотензии на фоне острой сердечной недостаточности с отеком легких и головного мозга. После введения блокаторов АП II-рецепторов отмечена также острая почечная недостаточность.

Макроскопически у погибших животных регистрировали следующее: сердце дрябловатой консистенции, полости расширены, содержат большое количество темно-красной жидкой крови с небольшим количеством свертков. Клапаны сердца, крупных сосудов и пристеночный эндокард тонкие, глад-

кие, блестящие, полупрозрачные. Миокард на разрезе буровато-коричневатый, волокнистый, неравномерного кровенаполнения, с крупно- и мелкоочаговыми инфарктами. Легкие тестоватые, отечные. На разрезе ткань с большим количеством кровянисто-пенистого отделяемого с поверхности. С поверхности разреза печени стекает темная жидкая кровь. Головной мозг – форму сохраняет, резко отечный, извилины сглажены, борозды уплощены. На разрезе сохраняется правильное распределение серого и белого вещества. Сосуды мозговых оболочек и мозжечка полнокровны. После введения блокаторов АП II-рецепторов отмечено также неравномерно выраженное полнокровие (выраженное полнокровие мозгового слоя и малокровие коркового слоя) почек.

Вскрытие животных спустя 14 дней после однократного введения исследуемых препаратов показало, что блокаторы АП II-рецепторов в дозах 1500-2000 мг/кг оказали остаточное нефротоксическое действие. Токсическое воздействие остальных групп препаратов через 14 дней не определялось.

Показатели токсического действия изученных препаратов-ингибиторов системы РААС

| Препарат | Нефротоксическое действие | Гепатотоксическое действие |
|-------------------------|---|--|
| Алискирен | увеличение уровня креатинина на 35%; лейкоцитоз (в 1,5 раза) | увеличение уровня билирубина в 2 раза; зернистая белковая, очаговая и диффузная мелкокапельная жировая дистрофия, архитектоника гепатоцитов нарушена |
| Эналаприл Фозиноприл | Многочисленные очаговые изменения в виде дистрофии и некроза клубочков и проксимальных канальцев почки, наполнение эритроцитами собирательных трубок и в некоторых случаях дистальных канальцев, выявлялись очаги кортикального и субкортикального некроза. Более выражено у самцов | Незначительные очаговые дистрофические изменения гепатоцитов с расширением синусоидов, гиперемией центральных вен с редкими их тромбозами и дистрофическими или некротическими изменениями гепатоцитов вокруг них |
| Телмисартан | увеличение уровня мочевины в 2,5 раза; умеренно выраженные воспалительные изменения в клубочковом аппарате с вовлечением в процесс артериол | Архитектоника гепатоцитов не прослеживается, выраженная белковая дистрофия, мелкокапельная жировая дистрофия, выраженная воспалительная (лейкоцитарная) инфильтрация в передуктальных и переваскулярных зонах |
| Лозартан | 1) лейкоцитоз (в 1,5 раза); 2) эритропения (у самцов на 30%, у самок на 15%); 3) снижение содержания гемоглобина (у самцов на 30%, у самок на 15%); 4) снижение гематокрита (у самцов на 30%, у самок на 25%); 5) увеличение уровня креатинина в 2 раза и мочевины в 3-4 раза; 6) обратимые изменения в почках в виде расширения сосудов, неравномерно выраженного венозно-капиллярного полнокровия коркового и мозгового вещества | Не обнаружено |
| Валсартан | увеличение уровня мочевины в 2-3 раза; выявлены морфологические проявления межпочечного нефрита: в интерстициальной ткани почки обнаруживаются очаги (инфильтраты) мононуклеарных элементов, окружающая ткань почки без выраженных морфологических изменений | Морфологическая картина паренхиматозной дистрофии печени: гистоархитектоника печени сохранена, в цитоплазме гепатоцитов определяются мелкие гранулы, которые заполняют всю цитоплазму. Полнокровие центральных вен |
| Ирбесартан | лейкоцитоз (в 1,5-2 раза); увеличение уровня креатинина в 4 раза и мочевины в 3 раза; очаговая и диффузная гиалиново-капельная белковая дистрофия извитых канальцев почек | Не обнаружено |

Многokратное введение препаратов-ингибиторов системы РААС в дозах ВТД, 10 ВТД и 20 ВТД показало, что введение препаратов в дозах, эквивалентных ВТД для человека, не оказало токсического воздействия на организм подопытных животных. Динамика массы тела у всех животных была положительной, гематологические и биохимические показатели периферической крови не отличались от контрольных, при гистологическом исследовании в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов развития дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений не обнаружено.

Введение препаратов в дозах, эквивалентных 10 и 20 ВТД, оказало токсическое воздействие в ткани печени и почек (табл. 2), кроме того, введение препаратов в дозе 10 ВТД привело к гибели 10-30% животных, а в дозе 20 ВТД – к гибели до 70% подопытных крыс, причиной чего явилась острая сердечная недостаточность, в единичных случаях – острый токсический гепатит.

Кроме того, многократное введение препаратов Телмисартан и Ирбесартан в дозах 10 и 20 ВТД привело к развитию выраженного переваскулярного и перещелюлярного отека головного мозга, появлению глиоза.

Заключение

Таким образом, экспериментально показан схожий профиль токсичности препаратов, ингибирующих различные звенья системы РААС. В качестве основных органов-мишеней токсического воздействия следует назвать сердечно-сосудистую систему и почки, в качестве второстепенной мишени выступает печень. Также у блокаторов АП II-рецепторов выявлена

способность вызвать отек головного мозга, что, однако, может быть следствием влияния на сердечно-сосудистую систему. В целом, препараты-ингибиторы системы РААС можно отнести к малотоксичным, при многократном (30 дней) введении в высших терапевтических дозах токсических эффектов не обнаружено.

Список литературы

1. *Штрыголь С.Ю.* Рациональная фармакотерапия артериальной гипертензии: ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и блокаторы рецепторов к ангиотензину-II // Провизор. 2002. № 22. Available at: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N22/art_38.php
2. *Al-Mazroua H.A., Al-Rasheed N.M., Korashy H.M.* Downregulation of the cardiotrophin-1 gene expression by valsartan and spironolactone in hypertrophied heart rats in vivo and rat cardiomyocyte H9c2 cell line in vitro: a novel mechanism of cardioprotection // J. Cardiovasc.Pharmacol. 2013 Apr;61(4):337-44. doi: 10.1097/FJC.0b013e318283a565.
3. *Tabak F., Mert A., Ozaras R., Biyikli M., Ozturk R., Ozbay G., Senturk H., Aktuglu Y.* Losartan-induced hepatic injury // J. Clin. Gastroenterol. 2002. May-Jun;34(5):585-6.
4. *Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В.* Фармакотерапия гипертонической болезни. Часть 1 // Русский медицинский журнал. 1998. № 8. Available at: http://www.rmj.ru/articles_2303.htm.
5. Valsartan // Material Safety Data Sheet. <http://www.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1708762.pdf> [электронный ресурс, свободный доступ, дата обращения 04.2013].

6. Telmisartan // Material Safety Data Sheet. <http://www.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1643419.pdf> [электронный ресурс, свободный доступ, дата обращения 01.2014].
7. Losartan // Material Safety Data Sheet. http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/PZ01099.pdf [электронный ресурс, свободный доступ, дата обращения 10.2013].
8. Avapro (irbesartan) tablets. In: FDA. Center for drug evaluation and research NDA 20-757/S-021. 2002. p. 1-25.
9. *Hodge H.C. Gosselin R.E., Smith R.P.* Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimore. 1975. 427 p.
10. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

Toxicological properties of antihypertensive drugs acting on the renin-angiotenzin system

**O.I. Avdeeva, M.N. Makarova, O.V. Afonkina, I.E. Makarenko,
V.G. Makarov, G.D. Kapanadze**

In article the data obtained experimentally on toxicity of representatives of various groups of inhibitors of system of RAAS are generalized: renin inhibitors (aliskiren), inhibitors of angiotenzintransformation enzyme (AAE) (enalapril, fosinopril), blockers angiotensin II (ATII) of receptors (valsartan, losartan, telmisartan, irbesartan). Researches of toxicity are conducted on the outbred rats at single and repeated (30 days) intragastric introduction in the doses equivalent of 1, 10 and 20 of highest to therapeutic for persons. By results of researches all studied representatives are carried to a class of low-toxic medicines. Toxic influence is revealed after repeated introduction of preparations in doses of 10 and 20 highest therapeutic. Main target organs of toxic influence: cardiovascular system, kidneys, liver is the minimal influenced.

Key words: antigipertenzive means, inhibitors of system of RAAS, preclinical researches, acute and chronic toxicity on rats.

Гемореологическая активность экстракта левзеи сафлоровидной при стрептозотоцин-индуцированном диабете у крыс

А.С. Васильев, М.Б. Плотников, О.И. Алиев, З.Т. Шульгау

ФГБУ «НИИ фармакологии» Сибирского отделения РАМН, Томск

Контактная информация: к.б.н. Васильев Александр Сергеевич, oal@pharm.tsu.ru

У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом выявлены гемореологические нарушения, которые проявляются в увеличении вязкости крови, усилении агрегации и снижении деформируемости эритроцитов. При стрептозотоцин-индуцированном диабете наблюдались нарушения липидного состава мембран эритроцитов. У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом происходило снижение общего количества липидов и фосфолипидов (фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилхолина), с одновременным повышением сфингомиелина и лизофосфолипидов. Курсовое применение экстракта левзеи сафлоровидной (150 мг/кг, внутривенно, 14 суток) у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом способствует снижению вязкости крови, ослаблению агрегации эритроцитов, улучшению деформируемости красных клеток и повышению показателя доставки кислорода к тканям в сравнении с контрольными значениями. Лечение экстрактом левзеи сафлоровидной крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом приводит к повышению содержания общих липидов и фосфолипидов, восстанавливает соотношение фосфолипидов наружного (фосфатидилхолин и сфингомиелин) и внутреннего (фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин) слоя мембраны эритроцитов, а также уменьшает содержание лизофосфолипидов. Экстракт левзеи сафлоровидной при курсовом назначении снижает концентрацию глюкозы в крови и ограничивает потерю массы тела крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом.

Ключевые слова: экстракт левзеи сафлоровидной, стрептозотоцин-индуцированный диабет, гемореология, фосфолипиды.

Введение

Гемореологические нарушения являются важным элементом в патогенезе сахарного диабета, приводят к расстройствам в системе микроциркуляции и затрудняют оксигенацию тканей [3, 19]. Многими исследователями показано, что формирование синдрома повышенной вязкости крови (СПВК) при сахарном диабете, в значительной степени, происходит за счет нарушенных микрореологических показателей – усиления агрегации и снижения деформируемости эритроцитов [1, 3, 17, 18]. Реологические свойства эритроци-

тов в значительной степени зависят от структурно-функциональных свойств их мембран, нарушенных при сахарном диабете в результате активации процессов перекисидации и неферментативного гликозилирования [17, 18, 20]. В связи с этим, в комплексную терапию сахарного диабета целесообразно вводить гемореологические средства, обладающие способностью воздействовать на морфофункциональные характеристики эритроцитов. Перспективными в этом отношении являются растительные препараты на основе эдистероидсодержащих растений, среди которых

наибольшую активность проявляет сухой экстракт левзеи сафлоровидной (ЭЛС) – *Rhaponticum carthamoides* Wild. (Pilin). Ранее нами установлена гемореологическая активность ЭЛС в условиях экспериментальных моделей сердечно-сосудистых расстройств, при которых исследуемый экстракт эффективно ограничивал развитие СПВК, улучшал реологические показатели эритроцитов и положительно воздействовал на липидный спектр их мембран [10].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ЭЛС на гемореологические параметры и липидный состав мембран эритроцитов в условиях модели стрептозотоцин-индуцированного диабета.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 24 крысах-самцах Wistar, массой 230-250 г, полученных из лаборатории экспериментального биомоделирования ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН, г. Томск. Экспериментальные животные по микробиологическому статусу относятся к конвенциональным, крысы содержались по 8 особей в поликарбонатных клетках (тип 825 см²), на стандартном рационе вивария. Животные в ходе эксперимента имели свободный доступ к воде и пище. Эвтаназию животных проводили СО₂-камере. Модель сахарного диабета создавали путем однократного внутривентриального введения стрептозотоцина («Sigma-Aldrich», USA) в дозе 50 мг/кг [15]. Верификацию сахарного диабета осуществляли определением глюкозы в крови биосенсорным глюкозооксидазным методом с помощью портативного прибора «SmartScan» («Johnson & Johnson

company», USA). Для исследований отбирали животных с содержанием глюкозы в крови не менее 15 ммоль/л. ЭЛС растворяли в дистиллированной воде и вводили опытным животным с момента развития выраженной гипергликемии (через 2-е суток после введения стрептозотоцина) в дозе 150 мг/кг внутривентриально ежедневно в течение 14 дней. Контрольные животные получали эквивалентное количество дистиллированной воды. В экспериментах использовали дозу экстракта, равную 150 мг/кг; в этой дозе ЭЛС проявлял выраженную гемореологическую активность в условиях моделей синдрома повышенной вязкости крови сердечно-сосудистого генеза [8, 9]. ЭЛС был стандартизирован по содержанию экидистероидов хромато-спектрофотометрическим методом [12]: концентрация суммы экидистероидов в ЭЛС составляла 2,7% в пересчете на сухую массу. Кровь для исследований забирали из общей сонной артерии и стабилизировали 3,8% раствором натрия цитрата в соотношении 9:1. Вязкость цельной крови и плазмы определяли на ротационном гемовискозиметре АКР-2. Гематокрит измеряли методом центрифугирования в стеклянных капиллярах (центрифуга РС-6, 2000 об./мин, 15 мин). Обратимую агрегацию эритроцитов оценивали силлектометрическим методом на модифицированном микроколориметре МКМФ-1 с графической регистрацией на графопостроителе Н306 [7] и рассчитывали Т1/2 (полупериод агрегации эритроцитов) – время, за которое величина исходного фотометрического сигнала снижается в два раза. Концентрацию фибриногена в плазме находили фотометрическим методом по Klausс на гемокоагулометре Cormay

KG-4 (Польша). Деформируемость эритроцитов определяли методом эктацитометрии [13]; показатель оценивали по индексу деформируемости эритроцитов (ИДЭ), рассчитываемому как отношение $(L-H)/(L+H)$, где L и H – соответственно больший и меньший диаметры первого дифракционного максимума.

Тени эритроцитов для изучения липидного состава их мембран получали по методу J.T. Dodge, et al. [14]. Липидный экстракт получали методом J. Folch [16]. Уровень общих липидов в мембранах эритроцитов оценивали по цветной реакции с фосфорно-ванилиновым реактивом [5]. Общее содержание фосфолипидов определяли по реакции с ферротрицианатом аммония [6]. Содержание отдельных фракций фосфолипидов: фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СМ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС) и лизофосфолипидов (ЛФЛ) оценивали после разделения их методом одномерной восходящей хроматографии на пластинках «Silufol UV 254» [11].

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ «Statistica for Windows 6.0». Рассчитывали среднее значение, ошибку среднего значения, межгрупповые различия оценивали при помощи t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест). Для определения взаимосвязи между исследуемыми показателями использовали метод ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение

Исходная концентрация глюкозы в крови крыс составила $6,3 \pm 0,1$ ммоль/л. К концу эксперимента содер-

жание глюкозы в крови крыс составило $18,2 \pm 1,1$ ммоль/л, что в 3 раза выше значений у интактных животных и свидетельствует о формировании стойкой формы сахарного диабета.

Гемореологические параметры крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом значительно отличались от показателей интактных животных. Так, в сравнении со значениями у интактных крыс, у животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом вязкость крови при скоростях сдвига $3-300 \text{ с}^{-1}$ возрастала на 13–45% (рис.), полупериод агрегации эритроцитов ($T_{1/2}$) снижался на 51%, концентрация фибриногена увеличивалась на 13% в сравнении с интактными значениями (табл. 1).

При стрептозотоцин-индуцированном диабете ИДЭ при скоростях сдвига $90-890 \text{ с}^{-1}$ уменьшался на 12-18% (табл. 1). Вязкость плазмы и показатель гематокрита у животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом достоверно не отличались от значений интактных животных (табл. 1). У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом показатель доставки кислорода к тканям снижался при скоростях сдвига $50-300 \text{ с}^{-1}$ на 11-22% в сравнении с интактными значениями (рис.).

Формирование СПВК при стрептозотоцин-индуцированном диабете происходит, в значительной степени, за счет изменения гемореологических показателей (агрегация и деформируемость эритроцитов). Об этом свидетельствуют результаты корреляционного анализа. У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом выявлена высокая степень взаимосвязи между вязкостью крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига ($3-300 \text{ с}^{-1}$)

Таблица 1

Влияние курсового (14 дней) внутрижелудочного введения экстракта левзеи сафлоровидной (ЭЛС) в дозе 150 мг/кг на вязкость плазмы (ВП, мПа·с), полупериод агрегации эритроцитов ($T_{1/2}$, с), гематокрит (Ht, %), концентрацию фибриногена (Fb, г/л), индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ, усл. ед.) при различных скоростях сдвига у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом

| Группа | ВП | Fb | Ht | $T_{1/2}$ | ИДЭ | | | |
|-----------------|---------|-----------|------|-----------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | | | | 90 с ⁻¹ | 180 с ⁻¹ | 360 с ⁻¹ | 890 с ⁻¹ |
| Интактные (n=8) | 1,3±0,1 | 2,50±0,10 | 45±1 | 10,1±0,8 | 0,133±0,008 | 0,218±0,012 | 0,321±0,009 | 0,432±0,027 |
| Контроль (n=8) | 1,4±0,1 | 2,82±0,18 | 45±1 | 5,2±0,4* | 0,113±0,003* | 0,178±0,002* | 0,262±0,007* | 0,360±0,003* |
| ЭЛС (n=8) | 1,3±0,1 | 2,36±0,11 | 45±1 | 7,9±0,5** | 0,131±0,010* | 0,200±0,010* | 0,291±0,007* | 0,399±0,006* |

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с интактными; + – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

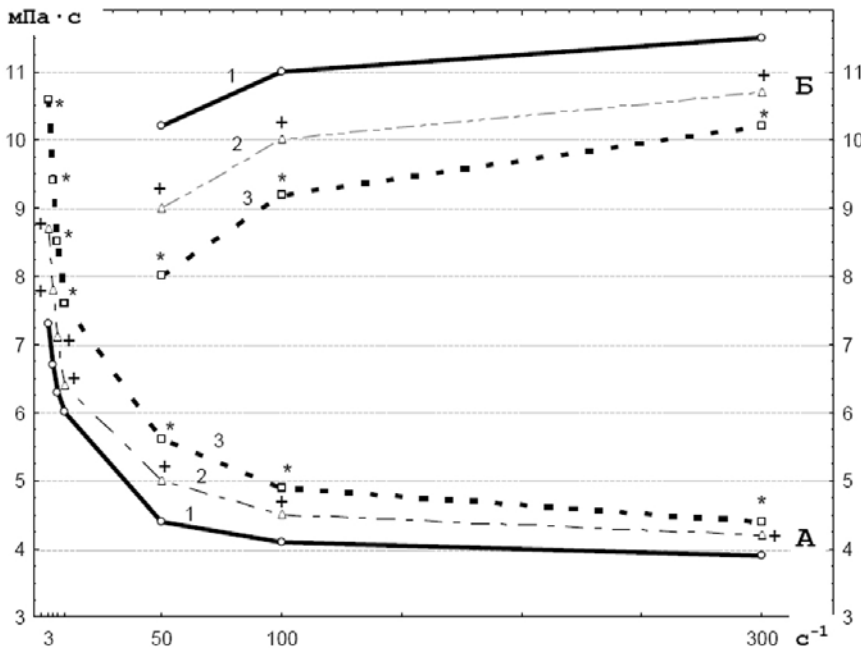


Рис. Влияние курсового (14 дней) внутрижелудочного введения экстракта левзеи сафлоровидной (ЭЛС) в дозе 150 мг/кг на вязкость крови (А) и показатель доставки кислорода к тканям (Б) у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом: 1 – интактные животные; 2 – опыт (стрептозотоцин-индуцированный диабет + ЭЛС); 3 – контроль (стрептозотоцин-индуцированный диабет).

* – $p < 0,05$ в сравнении с интактными; + – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

и деформируемостью эритроцитов в диапазоне скоростей сдвига 90–890 с⁻¹ ($r = -0,73-0,81$; $p < 0,05$). Отрицательная взаимосвязь обнаружена между концентрацией фибриногена и полупериодом агрегации эритроцитов ($r = -0,74$; $p < 0,05$).

При стрептозотоцин-индуцированном диабете усиление агрегации и снижение деформируемости эритроцитов вносят значительный вклад в развитие СПВК, в связи с этим особый интерес вызывает состояние липидного состава мембран красных клеток.

У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом происходило снижение содержания общих липидов на 33% и общих фосфолипидов на 32% в сравнении со значениями у интактных животных (табл. 2). У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом происходило снижение всего спектра фосфолипидов в мембранах эритроцитов, однако максимальным было уменьшение содер-

жания ФХ по сравнению с интактными значениями (до $0,177 \pm 0,010$ мг/мг белка), ФЭА (до $0,109 \pm 0,006$ мг/мг белка) и ФС (до $0,096 \pm 0,004$ мг/мг белка) (табл. 2). В эритроцитарных мембранах крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом увеличилось содержание лизофосфолипидов до $0,112 \pm 0,006$ мг/мг белка (табл. 2). Избыточное накопление ЛФЛ ведет к снижению температуры фазового перехода, что повышает внутреннюю подвижность мембран и меняет упаковку в ней липидов [4]. Кроме того, повышение в мембране ЛФЛ способствует переходу липидного бислоя в монослой, возрастанию проницаемости мембран для ионов Na⁺ и K⁺, образованию гидрофильных каналов с последующей везикуляцией мембраны эритроцита и диск-эхиноцитарной трансформацией [4]. При стрептозотоцин-индуцированном диабете произошло изменение соотношения фосфолипидов внутреннего и наружного слоя мембран эритроцитов. Так, происходило снижение процентно-

Таблица 2

Влияние курсового (14 дней) внутрижелудочного введения экстракта левзеи сафлоровидной (ЭЛС) в дозе 150 мг/кг на содержание в мембранах эритроцитов белка (в мг/мл суспензии теней эритроцитов), общих липидов (в мг/мг белка), общих фосфолипидов (в мг/мг белка), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СМ) и лизофосфолипидов (ЛФЛ) у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом

| Группа | Белок | Общие липиды | Общие фосфолипиды | ФЭА | ФС | ФХ | СМ | ЛФЛ |
|-----------------|-----------|--------------|-------------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Интактные (n=8) | 4,63±0,35 | 2,10±0,18 | 1,04±0,14 | 0,216±0,015 | 0,220±0,008 | 0,342±0,011 | 0,188±0,014 | 0,074±0,007 |
| Контроль (n=8) | 4,68±0,19 | 1,41±0,07* | 0,71±0,04* | 0,109±0,006* | 0,096±0,004* | 0,177±0,010* | 0,220±0,011* | 0,112±0,006* |
| ЭЛС (n=8) | 4,73±0,12 | 1,61±0,09 | 0,98±0,06* | 0,191±0,015 ⁺ | 0,152±0,009** | 0,234±0,018** | 0,280±0,019** | 0,092±0,005** |

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с интактными; ⁺ – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

го содержания фосфолипидов внутреннего слоя мембраны – ФЭА (с 21% у интактных животных до 15% в контроле) и ФС (с 21% у интактных животных до 13% в контроле); в наружном слое – снизилось процентное содержание ФХ (с 33% у интактных животных до 25% в контроле), с одновременным повышением доли СМ (с 18% у интактных животных до 31% в контроле).

Таким образом, у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом наблюдается комплекс гемореологических нарушений, проявляющийся в повышении вязкости крови, усилении агрегации и снижении деформируемости эритроцитов. В основе нарушения микрореологических свойств эритроцитов при стрептозотоцин-индуцированном диабете лежат патологические изменения липидного состава их мембран, что подтверждается обнаруженной положительной корреляционной взаимосвязью между вязкостью крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига ($3-300 \text{ c}^{-1}$) и содержанием сфингомиелина в эритроцитарных мембранах ($r = 0,69-0,74$; $p < 0,05$). Накопление сфингомиелина в мембранах эритроцитов свидетельствует о превалировании в клетке деструктивных процессов [2].

В результате курсового введения ЭЛС крысам со стрептозотоцин-индуцированным диабетом происходило существенное ослабление СПВК. Так, в группах диабетических животных, получавших ЭЛС, вязкость крови при скоростях сдвига $3-300 \text{ c}^{-1}$ снижалась на 5-18% в сравнении с контрольными значениями (рис.). При этом показатель доставки кислорода к тканям у крыс со

стрептозотоцин-индуцированным диабетом, леченных ЭЛС, повышался на скоростях сдвига $50-300 \text{ c}^{-1}$ на 5-12% в сравнении с контрольными значениями (рис.). Курсовое введение ЭЛС крысам с моделью стрептозотоцин-индуцированного диабета не оказывало существенного влияния на макрореологические параметры: вязкость плазмы и гематокрит достоверно не различались в опытной и контрольной группах (табл. 1). Напротив, под влиянием ЭЛС существенно улучшались показатели клеточной реологии крови. Полупериод агрегации эритроцитов ($T_{1/2}$) был на 52% больше в группе крыс, получавших ЭЛС, в сравнении с контрольной группой, и практически достигал значений у интактных животных (табл. 1). Курсовое введение ЭЛС крысам со стрептозотоцин-индуцированным диабетом способствовало увеличению ИДЭ при скоростях сдвига $90-890 \text{ c}^{-1}$ на 11-16% в сравнении с контролем, и значения этого показателя были близки к таковым у интактных животных (табл. 1). Тот факт, что снижение вязкости крови происходило, в основном, за счет влияния ЭЛС на агрегацию и деформируемость эритроцитов, подтверждается данными корреляционного анализа. Корреляционный анализ выявил высокую степень отрицательной взаимосвязи между вязкостью крови при скоростях сдвига $100-300 \text{ c}^{-1}$ и деформируемостью эритроцитов при скоростях сдвига $90-360 \text{ c}^{-1}$ ($r = -0,75-0,83$; $p < 0,05$), вязкостью крови в диапазоне скоростей сдвига $3-50 \text{ c}^{-1}$ и полупериодом агрегации эритроцитов ($r = -0,75-0,83$; $p < 0,05$).

У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, получавших ЭЛС, содержание общих липидов воз-

росло на 14%, однако эти различия имели характер тенденции. Курсовое применение ЭЛС в течение 14 дней в дозе 150 мг/кг приводило к достоверному возрастанию общего содержания фосфолипидов на 38% (с $0,71 \pm 0,04$ в контроле до $0,98 \pm 0,06$ в опытной группе). Уровень общих фосфолипидов у животных со стрептозотозин-индуцированным диабетом, получавших ЭЛС, не отличался от значений интактных животных (табл. 2). При стрептозотозин-индуцированном диабете курсовое применение ЭЛС способствовало восстановлению до уровня интактных животных содержания ФЭА (с $0,109 \pm 0,006$ до $0,191 \pm 0,015$ мг/мг белка) (табл. 2). Содержание ФС, ФХ и СМ увеличивалось на 58%, 32% и 27% соответственно при использовании ЭЛС, в сравнении с контрольными значениями (табл. 2). В результате лечения ЭЛС у крыс со стрептозотозин-индуцированным диабетом происходило снижение уровня ЛФЛ на 22% в сравнении с контролем (табл. 2). ЭЛС препятствует избыточному накоплению ЛФЛ, что рассматривается как весьма положительный эффект исследуемого препарата, поскольку от количества ЛФЛ в мембране зависит сохранение эритроцитами дискоидной формы [4]. Курсовое применение ЭЛС оказывало положительное влияние на соотношение фосфолипидов внутреннего (ФЭА и ФС) и наружного (ФХ и СМ) слоев в мембранах эритроцитов крыс со стрептозотозин-индуцированным диабетом, что также способствует повышению стабильности мембран эритроцитов в условиях модели стрептозотозин-индуцированного диабета.

К концу эксперимента в группе жи-

вотных, получавших ЭЛС, уровень глюкозы крови составил $12,2 \pm 1,4$ ммоль/л, что на 33% достоверно ниже значений этого показателя в контрольной группе ($18,2 \pm 1,1$ ммоль/л). Масса крыс со стрептозотозин-индуцированным диабетом, получавших ЭЛС, составила 268 ± 7 г, что на 12% достоверно выше в сравнении со значениями в контроле (240 ± 5 г).

Выводы

1. В условиях модели стрептозотозин-индуцированного диабета курсовое введение ЭЛС способствует снижению вязкости крови, агрегации эритроцитов, улучшению деформируемости красных клеток и повышению показателя доставки кислорода к тканям.

2. Одним из механизмов гемореологической активности ЭЛС при стрептозотозин-индуцированном диабете является способность исследуемого экстракта оказывать положительное воздействие на липидный состав эритроцитарных мембран.

3. Антидиабетическая активность ЭЛС заключается в проявлении гипогликемического эффекта и в предотвращении потери массы тела крыс со стрептозотозин-индуцированным диабетом.

Список литературы

1. *Васильев А.С., Плотников М.Б., Алиев О.И., Плотникова А.М., Калинин Г.И., Ангаскиева А.С., Смолякова И.М.* Гемореологическая активность экстрактов из содержащих экидистероиды растений при сахарном диабете у крыс // Химия и технология растительных веществ: Тез. докл. IV Всероссийской науч. конф. Сыктывкар. 2006. 236 с.

2. **Васильева Е.М.** Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии (обзор литературы) // Биомед. химия. 2005. № 2. С. 118-126.
3. **Галенок В.А., Гостинская Е.В., Диккер В.Е.** Гемореологические нарушения при сахарном диабете // Терапевтический архив. 1982. № 10. С. 128-132.
4. **Грибанов Г.А.** Особенности структуры и биологическая роль лизофосфолипидов // Вопр. мед. химии. 1991. № 4. С. 2-10.
5. **Колб В.Г., Камышников В.С.** Справочник по клинической биохимии. Минск. 1982. 366 с.
6. **Пентюк А.А., Гуцол В.И., Яковлева О.А. и др.** Определение фосфолипидов по образованию гидрофобного комплекса с ферротиазиатом аммония // Лаб. дело. 1987. № 6. С. 457-460.
7. **Плотников М.Б., Алиев О.И., Попель Ф.В.** Модификация микроколориметра МКМФ-1 для регистрации агрегации эритроцитов // Клин. лаб. диагностика. 1995. № 3. С. 457-458.
8. **Плотников М.Б., Зибарева Л.Н., Колтунов А.А., Алиев О.И., Якимова Т.В., Маслов М.Ю.** Гемореологические свойства экстрактов из некоторых растений, содержащих экидистероиды // Растит. ресурсы. 1998. № 1. С. 91-96.
9. **Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Маслов М.Ю., Дмитрук С.Е., Краснов Е.А.** Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на реологические свойства крови у крыс с артериальной гипертензией // Эксперим. и клинич. фармакология. 2001. № 6. С. 45-47.
10. **Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Андреева В.Ю., Краснов Е.А., Калинин Г.И.** Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на структурно-метаболическое состояние эритроцитов при ишемии головного мозга у крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2008. № 7. С. 50-53.
11. **Финдлей Дж., Эванс У.** Биологические мембраны: методы. М.: Мир. 1990. 425 с.
12. **Якубова М.Р., Генкина Г.Л., Шакиров Т.Т., Абубакиров Н.К.** Хроматоспектрофотометрический метод определения экидистерона в растительном сырье // Химия природ. соединений. 1978. № 6. С. 737-740.
13. **Bessis M., Mohandas N.A.** diffractometric method for the measurement of cellular deformability // Blood Cells. 1975. Vol. 1. P. 307-313.
14. **Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes // Arch. Biochem. Bioph. 1963. Vol. 100. P. 119-130.
15. **Ferner R.E.** Drug-induced diabetes. Bailliers Clin. Endocrinol. Metab. 1992. Vol. 6. № 4. P. 849-866.
16. **Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.A.** simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497-509.
17. **McMillan D.E., Gion K.M.** Glucosylated hemoglobin and reduced erythrocyte deformability in diabetes // Horm. Metab. Res. Suppl. 1981. Vol. 11. P. 108-112.

-
18. **Schwartz R.S., Madsen J.W., Rybicki A.C., Nagel R.L.** Oxidation of spectrin and deformability defects in diabetic erythrocytes // *Diabetes*. 1991. Vol. 40. P. 701-708.
19. **Simpson L.O.** Blood viscosity and diabetes mellitus // *N. Z. Med. J.* 1988. Vol. 101. P. 550.
20. **Veiraiah A.** Hyperglycemia, lipoprotein glycation, and vascular disease // *Angiology*. 2005. Vol. 56. № 4. P. 431-438.

The hemorheological activity of extract from *Rhaponticum carthamoides* in streptozotocin-induced diabetic rats

A.S. Vasil'ev, M.B. Plotnikov, O.I. Aliev, Z.T. Shulgau

Rats with streptozotocin-induced diabetes have the hemorheological disturbances which appeared in increase of blood viscosity, elevation of erythrocyte aggregation and decrease of red blood cell deformability. In streptozotocin-induced diabetic rats the concentrations of total lipids, phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine) were decreased and contemporary the content of sphingomyelin and lysophospholipids were enhanced. Administration of extract from *Rhaponticum carthamoides* (150 mg/kg, i.g., during 14 days) contributed to the decrease of blood viscosity, depression of erythrocyte aggregation, improve of erythrocyte deformability and increase of blood's overall oxygen transport capacity in comparison with controls. Streptozotocin-induced diabetic rats, treated with *Rhaponticum carthamoides* extract showed the elevation of total lipids, restored phospholipids ratio of external monolayer (phosphatidylcholine, sphingomyelin) and internal monolayer (phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine) and also diminution of lysophospholipids in erythrocyte membranes. Extract from *Rhaponticum carthamoides* contributed to reduction of glucose level in blood and prevent of reduction body mass of streptozotocin-induced diabetic rats.

Key words: extract from *Rhaponticum carthamoides*, streptozotocin-induced diabetes, hemorheology, phospholipids.



Возможности медикаментозной коррекции напряжения кислорода в крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью

В.Г. Кулес, А.Б. Прокофьев, О.А. Горошко, О.А. Чеча

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

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

Контактная информация: Горошко Ольга Александровна, elmed@yandex.ru

При гипоксических состояниях различного генеза уменьшается сродство гемоглобина к кислороду за счет увеличения синтеза 2,3-дифосфоглицерата. Курсовое введение этилметилгидроксипиридина малата способствует восстановлению активности 2,3-ДФГ и нормализации парциального напряжения кислорода крови пациентов ХСН в течение 5 дней.

Ключевые слова: 2,3-дифосфоглицерат, гипоксия, хроническая сердечная недостаточность, кислород, этилметилгидроксипиридина малат.

Проблема фармакологической коррекции гипоксии, являющейся универсальным процессом на уровне клетки при всех критических состояниях, относится к числу приоритетных [1, 2]. Для купирования негативных изменений в органах, возникающих при критических состояниях организма, необходимо обеспечить как минимум раннюю коррекцию энергетического обмена и восстановления гомеостаза клеточных и субклеточных мембран [3, 4]. По мнению ряда авторов [5], одними из самых перспективных фармакологических классов для неотложной медицины являются антигипоксанты. Клинические наблюдения и экспериментальные исследования показали, что наличие антиоксидантных свойств у большинства препаратов мета-

болического действия усиливает их антигипоксический эффект [5- 8].

Индукция лекарственными средствами активности АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) может быть полезной при отделении 4-х атомов кислорода от 4-х глобул гемоглобина у тяжелых больных с ХОБЛ или у кардиологических больных [9-11]. Однако работы, изучающие влияния лекарственных средств на активность 2,3-ДФГ, немногочисленны.

В связи с этим, **целью** нашей работы было изучение влияния курсового внутривенного введения лекарственного средства этилметилгидроксипиридина малата на содержание 2,3-ДФГ и напряжение кислорода в крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

Материалы и методы

Перед началом работы выполнялось исходное измерение напряжения кислорода (pO_2) крови и содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах пациентов ХСН II-IV ФК. Оценивалась динамика данных показателей после курсового внутривенного применения этилметилгидроксипиридина малата через 5 и 10 дней. Сравнение проводили с пациентами ХСН, которым не вводился данный препарат.

Обследовано 36 мужчин с хронической сердечной недостаточностью, II-IV ФК, находящихся на стационарном лечении в ГБУЗ «ГКБ № 23 им. «Медсантруд» ДЗМ». Пациенты были разделены на 2 группы. Группу контроля составили 15 человек (по 5 человек каждого ФК), которые получали стандартную фармакотерапию ХСН. В основную группу вошли 21 пациент (по 7 человек каждого ФК), которым к стандартной терапии добавляли внутривенные инфузии этилметилгидроксипиридина малата. Всем пациентам проводился забор крови из периферической вены до и после в/в введения этилметилгидроксипиридина малата. Первый забор крови – исходный – выполняли утром, натощак. Забор крови осуществляли в гепаринизированную пробирку из периферической вены в объеме 5 мл. Ежедневно, в одно и то же время, вводили струйно внутривенно 100 мг этилметилгидроксипиридина малата (препарат разрешен к внутривенному введению у пациентов с нарушением кровообращения и дисциркулярной энцефалопатией, согласно утвержденной МЗ РФ инструкции по применению препарата). Курс состоял из 10 дней. Контрольный забор крови осуществляли через 30 мин после первого введения, а также на 5-й и 10-й дни лечения.

Определение уровня 2,3-ДФГ в цельной крови производили ферментным методом с использованием набора реагентов фирмы «Rosh», кат. № 10 148 334 001, Германия. Содержание 2,3-ДФГ рассчитывали в г/л цельной крови.

Напряжение кислорода в венозной крови (mmHg) измеряли на газовом анализаторе Stat Profil pH/Ox Ultra (США). Образец крови тщательно перемешивали. Анализ проводили в пределах 15 мин с момента отбора.

Статистическая обработка и анализ полученных результатов проводились с использованием программных пакетов EXCEL 7.0, Statistica 6.0. Достоверность различий рассчитывали по парному критерию t-Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследований

У пациентов со II и III ФК ХСН исходные значения 2,3 ДФГ были несколько выше нормальных величин, а уровень pO_2 крови снижен. Наибольшее нарушение кислородтранспортной функции отмечалось у пациентов с IV ФК, у которых отмечалось трёхкратное снижение содержания 2,3 ДФГ, а уровень парциального напряжения кислорода крови был снижен на 23%.

Через 30 мин после внутривенного введения 100 мг этилметилгидроксипиридина малата у пациентов с ХСН II и III ФК концентрация органического фосфата достоверно снижалась до нормальных значений и достоверно повышалось парциальное напряжение кислорода крови. У больных с IV ФК ХСН концентрация 2,3-ДФГ достоверно повышалась, а напряжение кислорода в крови увеличивалось статистически значимо (табл. 1).

Таблица 1

Показатели системы транспорта кислорода до и после введения этилметилгидроксипиридина малата (1 день лечения)

| Тяжесть заболевания | 2,3 ДФГ, г/л крови | | рО ₂ , ммНг | |
|---------------------|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | До в/в введения | После в/в введения | До в/в введения | После в/в введения |
| II ФК ХСН | 0,44±0,038 | 0,35±0,02* | 31,5±1,77 | 38,8±1,67* |
| III ФК ХСН | 0,51±0,043 | 0,38±0,01* | 30,7±1,62 | 35,4±1,43* |
| IV ФК | 0,23±0,022 | 0,35±0,03* | 27,3±1,25 | 33,7±1,36* |

Примечание: * – различия с исходными данными статистически значимы (p=0,01).

Таблица 2

Показатели 2,3-ДФГ и рО₂ у больных ХСН через 5 дней лечения

| Показатель | Основная группа | | | Контрольная группа | | |
|--|-----------------|-------------|-------------|--------------------|------------|------------|
| | II ФК ХСН | III ФК ХСН | IV ФК ХСН | II ФК ХСН | III ФК ХСН | IV ФК ХСН |
| 2,3 ДФГ, г/л крови (до начала лечения) | 0,44±0,038 | 0,51±0,043 | 0,23±0,022 | 0,42±0,032 | 0,53±0,034 | 0,25±0,027 |
| 2,3 ДФГ, г/л крови (через 5 дней) | 0,40±0,027 | 0,43±0,036 | 0,32±0,024* | 0,45±0,026 | 0,51±0,029 | 0,28±0,022 |
| рО ₂ , ммНг (до начала лечения) | 31,5±1,77 | 30,7±1,620 | 27,3±1,25 | 30,5±1,73 | 30,0±1,44 | 26,1±1,21 |
| рО ₂ , ммНг (через 5 дней) | 35,7±1,23* | 34,8±1,418* | 32,8±1,17* | 32,4±1,50 | 31,9±1,47 | 28,3±1,30 |

Примечание: * – различия с исходными данными статистически значимы (p=0,01).

У пациентов основной группы после 5 дней лечения выявлено достоверное увеличение уровня 2,3-ДФГ только у больных с IV ФК, тогда как показатели парциального напряжения кислорода статистически значимо увеличились у больных всех ФК. В контрольной группе изменения были незначительными и статистически недостоверными (табл. 2).

После 10 дней лечения в основной группе сохранялось достоверное уве-

личение значений 2,3-ДФГ по сравнению с исходными данными у пациентов с ХСН IV ФК. Напряжение кислорода продолжало нарастать и увеличилось по сравнению с исходными значениями (на 20-22% у больных с II и III ФК, на 30% - с IV ФК), также статистически значимо. В контрольной группе отмечалось достоверное увеличение рО₂, хотя менее выраженное, чем в основной группе (на 15-20% от исходного состояния (табл. 3)).

Показатели 2,3-ДФГ и pO_2 у больных ХСН через 10 дней лечения

| Показатель | Основная группа | | | Контрольная группа | | |
|--|-----------------|------------|-------------|--------------------|------------|------------|
| | II ФК ХСН | III ФК ХСН | IV ФК ХСН | II ФК ХСН | III ФК ХСН | IV ФК ХСН |
| 2,3 ДФГ, г/л крови (до начала лечения) | 0,44±0,038 | 0,51±0,043 | 0,23±0,022 | 0,42±0,032 | 0,53±0,034 | 0,25±0,027 |
| 2,3 ДФГ, г/л крови (через 10 дней) | 0,38±0,021 | 0,40±0,031 | 0,35±0,024* | 0,45±0,026 | 0,51±0,029 | 0,28±0,022 |
| pO_2 , ммНг (до начала лечения) | 31,5±1,77 | 30,7±1,62, | 27,3±1,25 | 30,5±1,73 | 30,0±1,44 | 26,1±1,21 |
| pO_2 , ммНг (через 10 дней) | 38,9±1,18* | 37,7±1,20* | 35,8±1,03* | 35,2±1,36* | 36,3±1,32* | 30,5±1,27* |

Примечание: * – различия с исходными данными статистически значимы ($p=0,01$).

Обсуждение результатов

Результаты исследования показывают, что у тяжелых больных с IV степенью ХСН компенсаторный механизм развития гипоксии ослаблен, что заметно по снижению содержанию 2,3-ДФГ и низкому напряжению кислорода в крови. После введения этилметилгидроксипиридина малата концентрация этого органического фосфата повышается, уменьшается сродство гемоглобина к кислороду и, соответственно, увеличивается напряжение кислорода в крови.

Таким образом, внутривенное введение препарата по-разному влияет на уровень 2,3-ДФГ у больных с различными ФК ХСН. Данную реакцию можно, по-видимому, объяснить не только нормализацией 2,3-ДФГ, но и коррегирующим влиянием этилметилгидроксипиридина малата на дисметаболические явления в организме, одним из механизмов которого выступает восстановление процессов газообмена и оксигенации

крови в лёгких [8]. Через 5 дней применения препарата зафиксировано достоверное повышение уровня 2,3-ДФГ до нормальных значений в основной группе только у больных IV ФК ХСН, что не отмечалось в контрольной группе. Однако, что очень важно, введение препарата способствовало нормализации данного показателя у пациентов II и III ФК ХСН.

Через 10 дней в контрольной группе также зафиксировано достоверное увеличение pO_2 , что можно объяснить активным стандартным лечением ХСН, приводящим к увеличению оксигенации крови.

Заключение

Впервые установлено, что курсовое введение этилметилгидроксипиридина малата способствует восстановлению активности 2,3-ДФГ и нормализации парциального напряжения кислорода крови пациентов ХСН II-IV ФК уже через 5 дней лечения, что не отмечалось у паци-

ентов контрольной группы (приоритет на изобретение № 2013135976/20 (053994) от 30.07.2013 «Способ модуляции системы газообмена у пациентов с хронической сердечной недостаточностью»).

Список литературы

1. **Лукьянова Л.Д.** Современные проблемы и перспективы фармакологической коррекции гипоксических состояний. В кн: Фармакотерапия в неврологии и психиатрии. - М. 2002. С. 22-34.
2. **Смирнов А.В., Криворучко Б.И.** Антигипоксиканты в неотложной медицине // Анестезиология и реаниматология. 1998. № 2. С. 50-55
3. **Неговский В.А., Золотокрылина Е.С.** Постреанимационная болезнь. - М.: Медицина. 1987. 480 с.
4. **Лукьянчук В.Д., Савченкова Л.В.** Антигипоксиканты: состояние и перспективы // Эксперим. и клин. фармакология. 1998. № 61(4). С. 72-79.
5. **Лукьянова Л.Д.** Новые подходы к созданию антигипоксикантов метаболического действия // Вестник Росс. Акад. Мед. наук. 1999. № 3. С. 18-25.
6. **Столярова В.В.** Исследование кардиопротекторного действия препаратов с антиоксидантной активностью при острой ишемии головного мозга // Эксперим. и клин. фармакология. 2001. № 64(6). С. 31-33.
7. **Горошко О.А., Чеча О.А., Демченкова Е.Ю.** Способность цитофлавина влиять на антиоксидантную систему защиты организма // Биомедицина. 2011. № 4. С. 71-72.
8. **Каргаева Т.Н.** Изучение фармакологической активности этоксида при оксидативно-токсическом сердечно-лёгочном поражении: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саранск. 2011. 23 с.
9. **Байшукурова А.К.** Образование 2,3-ДФГ в эритроцитах при экспериментальных воздействиях, изменяющих условия транспорта кислорода // дисс. к.б.н. Ленинград. 1983. 135 с.
10. **Рядовой Г.В.** Содержание 2,3-ДФГ и его влияние на сродство к гемоглобину кислорода у больных после операции на открытом сердце // Анестезиология и реаниматология. 1990. № 5. С. 31-34.
11. **Киреев Р.А., Курмачева Н.А., Игнатов В.В.** Перекисное окисление липидов антиоксидантная защита и содержание 2,3-дифосфоглицерата у детей, больных сахарным диабетом 1 типа // Сахарный диабет. 2001. № 1. С. 13-14.

Possibilities of medicamentous correction of tension of oxygen in blood at patients with chronic heart failure

V.G. Kukes, A.B. Prokofiev, O.A. Goroshko, O.A. Checha

Under hypoxic conditions of different genesis decreases the affinity of hemoglobin for oxygen by increasing the synthesis of 2,3-diphosphoglycerate. Course administration ethylmethylhydroxypyridine malate promotes restoration of activity of 2,3-DPG and the normalization of blood oxygen tension in patients with CHF for 5 days.

Key words: 2,3-biphosphoglycerat, hypoxia, chronic heart failure, oxygen.

Значение изучения полиморфизма гена *ABCB1*, кодирующего гликопротеин Р, для оценки отношения ожидаемой польза к возможному риску применения бета-адреноблокаторов у русских беременных с хронической артериальной гипертензией

Е.А. Сокова, В.Г. Кулес

Центр клинической фармакологии ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, Москва

Контактная информация: Сокова Елена Андреевна, sokova2@rambler.ru

Цель работы заключалась в изучении ассоциации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с эффективностью и безопасностью терапии бисопрололом у беременных с хронической артериальной гипертензией (ХАГ) I и II степени. Генетическое тестирование по идентификации аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* проводилось у 65 русских беременных с ХАГ I и II степени и 86 практически здоровых беременных женщин, которые находились под наблюдением во II и III триместрах беременности. Результаты исследования свидетельствуют об отсутствии различий в частотах аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* между группами беременных с различным режимом дозирования бисопролола. Впервые установлены ассоциации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с весом и оценкой по шкале Апгар 1-2 новорожденных, рожденных от русских женщин с ХАГ при лечении бисопрололом.

Ключевые слова: гликопротеин Р, полиморфизм гена *ABCB1*, беременность, хроническая артериальная гипертензия, бета-адреноблокатор.

До настоящего времени вопрос об отношении ожидаемой пользы к возможному риску длительного применения антигипертензивных лекарственных средств (ЛС) у беременных женщин с хронической артериальной гипертензией (ХАГ) I и II степени на различных сроках гестации по-прежнему остается предметом дискуссий [1-3]. Беременные женщины с ХАГ составляют группу повышенного риска по акушерским осложнениям, при этом эффективное снижение АД для матери может быть сопряжено с ухудшением маточно-плацентарного кровотока, гемодинамики и

задержкой внутриутробного развития (ЗВУР) плода [4, 5]. Практически все антигипертензивные препараты, проникая через плаценту, потенциально способны оказывать нежелательное влияние на плод, новорожденного и/или постнатальное развитие ребенка [4, 6, 7].

Согласно современным рекомендациям по ведению беременных с АГ, препаратами, отвечающими требованиям к рациональной фармакотерапии, названы β -адреноблокаторы (β -АБ) [8, 9]. Результаты проведенных мета-анализов по лечению ХАГ I и II степени у беременных показали, что пероральный прием β -АБ

снижает риск развития тяжелой гипертензии и необходимость назначения дополнительной антигипертензивной терапии [1, 10]. В то же время остается недоказанным тот факт, что ЗВУР плода, хроническая внутриутробная гипоксия плода, преждевременные роды, рождение новорожденных с малым гестационным сроком связаны лишь с наличием ХАГ у матери [11].

По мнению ряда исследователей, главным вопросом, определяющим индивидуальный фармакологический ответ матери и плода, являются особенности функционирования системы биотрансформации и транспортеров ЛС в материнско-плацентарно-плодном комплексе [12, 13]. В последнее время большое внимание уделяется исследованию АТФ-зависимых транспортеров ЛС как «активного компонента» плацентарного барьера [14]. Гликопротеин Р – первый из открытых и наиболее изученный транспортер ЛС – экспрессирован на материнской стороне плацентарной мембраны синцитиотрофобласта, удаляет ксенобиотики и ЛС из системы кровообращения плода в систему кровообращения матери. Генетический полиморфизм гена *ABCB1*, кодирующего гликопротеина Р (наиболее изучены полиморфные маркеры *C1236T* и *C3435T*), вносит определенный вклад в межиндивидуальную вариабельность концентрации его ЛС-субстратов, что приводит к различиям в их эффективности и безопасности [12, 15]. Результаты, полученные исследователями в эксперименте и в клинике, демонстрируют вклад гликопротеина Р в регуляцию артериального давления, возможно, через ренин-ангиотензин-альдостероновую

систему, участие некоторых *ABC*-транспортеров (*ABCB1* и *ABCG2*) в ограничении поступления и распределения ЛС в «таргетные» органы [16, 17, 18]. Однако о влиянии этих протеинов и их полиморфизмов на эффективность и безопасность применения антигипертензивных препаратов - β -АБ известно мало. В литературе мы не встретили работ, посвященных изучению полиморфизмов гена *ABCB1*, кодирующего гликопротеин Р, у беременных ХАГ. Указанные обстоятельства послужили причиной выбора направления настоящего исследования, т.е. изучения ассоциации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с эффективностью и безопасностью терапии бисопрололом у русских беременных женщин с ХАГ I и II степени.

Материалы и методы

Генетическое тестирование по идентификации аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* проведено у 65 беременных с ХАГ I и II степени и 86 практически здоровых беременных женщин, которые находились под наблюдением во II и III триместрах беременности (средний возраст - $29,62 \pm 0,67$). Национальность обследованных женщин устанавливалась на основании их устного опроса. Обследование и лечение пациенток с ХАГ проводилось на базе специализированного кардиологического отделения для беременных ГКБ № 67, группа практически здоровых беременных обследована на базе женской консультации ГКБ № 71. Перед началом исследования было получено разрешение Регионального Этического комитета. Отбор пациенток для исследования проводился согласно кри-

териям включения/невключения во II триместре беременности (14-16 недель гестации). Диагноз ХАГ устанавливали в соответствии с классификацией АГ при беременности [8, 9, 19].

Генотипирование проводили методом ПЦР-ПДРФ по полиморфному маркеру *C3435T* гена *MDR1*. Образцы ДНК предварительно выделялись из лейкоцитов стандартным фенольным методом.

Всем пациенткам с ХАГ, соответствующим критериям включения и невключения, назначали Биспролол (Конкор[®], «Никомед») в начальной дозе 2,5 мг/сут (или 5 мг/сут – пациенткам с ХАГ II степени), с последующим титрованием дозы на 2,5 мг до достижения целевых значений 10 мг/сут на последующих визитах. При неэффективности проводимой терапии беременным назначали Нифекард XL[®] («ЛЕК», Словения) 30 мг/сут.

Эффективность проводимой терапии оценивали по динамике клинических симптомов, показателям физикального осмотра и динамике показателей лабораторно-инструментальных методов обследования. Первичным критерием отличной оценки эффективности считали снижение уровня офисного АД и всех стандартных показателей СМАД до целевых уровней. Оценка безопасности включала мониторинг и регистрацию нежелательных явлений на протяжении всего исследования. Критериями безопасности лечения считали отсутствие нежелательных явлений во время исследования при оценке причинно-следственной связи с исследуемым препаратом, отсутствие атриовентрикулярных блокад (AV-блокад) по

ЭКГ и мониторингу ЭКГ по Холтеру (ХМ-ЭКГ), отсутствие негативного влияния на маточно-плацентарный кровоток и данные кардиотокографии (КТГ).

Статистическую обработку полученных в ходе исследования результатов проводили с помощью программы Statistica for Windows 6.0 (StatSoft Inc.). Достоверность наблюдаемых различий качественных показателей оценивали методом хи-квадрат, при необходимости использовали поправку Йетса, двусторонний критерий Фишера. Уровень достоверности был принят как достаточный при $p < 0,05$. При проведении корреляционного анализа использовалась τ (тау) – корреляция Кендалла.

Результаты исследований

На фоне назначенного лечения при повторном обследовании показатели САД и ДАД у 14 пациенток не достигли целевых уровней, хотя и произошло достоверное снижение всех показателей СМАД (табл. 1). Была проведена коррекция антигипертензивной терапии, в результате которой большинство пациенток (26 чел.) получали Конкор[®] в дозе 2,5 мг/сут, 21 пациентка – 5 мг/сут Конкора[®], 9 беременных – 10 мг/сут Конкора[®], а 9 пациенткам проводили комбинированную терапию (Нифекард XL[®] 30 мг/сут и 2,5 мг/сут Конкор[®]). Анализ показателей СМАД в III триместре беременности выявил достоверную тенденцию к повышению основных стандартных показателей САД и ДАД у всех пациенток по сравнению со II триместром беременности. Полный курс лечения прошли все включенные в исследование беременные, кроме двух

**Показатели СМАД у пациенток с ХАГ
во II-III триместрах беременности Me (25%; 75%)**

| Наименование показателя | До лечения 0-1 визит | На фоне лечения 2 визит | В III триместре 3 визит |
|-------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 14-16 неделя | 17-19 неделя | 30-34 неделя |
| ГН, САД, % | 50,1 (35;60) | 20,9 (6;32)* | 29,6 (9;45)*, ** |
| ГН, ДАД, % | 39,4 (22;50) | 15,2 (2;25)* | 23,7 (5;32)*, ** |
| Ср САД дн, мм рт.ст. | 140,3 (131;146) | 126,1 (119; 131)* | 128,6 (121;134)*, ** |
| Ср ДАД дн, мм рт.ст. | 88,8 (83;93) | 76,4 (71;81)* | 79,7 (76;84)*, ** |
| Ср САД н, мм рт.ст. | 126,6 (119;131) | 114,8 (105;122)* | 118,4 (109;125)*, ** |
| Ср ДАД н, мм рт.ст. | 76,3 (71;81) | 65,1 (56;70)* | 70,1 (63;78)*, ** |
| Мах САД дн, мм рт.ст. | 164,9 (155;170) | 153,3 (143;160)* | 154,1 (143;163)* |
| Мах ДАД дн, мм рт.ст. | 105,6 (98;110) | 95,8 (86;101)* | 96,4 (89;101)* |
| ЧСС ср, уд/мин. | 88,4 (83;93) | 77,5 (75;80)* | 79,4 (75;82)* |

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «беременные с ХАГ до лечения»; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой «беременные с ХАГ на фоне лечения».

пациенток с ХАГ II степени, досрочно выбывших на 3-4 визитах в связи развитием ЗВУР плода и последующим самопроизвольным абортom.

Анализ показателей доплерографии маточно-плацентарного кровообращения выявил: у трех женщин – сочетанное нарушение маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровообращения (II степень); у пяти – нарушение маточно-плацентарного кровообращения (IA степень); у одной пациентки – нарушение плодово-плацентарного кровотока (IB степень). По результатам ХМ-ЭКГ в III триместре беременности у 26-и беременных (40%) были зарегистрированы единичные наджелудочковые и желудочковые экстрасистолы в количестве от 10 до 100 в сутки, развития АВ-блокад, связанных с применением

β -АБ, в группе обследуемых пациенток мы не наблюдали. У семи беременных (35%) были изменены показатели КТГ, что составило, в среднем, 6-7 баллов по Фишеру.

Наблюдаемая гетерогенность по показателям эффективности и безопасности на фоне лечения Конкором® и Нифедикардом XL® позволила предположить влияние на эти показатели генетических факторов.

Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* у пациенток с ХАГ и в контрольной группе беременных подчинялись закону Харди-Вайнберга. Результаты генетического тестирования частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* свидетельствовали об отсутствии ассоциации изученного

Таблица 2

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* в подгруппах с различным режимом дозирования Конкора® у беременных с ХАГ

| Наименование аллеля и генотипа | Распределение аллелей и генотипов у беременных с ХАГ с различным режимом дозирования Конкора®, чел., (%) | | | χ^2 | p |
|--------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|----------|-------|
| | Конкор® 2,5 мг N=26* | Конкор® 5,0 мг N=21* | Конкор® 10,0 мг N=9* | | |
| 3435C | 22(43,3) | 20(47,6) | 9(50,0) | 0,437 | 0,804 |
| 3435T | 30(57,7) | 22(52,4) | 9(50,0) | | |
| 3435TT | 7(27,0) | 7(33,3) | 3(33,3) | 4,287 | 0,369 |
| 3435CT | 16(61,5) | 8(38,1) | 3(33,3) | | |
| 3435CC | 3(11,5) | 6(28,6) | 3(33,3) | | |

Примечание: * – N – количество пациентов.

маркера с ХАГ и тяжестью ее течения у русских беременных женщин [20].

Была выявлена слабая обратная значимая корреляция дозы Конкора® и наличия аллеля *3435T* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* ($\tau=-0,19$; $p=0,027$). Принимая во внимание данные корреляционного анализа, мы проанализировали результаты генетического тестирования по полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* относительно дозы антигипертензивного препарата Конкора®, получаемого пациентками в течение настоящей беременности (табл. 2). Различия между группами беременных с различным режимом дозирования β -АБ Конкора® по частотам аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* оказались статистически незначимыми ($p=0,804$ и $p=0,369$ соответственно), что позволило сделать вывод об отсутствии ассоциации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с эффективностью терапии β -АБ бисопрололом.

Индивидуальный анализ показал, что у новорожденных весом меньше 2500 г в 100% случаев отмечался генотип *3435TT* по полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1*. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, величина веса новорожденного менее 2500 г используется большинством исследователей в качестве критического порогового уровня. Принимая во внимание результаты индивидуального анализа, мы изучили ассоциацию полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с весом новорожденных (табл. 3). Все новорожденные были разделены на 4 группы: начиная с критического веса в 2500 г с разницей в 500 г. В группе новорожденных весом <2500 г матери с ХАГ имели генотип *3435TT* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* в 100% случаев. Различия в частотах генотипов и аллелей полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* в соответствующих группах матерей были

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* у матерей с ХАГ в зависимости от веса новорожденных

| Наименование аллеля и генотипа | Распределение аллелей и генотипов у матерей с ХАГ в зависимости от веса новорожденных, чел., (%) | | | | χ^2 | p |
|--------------------------------|--|--------------------|--------------------|----------------|----------|-------|
| | <2500 N=5* | 2500-3000 N=24* | 3000-3500 N=26* | >3500 N=10* | | |
| 3435CC | 0(0,0) | 6(25) | 6(23,0) | 1(10) | 18,849 | 0,001 |
| 3435CT | 0(0,0) | 14(58,3) | 10(38,5) | 8(80) | | |
| 3435TT | 5(100) | 4(16,7) | 10(38,5) | 1(10) | | |
| 3435C | 0(0,0) | 26(54,2) | 22(42,3) | 10(50) | 10,174 | 0,022 |
| 3435T | 10(100) | 22(45,8) | 30(57,7) | 10(50) | | |
| 3435(CC+CT) | 0(0,0) | 20(83,3) | 16(61,5) | 9(90) | 16,238 | 0,001 |
| 3435TT | 5(100) | 4(16,7) | 10(38,5) | 1(10) | | |

Примечание: * – N – количество пациентов.

статистически значимыми ($p=0,001$ и $p=0,022$ соответственно). При сравнении частот генотипа *3435TT* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* и двух других генотипов *3435 (CC+CT)* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* были получены также достоверные различия ($p<0,001$). Отношение шансов для аллелей полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* составило 20,3 [2,4; 173,3], а для генотипов - ОШ=17,3 (1,8; 163,3). Следует отметить, что большой разброс в показателях доверительного интервала был связан с малой выборкой маловесных новорожденных.

Таким образом, результаты генетического тестирования по полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* матерей с ХАГ свидетельствуют об ассоциации изученного маркера с весом новорожденных у русских беременных с ХАГ

при лечении бисопрололом, носительство генотипа *3435TT* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* повышает вероятность рождения детей с низким весом в 17,3 раз, а носительство аллели *3435T* – в 20,3 раза.

По результатам корреляционного анализа было установлено, что носительство аллели *3435T* значимо связано с оценкой по шкале Апгар 1 ($\tau=0,31$; $p<0,001$) и с оценкой по шкале Апгар 2 ($\tau=0,20$; $p=0,029$). В то же время, между носительством аллели *3435C* и шкалой Апгар 1 выявлена обратная значимая корреляционная связь ($\tau=-0,31$; $p<0,001$). По результатам генетического тестирования установлена ассоциация изученного полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с различной оценкой новорожденных по шкале Апгар на первой и пятой минутах – как по частотам аллелей

Таблица 4

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* в подгруппах матерей с ХАГ в зависимости от оценки новорожденных по шкале Апгар

| Наименование аллеля и генотипа | Распределение аллелей и генотипов у матерей с ХАГ в зависимости от оценки новорожденных по шкале Апгар, чел., (%) | | | | | χ^2 | p |
|--------------------------------|---|----------|-----------|-----------|----------|----------|-------|
| | 7-7 | 7-8 | 8-8 | 8-9 | 9-9 | | |
| 3435C | 6(75,0) | 12(54,5) | 23(44,2) | 15(50,0) | 2(14,3) | 9,202 | 0,054 |
| 3435T | 2(25,0) | 10(45,5) | 29(55,8) | 15(50,0) | 12(85,7) | | |
| 3435CC | 3 (75,0) | 3 (27,3) | 5 (19,2) | 2 (13,3) | 0 (0,0) | 18,263 | 0,019 |
| 3435CT | 0 (0,0) | 6 (54,6) | 13 (50,0) | 11 (73,3) | 2 (28,6) | | |
| 3435TT | 1 (25,0) | 2 (18,2) | 8 (30,8) | 2 (13,3) | 5 (71,4) | | |
| 435(CC+CT) | 3 | 9 | 18 | 13 | 2 | 8,675 | 0,070 |
| 3435TT | 1 | 2 | 8 | 2 | 5 | | |
| 3435CC | 3 | 3 | 5 | 2 | 0 | 9,854 | 0,043 |
| 3435(CT+TT) | 1 | 8 | 21 | 13 | 7 | | |

($p=0,054$), так и по частотам генотипов ($p=0,019$) (табл. 4). При проведении расчетов в отношении генотипа *3435CC* и двух других генотипов (*3435CT* и *3435TT*) была обнаружена ассоциация ($p=0,043$), а для отношения генотипа *3435TT* и генотипов (*3435CC* и *3435CT*) – статистическая тенденция ($p=0,070$). Отношение шансов для генотипа *3435TT* или *3435CT* по полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* составило 14,7 (1,3; 165,9), т.е. носительство этих генотипов беременными с ХАГ повышает вероятность более тяжелого состояния по шкале Апгар 1-2 новорожденных, рожденных от русских женщин с ХАГ при терапии бисопрололом, а носительство генотипа *3435CC* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* может являться протективным фактором.

Обсуждение результатов

В настоящее время вопрос об участии протеинов множественной лекарственной устойчивости, в том числе гликопротеина Р, в патогенезе, становлении и лечении артериальной гипертензии находится на стадии разработки [18]. В рамках пилотного исследования была впервые изучена роль полиморфизма *C3435T* гена *ABCB1* как фактора, влияющего на эффективность и безопасность фармакотерапии β -АБ у русских беременных женщин Московского региона с ХАГ I и II степени. По нашим данным, частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* не различались в группах русских беременных с ХАГ с различным режимом дозирования бисопролола, т.е. изученный маркер не ассоцииро-

ван с эффективностью терапии β -АБ. Возможно, необходима комплексная оценка эффективности β -АБ, заключающаяся в изучении гаплотипов – генов транспортеров ЛС и их полиморфизмов и полиморфизмов генов, кодирующих белки-мишени.

Результаты проведенного генетического тестирования свидетельствуют об ассоциации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с весом новорожденных у беременных с ХАГ. Носительство генотипа *3435TT* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* у беременных с ХАГ повышает вероятность рождения маловесных детей в 17,3 раз, а носительство аллели *3435T* – в 20,3 раза на фоне фармакотерапии бисопрололом. В исследовании Li J. с соавт (2012) не было обнаружено ассоциации носительства полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* матерью с весом новорожденного [21]. В то же время, была продемонстрирована ассоциация генотипа *3435TT* гена *ABCB1* плода с низким весом новорожденного. Безусловно, вес ребенка при рождении является мультифакторным феноменом, на который влияют и негенетические факторы (питание и социальный статус матери, этническая принадлежность и др.). Участие гликопротеина Р в процессе роста плода обусловлено его фетопротективной функцией по отношению к ксенобиотикам и ЛС, транспортной – по отношению к питательным веществам, необходимым для жизнедеятельности плода, а также участием в плацентарном глюкокортикоидном барьере и апоптозе. Так, в исследовании Hitzl с соавт. (2004) было продемонстрировано снижение количества и экспрессии Р гликопро-

теина у матерей с генотипом *3435TT* гена *ABCB1* через пути апоптоза [22]. С этих же позиций, вполне вероятно, можно объяснить и полученный в нашей работе результат генетического тестирования, свидетельствующий о наличии ассоциации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с оценкой по шкале Апгар 1-2 у новорожденных, рожденных от русских женщин с ХАГ при лечении бисопрололом.

Нельзя исключить, что генетический тест по идентификации аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* у беременных с ХАГ в дальнейшем может быть использован для предсказания шанса рождения детей с низким весом и более тяжелым состоянием новорожденных по шкале Апгар при фармакотерапии β -АБ. Однако необходимы дальнейшие исследования для объяснения молекулярных механизмов, которые опосредуют пути нарушение роста плода, ассоциированное с аллелью *3435T* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1*.

Список литературы

1. **Abalos E., Duley L., Steyn D.W.** Anti-hypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy [Cochrane Database Of Systematic Rev]. 2008. (4).
2. **Sibai B.M.** Chronic hypertension in pregnancy // *Obstet Gynecol.* 2002. 100. P. 369-77.
3. *Protocols for high-risk pregnancies /* edited by John T. Queenan, John C. Hobbins, Catherine Y. Spong. - 4th ed. - 2005 by Blackwell Publishing Ltd. P. 264-272.
4. **Briggs G.G., Freeman R.K., Yaffe**

- S.J.** A reference guide to fetal and neonatal risk. Drugs in pregnancy and lactation - Ninth Edition / Lippincott Williams&Wilkins. Philadelphia. 2011.
5. **von Dadelszen P., Ornstein M.P., Bull S.B., et al.** Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: a meta-analysis // *Lancet*. 2000. 355. P.87-92.
 6. **Syme M.R., Paxton J.W., Keelan J.A.** Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta // *Clin. Pharmacokinetic*. 2004. 43 (8). P. 487-514.
 7. **Tabacova S.A., Kimmel C.A.** Atenolol: pharmacokinetics/dynamics aspects of comparative developmental toxicity // *Reprod Toxicol*. 2002. 16. P. 1-7.
 8. Диагностика и лечение сердечно-сосудистых заболеваний при беременности (Российские рекомендации) // *Российский кардиологический журнал*. 2013. 4. 102. Приложение.
 9. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension // *Journal of Hypertension*. 2013. 31(7). P. 1281-1357.
 10. **Magee L.A., Duley L.** Oral beta-blockers for mild to moderate hypertension during pregnancy [Cochrane Database Of Systematic Rev]. 2003. (3).
 11. **Magee L.A., Elran E., Bull S.B., Logan A., Koren G.** Risks and benefits of β -receptor blockers for pregnancy hypertension: overview of the randomized trials // *Eur J. Obstet Gynecol. Reprod. Biol*. 2000. № 88. P. 15-26.
 12. **Isoherranen N., Kenneth E.** Drug Metabolism and Transport During Pregnancy: How Does Drug Disposition Change during Pregnancy and What Are the Mechanisms that Cause Such Changes? // *Drug Metab. Dispos*. 2013. № 41. P. 256-262.
 13. **Mattison D.R.** Clinical Pharmacology during pregnancy. ELSEVIER. 2013. 471.
 14. **Fromm M.F.** Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers // *Trends Pharmacol. Sci*. 2004. 25(8). P. 423-9.
 15. **Ceckova-Novatna M., Pavec P., Staud F.** P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function: Review // *Reproductive Toxicology*. 2006. 22(3). P. 400-410.
 16. **Eap C.B., Bochud M., Elston R.C., Bovet P., Maillard M.P., Nussberger J., Schild L., Shamlaye C., Burnier M.** CYP3A5 and ABCB1 genes influence blood pressure and response to treatment, and their effect is modified by salt // *Hypertension*. 2007. 49. P. 1007-1014.
 17. **Lacchini R., Figueiredo V.N., Demacq C., et al.** MDR-1 C^{3435T} polymorphism may affect blood pressure in resistant hypertensive patients independently of its effects on aldosterone release // *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2013. 14 (1).
 18. **Marcos J.A. Delou, Anibal G. Lopes, Ma'rcia A.M. Capella.** Unveiling the Role of Multidrug Resistance Proteins in Hypertension // *Hypertension*. 2009. 54. P. 210-216.
 19. Доклад Рабочей группы Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) по высокому артериальному давлению при беременности // *Артериальная гипертензия*. 2008. Том 14. № 1. С. 7-21.
 20. **Кукес В.Г., Сокова Е.А., Изнатьев И.В., Казаков П.Е.** Неассоциированность полиморфного маркера

- С3435Т гена MDR1 с хронической артериальной гипертонией у русских беременных женщин // Биомедицина. 2011. № 4. С. 98-100.
21. *Li J., Wang Z., Chen Y.P., et al.* Association of Fetal but not Maternal P-glycoprotein C3435T Polymorphism with Fetal Growth and Birth Weight, a Possible Risk Factor for Cardiovascular Diseases in Later Life // Clin. Lab. 2012. 58. P.1085-1089.
22. *Hitzl M., Schaeffeler E., Hoche B., et al.* Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1) // Pharmacogenetics. 2004. 14(5). P. 309-18.

The significance of *ABCB1* gene *C3435T* polymorphism study for the evaluation of benefit/risk beta-blockers treatment in Russian pregnant women with chronic hypertension

Е.А. Sokova, V.G. Kukes

Objectives were to determine whether *C3435T* polymorphism in *ABCB1* gene is associated with efficacy and safety of bisoprolol treatment in Russian pregnant women with mild to moderate chronic hypertension. The comparative analysis of allele/genotype frequencies of *ABCB1* gene *C3435T* polymorphism was undertaken in Russian pregnant women with mild to moderate chronic hypertension (N1=65) and healthy subjects on the similar periods of gestation (N2=86). The data suggest that *C3435T* polymorphism in *ABCB1* gene is not associated with efficacy of bisoprolol treatment. The maternal *ABCB1/C3435T* polymorphism showed association with birth weight and Apgar score.

Key words: glycoprotein P, polymorphism of a gene of ABCB1, pregnancy, chronic arterial hypertension.

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, e-mail: 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 нуклеопротеидных 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.