

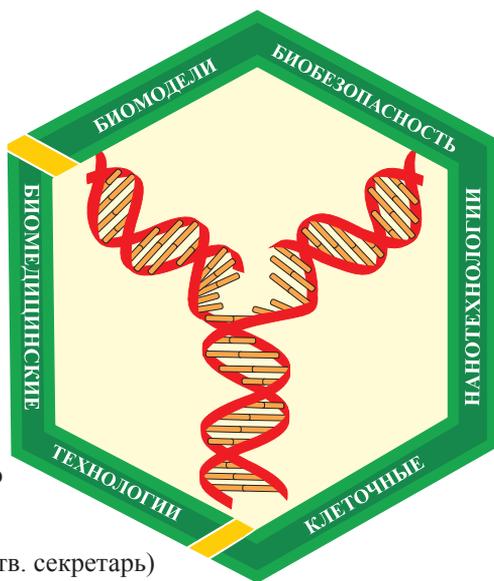
Научный журнал.

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, академик Н.Н. Каркищенко

В.Н. Каркищенко (зам. гл. редактора),

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

К.В. 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. Кузденбаева (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. Мурашёв (Пушино, МО)

В.Б. Назаров (Химки, МО)

М.А. Пальцев (Москва)

А.С. Радилов (Санкт-Петербург)

Г.В. Раменская (Москва)

В.Р. Рембовский (Санкт-Петербург)

Д.А. Сычев (Москва)

В.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 15.09.2014

Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, В.П. Рябых, Е.М. Колоскова, В.Н. Каркищенко
Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований
(успехи, неудачи и перспективы)4

А.И. Селезнёва, И.Е. Макаренко, А.Е. Касторнова, С.В. Ходько, М.А. Ковалёва
Противоишемические свойства метаболических средств в эксперименте.....23

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

А.А. Карпов, Д.Ю. Ивкин, А.В. Драчева, Н.Н. Питухина, Ю.К. Успенская, Д.Д. Ваулина, И.С. Усков, Ш.Д. Эйвазова, С.М. Минасян, Т.Д. Власов, А.В. Бурякина, М.М. Галагудза
Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки32

Л.А. Шарафутдинова, Е.Н. Горшкова, И.И. Садртдинова, З.Р. Хисматуллина, С.А. Башкатов
Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллера C_{60} 49

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина
Физические методы модуляции (инициации) переходных процессов между устойчивыми функциональными состояниями нервной системы54

А.Г. Соловьёва, А.А. Уланова, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин
Исследование свойств надмолекулярного кластера «алкогольдегидрогеназа-лактатдегидрогеназа» в субклеточных фракциях печени крыс в норме и при токсическом гепатите64

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

А.О. Ревякин, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Д.А. Ксенофонтов
Взаимовлияния микроэлементов в мышцах лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении72

А.Л. Ясенявская, М.А. Самогруева, С.А. Лужнова
Влияние антиоксидантов на морфометрические показатели щитовидной железы разновозрастных крыс в условиях иммобилизационного стресса.....78

ГЕНЕТИКА

О.Н. Антосюк, А.М. Марвин, Н.А. Марвин
Сравнительный анализ воздействия цитостатических препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster*83

БИОМЕДИЦИНА И БИМОДЕЛИРОВАНИЕ:
ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ X НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ92

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, E.M. Koloskova, V.N. Karkischenko
Creation of humanized mice for pharmacological and toxicological research (progress, failures and prospects)4

A.I. Selezneva, I.E. Makarenko, A.E. Kastornova, S.V. Khodko, M.A. Kovaleva
Anti-ischemic properties of metabolic drugs in the experiment23

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

A.A. Karpov, D.Yu. Ivkin, A.V. Dracheva, N.N. Pitukhina, Yu.K. Uspenskaya, D.D. Vaulina, I.S. Uskov, Sh.D. Eyvazova, S.M. Minasyan, T.D. Vlasov, A.V. Buryakina, M.M. Galagudza
Rat model of post-infarct heart failure by left coronary artery occlusion: technical aspects, functional and morphological assessment32

L.A. Sharafutdinova, E.N. Gorshkova, I.I. Sadrtidinova, Z.R. Khismatullina
Neutrophiles morphological parameters estimation by nuclear and power microscopy after fullerene C₆₀ influence49

BIOMEDICAL METHODS

N.N. Karkischenko, D.B. Chaivanov, Yu.A. Chudina
Physical methods of modulation (initiation) of transients between steady functional conditions of nervous system54

A.G. Soloveva, A.A. Ulanova, A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin
Investigation of supramolecular cluster «alcohol dehydrogenase – lactate dehydrogenase» in subcellular fractions of liver healthy rats and animals with toxic hepatitis64

LABORATORY ANIMALS

A.O. Revyakin, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, D.A. Ksenofontov
Interferences of microcells in muscles of laboratory animals at normal and excess food consumption72

A.L. Yasenyavskaya, M.A. Samotrujeva, S.A. Luzhnova
The influence of antioxidants on the morphometric parametrs of the thyroid gland of the different ages rats in the conditions of immobilization stress78

GENETIC

O.N. Antosyuk, A.M. Marvin, N.A. Marvin
The comparative analysis of influence of cytostatic drugs on genome instability of *Drosophila melanogaster* 83



Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы)

Н.Н. Каркищенко¹, В.П. Рябых², В.Н. Каркищенко¹, Е.М. Колоскова²

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

² – ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных, г. Боровск

Контактная информация: академик Каркищенко Николай Николаевич, scbmt@yandex.ru

На основе литературных данных и результатов собственных исследований проведен анализ успехов и неудач при получении трансгенных мышей с интегрированными генами *Nat* и *Cyp3A4* человека, для использования их в качестве биомodelей при испытании фармакологической эффективности и токсичности лекарственных веществ. Дан анализ возможных причин неудач при получении трансгенных мышей, обладающих повышенной экспрессией человеческих генов *Nat1*, *Nat2* и *Cyp3A4*, передающих трансген по наследству. Обсуждается важность роли промотора при создании генно-инженерных конструкций и гуманизированных мышей. Приводятся собственные данные о том, что для получения трансгенных животных методом микроинъекции генных конструкций в пронуклеусы зигот малопригодны разные варианты цитомегаловирусного промотора (*cmv*). Этот *cmv*-промотор начинает включать неконтролируемую экспрессию трансгена на очень ранних стадиях развития эмбриона, что зачастую приводит к гибели зародыша. Показаны пути получения гуманизированных мышей с интегрированными генами *CYP3A4*, а также генами *Nat1* и *Nat2* человека, с пониженным уровнем активности эндогенной *Nat2*, без использования мышей с нокаутом собственных генов *Nat1* и *Nat2* для скрещивания с трансгенными мышами. Анализ собственных результатов и причин неудач в создании трансгенных животных позволил получить нам гуманизированных мышей с интегрированными генами *NAT1* и *NAT2*, обеспечивающими специфическую экспрессию трансгенов, а также создать ДНК-конструкции для животных, несущих ген *CYP3A4*.

Ключевые слова: трансгенные мыши с интегрированными генами человека, гуманизированные мыши, химерные животные, *N*-ацетилтрансфераза (*Nat1* и *Nat2*), цитохром P450, гены *CYP3A4*, экспрессия генов *Nat1*, *Nat2* и *CYP3A4*, выбор и конструирование промоторов, биологические модели, экстраполяция на человека.

Введение

Генетический полиморфизм предопределяет индивидуальную чувствительность человека к лекарствам и ксенобиотикам. Информация о гене-

тических особенностях пациента позволяет персонифицировать препарат, его дозировку. Фармакогенетические исследования в популяционной фармакологии получили новый стимул с ис-

пользованием новых биомоделей [7], развитием фармакомоделирования [3] и альтернативных фармакотоксикологических подходов [5].

Использование принципов GLP в фармакологических исследованиях [7] и новых принципов в фундаментальных биомедицинских исследованиях открыло новый путь к познанию механизмов действия и создания инновационных таргетных лекарств. Безусловный прорыв в изучении биотрансформации лекарств наметился в использовании генно-модифицированных животных, наиболее удобными моделями из которых являются гибридные, инбредные, конгенные и другие мыши.

Геном мыши на 95% совпадает с человеческим. Мыши являются наиболее оптимизированным объектом для межвидовой ксенотрансплантации. Наибольший научный интерес представляют *гуманизированные мыши*, т.е. трансгенные животные, содержащие функционирующие гены, клетки, ткани или иные органоиды человеческого организма.

В процессе эволюции в организме человека и животных возникли ферментативные системы биотрансформации ксенобиотиков. Эти системы принимают участие в метаболизме как экзогенных, так и эндогенных субстратов. В реакциях биотрансформации условно подразделяют на три фазы, из которых особая роль во второй фазе принадлежит цитохром-P450-зависимым реакциям и реакциям конъюгации, осуществляемыми целой группой ферментов, среди которых значительную роль играет N-ацетилтрансфераза (NAT).

Обобщая имеющуюся информацию, можно прийти к заключению, что все

семейство *цитохромов P450 (CYP450)*, отвечающих за метаболизм большинства лекарств и ксенобиотиков, регулируемое генами *CYP*, произошло два миллиарда лет назад от одного предшественника – гена, участвующего в утилизации энергии. *CYP*-гены (*CYP1*, *CYP2*, *CYP3*, *CYP4*) регулируют два конкурентных пути: метаболической детоксикации или активации. Полиморфизм генов *CYP* определяет различия (медленный, средний или быстрый) в метаболизме лекарств у разных индивидуумов. *CYP3A4* – основной цитохром печени и кишечника, где его количество более 60% от всех цитохромов, на его долю приходится около 60% всех метаболизируемых лекарств.

N-ацетилтрансфераза, один из ферментов второй фазы системы детоксикации, которая осуществляет N-ацетилирование (обычно дезактивация) ароматических и O-ацетилирование (обычно активация) гетероциклических аминов, к которым относятся многие канцерогены и некоторые лекарственные препараты. NAT является ферментом, которому принадлежит важная роль в метаболизме эндогенных и чужеродных соединений ариламидной природы, включая лекарственные препараты. Среди загрязнителей окружающей среды, являющихся субстратами NAT, широко распространены ариламины выхлопных газов двигателей, лакокрасочных производств, компоненты табачного дыма, компоненты пищи и некоторые другие промышленные загрязнители. NAT участвует также в катаболизме биогенных аминов.

В НЦБМТ ФМБА России активно исследуются особенности генетического регулирования NAT-системы [2, 4, 5, 6].

Однако до последнего времени механизмы нарушения и даже особенностей NAT-ацетилирования изучены относительно слабо, что связано, в первую очередь, с отсутствием соответствующих биологических моделей. Отсутствие реальных биологических моделей серьезно тормозит дальнейший прогресс в распознавании интимных процессов, протекающих при развитии онкологических заболеваний и других социально-значимых болезней.

Предпосылки создания гуманизированных животных

В настоящее время большая часть исследований по испытанию влияния лекарственных средств на человека проводится на животных. Несмотря на развитие компьютерного моделирования, субклеточных и клеточных технологий, отказаться от экспериментов на многоклеточных организмах вряд ли удастся. Организм млекопитающего чрезвычайно сложен, и надежно прогнозировать ответные реакции на воздействия различных веществ без экспериментальной проверки на животных пока невозможно.

Ферменты окислительного метаболизма работают практически у всех живых организмов. Наиболее универсальной является **СYP (цитохром P450)** – система, которую за ее мультигенные функции называют биологической «паяльной лампой». Важно, что пути метаболических превращений, как лекарств, так и токсикантов, носят однонаправленный характер, поэтому на путях метаболизма лекарственных средств и ксенобиотиков возможны реакции взаимодействия.

Открытие PXR (прегнан X рецептор) как первичного регулятора индук-

ции экспрессии *CYP3A*, а также SXR-рецептора [62] в печени и кишечнике обнаружило, что его ненамеренная активация у людей приводит к нежелательной интеракции лекарств и увеличению уровней токсических метаболитов.

У человека идентифицированы четыре формы *CYP3A* (3A4, 3A5, 3A7, 3A43), у кроликов – одна, тогда как в печени мышей присутствуют множественные его формы. Преобладающей формой у человека является *CYP3A4*, что нельзя сказать о таковой у мышей. Поэтому создание гуманизированных мышей по гену *CYP3A4* человека [48] является важной и актуальной для фармакогенетики и фармакокинетики задачей.

Различные группы химических веществ иначе влияют на животных, чем на людей. Различия на уровне клеточного метаболизма существуют не только между животными и людьми, но и между полами и возрастными группами внутри видов. В настоящее время составление прогнозов для людей на основе данных, полученных на животных, всё больше вызывает вопросов и сомнений. Из-за межвидовых различий метаболизма существует значительная степень риска при экстраполяции результатов, полученных в экспериментах на животных, на физиолого-биохимические процессы, происходящие в организме человека.

Существуют явные видовые различия в NAT субстратной селективности и функциях у человека и разных животных [6, 22]. Даже модели дважды нокаутированных *Nat1/2* мышей имеют ограничения в интерпретации результатов по отношению к человеку [56]. Например, сульфаметазин (SMZ) – специфический субстрат для *Nat2* человека у мышей

метаболизируется плохо [19]. У мышей 4-аминобифенол (ABP) метаболизируется исключительно *Nat2* [35], тогда как у человека в N-ацетилировании ABP и O-ацетилировании N-hydroxy-ABP в печени, главным образом, участвует *Nat2* и, в меньшей степени, *Nat1*, который принято считать аналогом *Nat2* мыши [15].

В последнее время все большее значение при испытаниях фармакологической эффективности и токсичности новых лекарственных средств отводится трансгенным животным, в геноме которых интегрированы соответствующие гены человека – так называемые *гуманизированные животные* (рис. 1). Однако при получении гуманизированных

трансгенных животных возникает целый ряд проблем, без решения которых невозможно получение полноценных животных биомodelей.

Ключевые моменты получения гуманизированных мышей

При получении трансгенных животных любой направленности необходимо иметь ответы на шесть ключевых вопросов:

В каких органах и тканях в норме экспрессирует собственный ген животного-хозяина, аналогом которого будет являться трансген человека?

На какой стадии развития организма начинает экспрессировать этот ген животного?

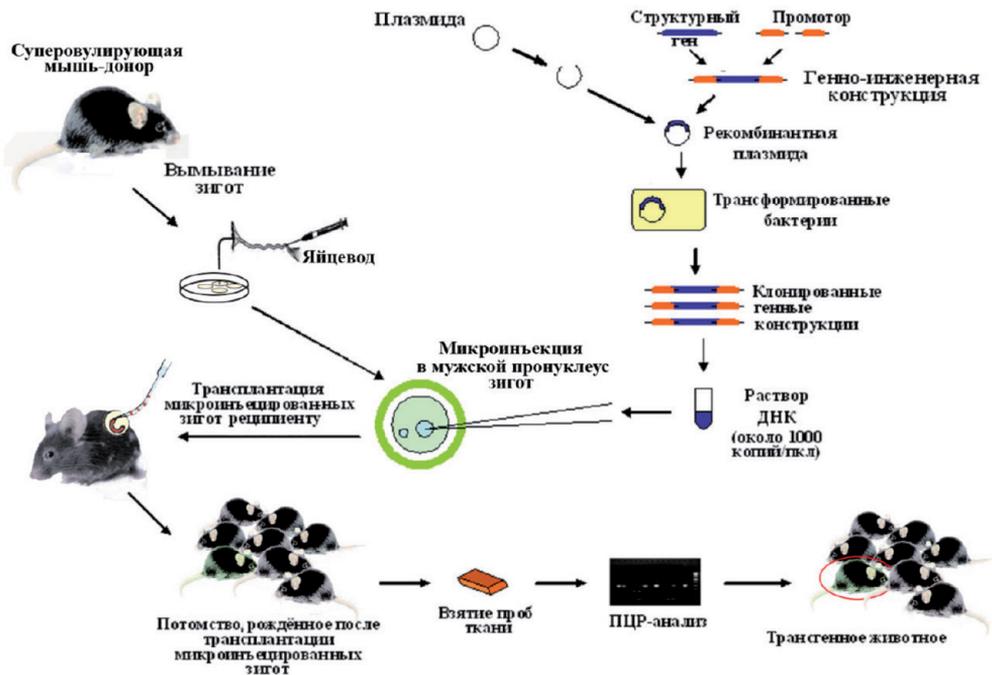


Рис. 1. Принципиальная схема получения трансгенных мышей с интегрированными генами человека.

В каких физиолого-биохимических процессах принимает участие продукт экспрессии собственного гена животного-хозяина, аналогом которого будет являться трансген человека?

В каких органах и тканях планируется вызывать экспрессию трансгена?

Как может повлиять повышенный уровень продукта экспрессии трансгена человека, попавшего в организм животного, на физиолого-биохимические процессы, происходящие в нём?

Насколько повлияет повышение уровня экспрессии трансгена на жизнеспособность гуманизированных мышей?

Приступая к работе по получению трансгенных мышей с интеграцией в их геном нуклеотидных последовательностей генов *Nat1* и *Nat2* человека, мы учитывали следующие моменты, дающие в определённой степени ответы на выше поставленные вопросы.

Исходя из современных представлений, *Nat2* человека, который является типичным ферментом, метаболизирующим ксенобиотики и лекарства, синтезируется в клетках печени и в кишечном эпителии [23, 24, 25, 61]. Небольшой уровень экспрессии *Nat2* был обнаружен у человека в молочной железе, в эпителии мочевого пузыря и предстательной железе [29, 34, 49]. Тогда как экспрессия гена *Nat1* у человека обнаружена почти во всех тканях, включая лейкоциты и эритроциты [14, 23, 43, 47]. Было отмечено, что ген *Nat1* начинает экспрессировать в ранний период развития человека [44]. В человеческой плаценте на ранних стадиях развития уровень экспрессии *Nat1* в 1000 выше уровня *Nat2* [53]. Позднее было показано, что этот ген

начинает экспрессировать уже в эмбрионах, находящихся на стадии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции [52], что является самым неприятным моментом при получении трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat1* человека.

Nat1 имеет оригинальный субстратноспецифичный профиль и в дополнение к метаболизму ксенобиотиков может участвовать в ацетилировании эндогенных метаболитов таких как *n*-аминосалицилата [19] и *n*-аминобензойной кислоты (*p*-АВА) [60]. Потенциальный эндогенный субстрат был идентифицирован как фолатный катаболит *n*-аминобензоилглутамат (*p*-АВGlu) [39, 59], который выделяется с мочой как *N*-ацетильная форма [37, 38]. Фолат имеет протективный эффект в развитии нервной трубки у зародышей, и является чувствительным к изменению экспрессии генов *Nat*, ответственных за ацетилирование *n*-аминобензоилглутамата у мышей.

Также было установлено, что мышинный *Nat2* является гомологом человеческого *Nat1* в отношении субстратной специфичности и тканевого распределения в организме и кодируется полиморфным локусом, который обуславливает быструю или медленную активность. Мышиный *Nat2*, подобно человеческому *Nat1*, метаболизирует *p*-АВGlu и экспрессирует во многих тканях [18, 27, 36, 45, 54]. Во время раннего развития мышей ген *Nat2* экспрессирует в эмбриональных стволовых клетках предимплантационных эмбрионов, также как и ген *Nat1* у человека [45]. В то время как другие гены *Nat* мыши и человека не экспрессируют на этой ранней стадии развития организма [9, 52]. Было показано,

что у мышей *Nat2* (гомолог человеческого *Nat1*) экспрессирует раньше, чем на 9-й день развития плода [54]. Изучение различных тканей от неонатальных мышей методом ПЦР в реальном времени показало, что в них преимущественно экспрессирует мышинный *Nat2* [40]. На 9,5; 11,5 и 13,5 дни беременности распределение мышинного *Nat2* в тканях было неравномерным. Он концентрировался преимущественно в развивающейся нервной трубке, что может быть важным фактором ввиду защитного эффекта фолата в предотвращении дефектов в процессе развития нервной трубки [41]. У взрослых мышей [54] и других грызунов [28] эквивалент человеческой *Nat1* экспрессирует в клетках Пуркинне мозжечка [54]. Исследования, проведенные на мозжечке взрослых людей, также показали аналогичную экспрессию *Nat1* в клетках Пуркинне [26].

Сравнение мышинного *Nat2* и человеческого *Nat1* в раннем развитии правомерно позволяет использовать мышь в качестве модели для изучения экспрессии этого гена у человека.

Проблемы, лимитирующие получение гуманизированных мышей

Получение трансгенных животных, продуцирующих биологически активные вещества (БАВ), у которых продукты экспрессии трансгена попадают в кровь, является весьма сложным мероприятием, т.к. обладая высокой активностью, эти вещества, попадая в кровь, чаще всего вызывают изменения в регуляции физиолого-биохимических процессов, что приводит к нарушению гомеостаза и существенным отклонениям в функционировании организма.

Первое краткое сообщение о получении трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat2* человека, продуцирующим NAT2-активность в кровь, было сделано группой исследователей из Оксфордского университета в 2000 г. на II Международном симпозиуме по NAT [16]. По сообщению авторов, им удалось получить мышей в результате случайной интеграции трансгена, которых можно было скрещивать между собой. Однако уровень экспрессии человеческого *Nat2* в организме трансгенных мышей оказался невысоким. После этого никаких сообщений от этой группы авторов по данной проблеме не поступало.

В последние годы существенно активизировались исследования по изучению генетической регуляции системы CYP3A4 [30, 31, 50], которые привели к созданию трансгенных и гуманизированных мышей, несущих этот ген человека. В то же время уровень экспрессии человеческого гена *CYP3A4* в организме трансгенных животных также оказался достаточно низким.

Наиболее надёжным направлением является получение трансгенных животных, продуцирующих БАВ белковой природы автономно отдельными органами на экспорт (молочная железа, мочевого пузырь, предстательная железа и др.), минуя попадание их в кровь. Принципиальная возможность получения трансгенных животных, продуцирующих биологически активные вещества белковой природы автономно в отдельных органах, обусловлена механизмом тканеспецифической экспрессии трансгенов, определяемой регуляторными последовательностями генов, используемых в качестве промоторов при создании генно-инженерных конструкций.

Например, при получении трансгенных животных, продуцирующих с молоком БАВ фармакологического назначения, в качестве промоторов в генно-инженерных конструкциях используют регуляторные участки генов основных белков молока, которые обеспечивают тканеспецифическую экспрессию трансгена только в клетках молочной железы. В связи с этим, синтезированный целевой белок выводится из организма животного с молоком, не попадая в кровоток и не оказывая влияния на организм животного, т.к. молочная железа является уникальной изолированной системой, производящей продукт на экспорт [1, 13, 46]. Аналогичным образом с использованием конструкции, содержащей пробазиновый промотор, тканеспецифичный для предстательной железы, были получены трансгенные мыши, у которых в 15 раз была увеличена активность *Nat2* человека (тест с сульфаметазинном) в предстательной железе, тогда как другие *Nat2*-активности (N-, O-, или N,O-ацетилтрансферазы) не были увеличены [34].

Таким образом, к настоящему времени известны следующие факты, которые мы учитывали при получении трансгенных мышей с интегрированными генами *Nat1* и *Nat2* человека:

- *Nat2* у человека синтезируется, главным образом, в клетках печени и в кишечном эпителии, и небольшой уровень экспрессии *Nat2* был обнаружен у человека в молочной железе, в эпителии мочевого пузыря и предстательной железе;

- экспрессия гена *Nat1* у человека обнаружена почти во всех тканях, включая лейкоциты и эритроциты;

- ген *Nat1* у человека начинает экспрессировать уже в эмбрионах, находящихся на стадии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции, что является самым неприятным моментом при получении трансгенных животных с интегрированным геном *Nat1* человека;

- мышинный *Nat2* является гомологом человеческого *Nat1* в отношении субстратной специфичности и тканевого распределения в организме;

- ген *Nat2* у мышей экспрессирует в эмбриональных стволовых клетках предимплантационных эмбрионов, также как и ген *Nat1* у человека.

Неудачи получения трансгенных мышей с интегрированными в их геном нуклеотидными последовательностями генов человека

В 2003 г. группа исследователей из Оксфордского университета [51] также сообщила о получении трансгенных мышей методом трансплантации в бластоцисты эмбриональных стволовых клеток, генетически трансформированных с использованием генно-инженерной конструкции, состоящей из кДНК гена *Nat1* человека под сильным многоцелевым цитомегаловирусным промотором (*cmv*), которая была целенаправленно интегрирована внутрь локуса мышинного гена *Nat2*.

Как и следовало ожидать, все первичные трансгенные мыши в этом эксперименте были химерами, но их было очень мало, т.к. наблюдалась резорбция многих эмбрионов и ненормальное развитие большей части плодов. Из небольшого числа химерных мышей, полученных в этом эксперименте, не-

которые особи имели узловатые хвосты. Ненормальности подобного типа наблюдались у животных, которые использовались в качестве моделей для изучения дефектов развития нервной трубки у плодов [42].

Авторам не удалось скрестить немногочисленное потомство живых химерных мышей, с целью получения гомозиготных линий трансгенных мышей, обладающих повышенной экспрессией человеческого *Nat1* и передающих трансген по наследству [51]. В связи с этим, было выдвинуто предположение, что повышенный уровень экспрессии трансгенов *Nat* человека приводит к продукции НАТ изоферментов, которые метаболизируют *p*-ABGlu у мышей, что является вредным фактором в раннем развитии, и в результате этого происходит резорбция эмбрионов или рождение дефектных детёнышей [51]. Это предположение авторов базировалось на более ранних работах, которыми было установлено, что одним из эндогенных субстратов *Nat1* является фолатный катаболит *p*-ABGlu [39, 59], а сам фолат обладает протективным эффектом при развитии нервной трубки у зародышей и является чувствительным к изменению экспрессии генов *Nat*, ответственных за ацетилирование *p*-ABGlu у мышей.

Результаты всех этих исследований привели авторов работы к заключению, что высокий уровень экспрессии *Nat1* человека у трансгенных мышей в период эмбрионального развития приводит к нарушению механизма защитного действия фолата на развитие нервной трубки и гибели большей части эмбрионов или к ненормальному развитию плодов [51]. После неудачных экспериментов

по получению трансгенных мышей с интегрированными в их геном генами *Nat* человека эта группа исследователей прекратила работы в данном направлении.

Позднее группа исследователей из университета штата Аризона [10] на основе анализа результатов оксфордской группы [51] предприняла попытку получить трансгенных мышей с интегрированными в их геном генами *Nat1* и *Nat2* человека методом микроинъекции в пронуклеусы зигот генно-инженерных конструкций, включающих кДНК генов *Nat* человека под цитомегаловирусным промотором (*cmv*). На основании результатов своих исследований эта группа в 2005 г. опубликовала статью под названием «Только низкий уровень экзогенной *N*-ацетилтрансферазы может быть достигнут у трансгенных мышей» [10].

Авторами было получено 5 первичных (F0) трансгенных мышей-основателей линий с интегрированной конструкцией *cmv-hNat1*. Число копий трансгена варьировало от 1 до 17. Человеческая мРНК *Nat1* была определена в печени, лёгких, почках и мозге трансгенных мышей. Наличие функционального белка было определено при измерении НАТ с *n*-аминобензойной кислотой (ПАВА) как селективным субстратом для *Nat1* человека и *Nat2* мыши [17, 21, 45].

Несмотря на наличие большого числа копий трансгена у некоторых линий трансгенных мышей, у них было обнаружено только умеренное увеличение уровня ферментной активности в разных тканях или вообще не отмечено никакого её увеличения. Статистически значимые различия уровня фермент-

ной активности были отмечены только в печени, при увеличении в пределах 10-50%, по сравнению с контролем [10].

С конструкцией, в которой к *cmv*-промотору был добавлен промотор НААТ тканеспецифический для печени, были получены две первичные (F0) трансгенные мыши-основатели линий с 5-ю и 24-мя копиями трансгена. Однако, несмотря на большое число копий трансгена, увеличение активности *Nat2* в печени не произошло, по сравнению с контролем.

С конструкцией *cmv-Nat2* были получены 3 первичные (F0) трансгенные мыши-основатели линий, у которых число копий трансгена варьировало от 1 до 5. В печени этих мышей было найдено умеренное количество мРНК *Nat2* человека. Активность фермента в печени, измеренная с изониазидом (INH) – селективным субстратом для *Nat2* человека и *Nat1* мыши, была в 2 раза выше, по сравнению с контролем [10].

Попытки получения трансгенных мышей гомозиготных по гену *Nat1* оказались безуспешными. Авторы сделали предположение, что это обусловлено восприимчивостью трансгенных мышей к повышенному уровню продуктов экспрессии трансгена.

В этом исследовании [10] был обнаружен интересный факт. Присутствие трансгена *Nat1* человека вызывало в печени мышей увеличение *Nat1* мРНК в 2-3 раза, тогда как у трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat2* человека количество эндогенной мРНК *Nat1* незначительно изменялось в печени, лёгких, почках и мозге. В противоположность этому, у трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat2* человека синтез эндогенной мРНК *Nat2* в печени

и других тканях мышей был сильно подавлен (уменьшение в 6 раз).

Авторы этого исследования также приходят к выводу о трудности достижения значительного повышения уровня экспрессии трансгена у мышей трансгенных по генам *Nat*. Только животные с относительно низким уровнем экспрессии трансгена выживают. Однако в этом исследовании количество живых мышей с интегрированным геном *Nat1* человека и передающих трансген по наследству было выше, чем в исследованиях группы из Оксфордского университета [51]. Этот факт авторы [10] попытались объяснить различием линий мышей, используемых в работе этих двух групп.

На наш взгляд, различия в результатах исследований в этих группах связаны со способом получения трансгенных животных. Оксфордская группа [51] получала трансгенных животных методом введения генетически трансформированных клеток в бластоцисты, что изначально предполагает получение химерных животных, последовательное скрещивание которых в конечном итоге может привести к созданию животных, передающих трансген по наследству. Однако при таком способе получения химерных животных интеграция трансгена будет в высшей степени мозаичной, и только незначительная часть генетически трансформированных клеток может принять участие в формировании популяции гоноцитов, являющихся источниками генеративных клеток. В результате этого родившиеся живыми трансгенные животные в очень редких случаях будут передавать трансген по наследству.

Исследователи из Аризонского университета [10] получали трансгенных

животных методом микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот, при использовании которого мозаичность встраивания трансгена в геном хозяина значительно ниже, чем при использовании метода введения генетически трансформированных клеток в бластоцисты. Поэтому и передача трансгена потомству первичными трансгенными мышами, полученными этой группой, была выше.

Но самым неудачным моментом в исследовании аризонской группы, на наш взгляд, является использование при создании конструкций цитомегаловирусного промотора, который является мощным многоцелевым промотором, вызывающим экспрессию трансгена во многих клетках и тканях, включая бластомеры ранних эмбрионов. Этот промотор хорош для генетической трансформации культур клеток, которые содержат несколько сотен тысяч клеток, и поэтому гибель определённой части клеток с повышенной экспрессией трансгена не окажет существенного влияния на общие показатели эффективности трансформации клеток. Однако при введении конструкций с *cmv*-промотором в единичные одноклеточные зиготы в дальнейшем, чаще всего, будет приводить к гибели этих эмбрионов.

Необходим ли предварительный нокаут генов мышей?

Группой исследователей были получены мыши с нокаутом генов *Nat1* и *Nat2*, с целью изучения роли этих генов в жизнедеятельности организма [56]. Первичные исследования показали, что фенотипически эти мыши были меньше размером, но отсутствие у них экспрессии генов *Nat1* и *Nat2* не оказалось

критическим для развития и физиологического гомеостаза [56], несмотря на то, что мыши с отсутствующим геном *Nat2* не экскретировали *p*-ABGlu, который определяется в моче потомков мышей дикого типа [57].

Однако последующие дополнительные исследования показали, что у потомков этих мышей имеются врождённые пороки воспроизводительной системы и нарушение соотношения в половой принадлежности [57, 58]. Кроме того, по крайней мере, у потомков одного из прародителей с нокаутом гена *Nat2* наблюдались дефекты со зрением. Эти дефекты, по мнению авторов, могли быть связаны с изменением метаболизма фолиевой кислоты [58]. Известно, что недостаток фолиевой кислоты может быть тератогенной причиной миеломенингоцеле [33] и рассечения верхней губы с рассечением или без рассечения твёрдого нёба [32].

Позднее потомки трансгенной мыши с интегрированной конструкцией, состоящей из кДНК гена *Nat2* человека и энхансор/промоторной области гена альбумина мыши, были скрещены с мышами, имеющими двойной нокаут обоих генов *Nat1* и *Nat2*. Целью этого скрещивания являлось **исключение влияния** мышью эндогенной NAT-активности на процессы, происходящие в организме мышей под действием интегрированного чужеродного гена *Nat2* человека, чтобы использовать полученных мышей в качестве модели для предсказания ответа человеком на действие ариламинов или гетероциклических аминов.

Принимая во внимание результаты исследований группы из Аризонского университета [10], которые свидетельствуют о том, что экспрессия трансгена

Nat2 человека значительно подавляет синтез эндогенной мышиной мРНК *Nat2* (аналог *Nat1* человека) в печени и других тканях трансгенных мышей, можно предположить, что путём скрещивания между собой мышей трансгенных по *Nat1* и *Nat2* человека можно получить линии мышей, у которых будут экспрессировать одновременно трансгены *Nat1* и *Nat2* человека на фоне пониженного уровня мышинового эндогенного *Nat2*, т.е. они будут иметь более «человеческий» профиль ацетилирования.

Эти линии гуманизированных мышей могут быть в определённой степени сходны с линиями мышей, полученными от скрещивания трансгенных мышей по *Nat2* человека с линией мышей с двойным нокаутом обоих генов *Nat1/2* [55]. Но если учесть, что у мышей нокаутных по генам *Nat* наблюдаются определённые физиолого-биохимические и морфологические нарушения, то вариант получения гуманизированных мышей путём скрещивания между собой линий мышей трансгенных по *Nat1* и *Nat2* человека без использования нокаутных животных может оказаться вполне приемлемым.

Таким образом, для получения гуманизированных трансгенных мышей с генами *Nat* человека и с минимальным влиянием эндогенных *Nat* мыши на процессы ацетилирования, можно обойтись без использования нокаутных животных. Можно предположить, что в результате такого скрещивания будут получены линии гуманизированных мышей, которые могут служить хорошими биомоделями в прогнозировании реакции человека на воздействие ариламинов или гетероциклических аминов.

Оптимизация и конструирование промоторов и перспективы создания гуманизированных мышей

Наши исследования, проведенные с использованием генно-инженерной конструкции, включающей ген гранулоцит-колониестимулирующего фактора под промотором гена *α S1*-казеина крупного рогатого скота и репортёрный ген зелёного белка под цитомегаловирусным промотором показали (рис. 1-3), что *cmv*-промотор включал экспрессию гена зелёного белка уже на стадии двух бластомеров, а в эмбрионах, погибших на ранних стадиях развития, наблюдалась сильная экспрессия гена зелёного белка [1]. Эти исследования наводят на мысль, что чрезмерная экспрессия гена зелёного белка, обусловленная действием *cmv*-промотора, приводит к резкому смещению синтетических процессов в сторону синтеза чужеродного зелёного белка, что приводит к гибели эмбриона.

По-видимому, при использовании для получения трансгенных животных конструкций, включающих ген *Nat1* человека под мощным *cmv*-промотором, на ранних стадиях развития эмбриона начинают действовать сразу 2 процесса, неблагоприятных для развития эмбриона.

Во-первых, при высоком уровне экспрессии трансгена происходит усиленное отвлечение аминокислот на синтез чужеродного белка под действием *cmv*-промотора, что само по себе может приводить к гибели эмбрионов (рис. 2-4).

Во-вторых, повышенный синтез фермента NAT1 человека, который вызывает снижение уровня фолиевой кислоты, и тем самым может способствовать нарушениям процесса формирования нервной трубки и ненормальному развитию плодов.

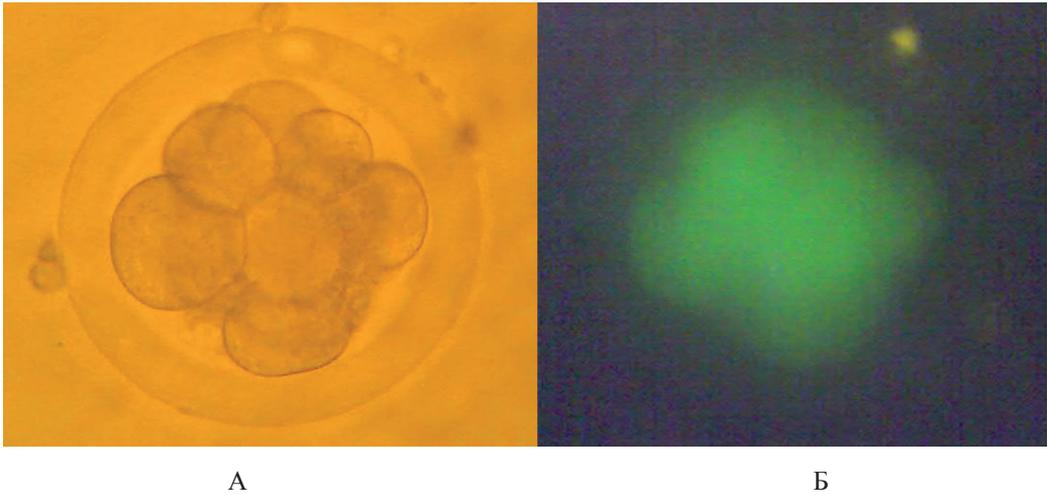


Рис. 2. Умеренная экспрессия маркерного гена зелёного белка под *stv*-промотором в развивающемся эмбрионе (А – микроскопия в обычном свете, Б – в синем свете).



Рис. 3. Мощная экспрессия маркерного гена зелёного белка под *stv*-промотором в одном из бластомеров (указан стрелкой) эмбриона, погибшего на стадии двух бластомеров (А – в синем свете, Б – в обычном свете).



Рис. 4. Эмбрионы, погибшие на ранних стадиях развития. Наблюдается сильная экспрессия маркерного гена зелёного белка под *stv*-промотором в бластомерах.

Анализ результатов исследования группы из Аризонского университета [10] наводит на мысль, что неудачи в получении трансгенных животных с интегрированными генами *Nat* человека обусловлены неудачным выбором *cmv*-промотора при создании генно-инженерных конструкций, использованных в этом эксперименте. Это предположение подтвердилось и в последующих исследованиях этой группы.

Принимая во внимание тот факт, что ген *Nat1* человека начинает экспрессировать уже на стадии эмбриона, а повышенный синтез фермента NAT1 человека может способствовать ненормальному развитию плодов, исследователи из Аризонского университета [11] попытались использовать при получении трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat1* человека конструкцию с индуцибельным промотором. В качестве такого промотора был использован минимальный *cmv*-промотор с тетрациклиновой регуляторной системой.

Предполагалось, что эта конструкция не должна экспрессировать во время развития плода до его рождения и не оказывать на него вредного влияния, а начинать экспрессировать только после рождения в результате индукции доксициклином, который можно давать животному с кормом или водой. Были получены 4 первичные (F0) трансгенные мыши-основатели линий с интегрированной конструкцией *cmv-hNat1*. Однако и в этом эксперименте при индукции экспрессии трансгена наблюдалось лишь небольшое увеличение активности *Nat1* человека в почках трансгенных мышей.

Авторы не приводят данных об эмбриональной смертности и нарушении

ях в развитии плодов, но в заключении вновь возвращаются к положению, выдвинутому ими ранее [10], что повышенный уровень экспрессии трансгена (*Nat1* человека) в организме мышей вызывает критическое нарушение баланса в регуляции фолата с вытекающими из этого отрицательными последствиями [11]. Исходя из этого заключения авторов, можно сделать вывод, что индуцибельный *cmv*-промотор по каким-то невыясненным причинам не сработал и не дал ожидаемых результатов.

После этих неудачных попыток получения полноценных трансгенных мышей, экспрессирующих высокий уровень *Nat1* и *Nat2* человека, и передающих трансген по наследству, в 2011 г. группа канадских исследователей из университета г. Торонто опубликовала статью, в которой сообщалось о получении одной первичной (F0) трансгенной мыши с интегрированным геном *Nat2* человека – основательницы линии [55]. Эта мышь была получена методом микроинъекции в пронуклеус зиготы конструкции, состоящей из кДНК гена *Nat2* человека и энхансор/промоторной области гена альбумина мыши, которая была использована с целью вызывания экспрессии трансгена целенаправленно в печени. В геном этой мыши встроилась только одна копия трансгена.

О частоте интеграции трансгена в геном хозяина и об общей эффективности технологии трансгеноза авторы этой работы не сообщают. Поэтому сложно судить о влиянии экспрессии трансгена на развитие эмбрионов, эмбриональную смертность, жизнеспособность рожденного потомства и нарушения постнатального развития. Но, судя по тому, что была получена только одна мышь, от-

рицательное влияние повышенной экспрессии трансгена было значительным. В обсуждении результатов авторы также придерживаются версии исследователей из Аризонского университета [10] об отрицательном влиянии повышенного уровня экспрессии *Nat* человека в организме трансгенных мышей на эмбриональное развитие и жизнеспособность потомства [55].

В этом исследовании [55] основателем линии послужила только одна мышь, в геном которой интегрировалась только одна копия трансгена, которая создавала не очень высокий уровень продукта экспрессии трансгена, и, как полагают авторы, благодаря этому мышь родилась живой и способной передавать трансген потомству.

Если признать эту версию об одной копии трансгена корректной, то можно предположить, что для получения трансгенных животных (мышей) с генами *Nat1* и *Nat2* человека целесообразно использовать генно-инженерные конструкции, созданные на основе ретровирусных векторов, потому что эти конструкции интегрируются в геном хозяина только в количестве одной копии [8, 12, 20].

В дальнейшем эта мышь была скрещена с мышами дикого типа *B6* и передавала трансген по наследству. Трансмиссия трансгена потомкам составляла около 50%, что свидетельствует о встраивании трансгена во всю популяцию гомозигот. Эта мышь послужила основателем трансгенной линии, которая была получена в результате скрещивания на протяжении 10-ти генераций.

Активность фермента NAT2 человека в печёночном цитозоле трансгенных мышей этой линии, измеренная с ис-

пользованием сульфаметазина (SMZ) – селективного субстрата для *Nat2* человека, была в 40-80 раз выше чем у мышей *B6* дикого типа. При этом активность фермента была в 2 раза выше у самцов, чем у самок. В плазме крови у трансгенных мышей также был повышенный уровень активности *Nat2* человека.

Заключение

Значительным ограничением в использовании животных моделей для изучения метаболизма лекарств и оценки риска их применения для человека является экстраполяция результатов, полученных в экспериментах на животных, на физиолого-биохимические процессы, происходящие в организме человека, если имеются заметные межвидовые различия в ферментах метаболизма ксенобиотиков. Для снятия этого ограничения необходимо получать трансгенных животных с человеческими генами, чтобы создать более прогнозируемые модели изучения ферментов биотрансформации ксенобиотиков. Такие трансгенные биомодели будут иметь каталитическую активность, в большей степени сравнимую с таковой в клетках человека, и могут дать более точный ответ организма человека на тот или иной ксенобиотик.

Анализ литературных данных и результатов собственных исследований свидетельствует, что при получении полноценных трансгенных мышей, экспрессирующих высокий уровень *Nat1*, *Nat2* и *Cyp3A4* человека и передающих трансген по наследству, возникают определённые трудности.

Эти трудности связаны с тем, что ген *Nat1* человека начинает экспрессировать в эмбрионах, находящихся на ста-

дии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции [52], а повышенный уровень экспрессии трансгенов *Nat* человека приводит к снижению уровня фолиевой кислоты в эмбрионах и плодах мышей, что вызывает резорбцию эмбрионов или рождение детёнышей со значительными дефектами [11, 51]. По мнению исследователей, занимавшихся получением трансгенных мышей с генами *Nat1* и *Nat2* человека, выживают только потомки с невысоким уровнем экспрессии трансгена, имеющие, чаще всего, 1 копию трансгена [10, 51, 55].

Если признать версию о достаточности одной копии трансгена корректной, то можно предположить, что для получения трансгенных мышей с генами *Nat1*, *Nat2* и *Cyp3A4* человека целесообразно использовать генно-инженерные конструкции, созданные на основе ретровирусных векторов, потому что эти конструкции интегрируются в геном хозяина только в количестве одной копии [8, 20, 46].

Существенным моментом, на который следует обратить внимание при получении трансгенных животных, и в частности мышей с интегрированными генами *Nat1* и *Nat2* человека, является подбор промоторов для генно-инженерных конструкций. Как показали наши исследования [1], для получения трансгенных животных малоприспособны разные варианты цитомегаловирусного промотора, т.к. этот промотор начинает включать экспрессию трансгена на очень ранних стадиях развития эмбриона, что, чаще всего, приводит к гибели эмбриона или плода.

По нашим данным, чрезмерная экспрессия трансгена на ранних стади-

ях развития эмбриона, обусловленная действием *cmv*-промотора, приводит к резкому смещению синтетических процессов в сторону синтеза чужеродного белка, что вызывает усиленное отвлечение аминокислот на синтез этого белка и гибель эмбриона [1].

Для исключения влияния мышечной эндогенной NAT-активности на процессы, происходящие в организме трансгенных мышей под действием интегрированного чужеродного гена *Nat1* человека, этих мышей скрещивают с мышами, имеющими двойной нокаут обоих генов *Nat1* и *Nat2*.

Нами показано, что экспрессия трансгена *Nat2* человека значительно подавляет синтез эндогенной мышечной мРНК *Nat2* (аналог *Nat1* человека) в печени и других тканях трансгенных мышей [10].

Можно предположить, что путём скрещивания между собой мышей трансгенных по *Nat1* и *Nat2* человека можно получить линии мышей, у которых будут экспрессировать одновременно трансгены *Nat1* и *Nat2* человека на фоне пониженного уровня мышечного эндогенного *Nat2*.

В результате такого скрещивания нами получены гуманизированные мыши, которые могут служить хорошими биомоделями в прогнозировании реакции человека на воздействие ариламинов или гетероциклических аминов, как ксенобиотиков, так и многочисленных лекарств.

Анализ собственных результатов и причин неудач в создании трансгенных животных позволил получить нам гуманизированных мышей с интегрированными генами *Nat1* и *Nat2*, обеспечивающими специфическую экспрессию

трансгенов, а также создать ДНК-конструкции для животных, несущих ген *CYP3A4*. Для получения гуманизированных трансгенных мышей с генами *Nat* и *CYP* человека и с минимальным влиянием эндогенных *Nat* мыши на процессы ацетилирования можно обойтись без использования нокаутных животных, у которых наблюдаются определённые физиолого-биохимические и морфологические нарушения.

Список литературы

1. *Езерский В.А., Тевкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Шишиморова М.С., Безбородова О. А., Якубовская Р.И., Рябых В.П.* Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов // Проблемы биологии продуктивных животных. 2013. 4:33-52.
2. *Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.* Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина, № 4, 2006, с. 85.
3. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 2004, 607 с.
4. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т.1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2007, 320 с.
5. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007, 448 с.
6. *Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В.* Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных. // Биомедицина. 2014. № 2, с. 4-16.
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. – М.: Профиль–2С, 2010, 358 с.
8. *Рябых В.П., Шишиморова М.С., Трубицина Т.П., Фаткулина О.Б., Тевкин С.И., Сметанина И.Г.* Исследование физиолого-эмбриологических и молекулярно-биологических процессов, лежащих в основе трансгеноза у сельскохозяйственных животных. // Труды регионального конкурса научных проектов РФФИ в области естественных наук. 2007. Вып. 11. С. 451-471.
9. *Boukouvava S. and Sim E.* Expression of murine NAT genes in early development // IUBS, Birmingham, 2000. July.
10. *Cao W., Chau B., Hunter R., Strnatka D., McQueen C.A., Erickson R.P.* Only low levels of exogenous Nacetyltransferase can be achieved in transgenic mice // Pharmacogenomics J. 2005, 5 :255–261.
11. *Cao W., Strnatka D., McQueen C.A., Hunter R.J., Erickson R.P.* N-Acetyltransferase 2 activity and folate levels // *Life Sci.* 2010. 86 :103–106.
12. *Chan A.W.S., Homan E.J., Ballou L.U., Burns J.C., Bremel R.D.* Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes // *Prod. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 95 :14028–14033.
13. *Clark A.J., Simons J.P., Wilmut I., Lathe R.* Pharmaceuticals from transgenic livestock // *Trends Biotech.* 1987. 5 :20-24.
14. *Cribb A.E., Grant D.M., Millar M.A., Spielberg S.P.* Expression of monomorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1991. 259 :1241-1246.
15. *Doll M.A., Zang Y., Moeller T., and Hein D.W.* Codominant expression of N-acetylation and O-acetylation activities catalyzed by N-acetyltransferase 2 in human hepatocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010. 334 :540–544.
16. *Erickson R., Morgan C., McQueen C.A.* 2nd International NAT workshop, Eynsham, Oxford, 2000 abstract no. 1 (цит. по Sim E. 2003).
17. *Estrada-Rodgers L., Levy G.N., Weber W.W.* Substrate selectivity of mouse N-acetyltransferases 1, 2 and 3 expressed in COS-1 cell // *Drug Metab Dispo.* 1998. 26 :502–505.
18. *Fretland A.J., Doll M.A., Gray K., Feng Y., Hein D.W.* Cloning, sequencing, and recombinant expression of *Nat1*, *Nat2*, and *Nat3* derived from the C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: functional characterisation of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997. 142 :360-366.

19. **Glowinski I.B., Weber W.W.** Genetic regulation of aromatic amine *N*-acetylation in inbred mice // *J. Biol. Chem.* 1982. **257** :1424–1430.
20. **Haskell R.E., Bowen R.A.** Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. **40**:386–390.
21. **Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb S.J., Xio G.H.** Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000. **9** :29–42.
22. **Hickman D., Pope J., Juchau M.R., Namkung M.J., Berry D.L., Zachariah P.K.** Oxidative biotransformations of 2-acetylaminofluorene fetal and placental tissues of humans and monkeys: correlation with arylhydro-carbon hydroxylase activities // *Drug Metab. Dispos.*, 1975. **3**:494-501.
23. **Hickman D., Pope J., Patil S.D., Fakis G., Smelt V.M., Stanley L.A., Payton M.A., Unadkat J.D., Sim E.** Expression of arylamine *N*-acetyltransferase in human intestine. *Gut*, 1998. **42**:402-409.
24. **Ilett K.F., Ingram D.M., Carpenter D.S., Teitel C.H., Lang N.P., Kadlubar F.F., Minchin R.F.** Expression of monomorphic and polymorphic *N*-acetyltransferases in human colon // *Biochem. Pharmacol.*, 1994. **47**:914-917.
25. **Jenne J.W.** Partial purification and properties of the isoniazid transacetylase in human liver: its relationship to the acetylation of *p*-aminosalicylic acid // *Clin. Invest.*, 1965. **44**:1992-2002.
26. **Johnson N., Troen A., Fernando S., Warren D., Nagy Z., Smith A.D., Sim E.** Investigation of *W*-acetyltransferase (NAT1) in Alzheimer's disease: identification of a novel NAT1 allelic variant // *Eurotox.* 2000. London. September.
27. **Kawamura A., Westwood I., Wakefield L., Long H., Zhang N., Redfield C., Sim E.** Mouse *N*-acetyltransferase type 2, the homologue of human *N*-acetyltransferase type 1 // *Biochem. Pharmacol.* 2008. **75**:1550–1560.
28. **King C.M., Land S.J., Jones R.F., Debiec-Rychter M., Lee M.S., Wang C.Y.** Role of acetyltransferases in the metabolism and carcinogenicity of aromatic amines // *Mutat. Res.*, 1997. **376**:123-128.
29. **Kloth M.T., Gee R.L., Messing E.M., Swaminathan S.** Expression of *N*-acetyltransferase (NAT) in cultured human uroepithelial cells // *Carcinogenesis*, 1994. **15**:2781-2787.
30. **Koch I., Weil R., Wolbold R., Brockmoller J., Hustert E., Burk O., Nuessler A., Neuhaus P., Eichelbaum M., Zanger U., et al.** (2002) Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome p450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* **30**:1108-1114.
31. **Lamba J.K., Lin Y.S., Thummel K., Daly A., Watkins P.B., Strom S., Zhang J., Schuetz E.G.** (2002) Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* **12**:121-132.
32. **Lammer E.J., Shaw G.M., Iovannisci D.M., Finnell R.H.** Periconceptional multivitamin intake during early pregnancy, genetic variation of acetyl-*N*-transferase 1 (NAT1), and risk for orofacial clefts // *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2004. **70**:846–852.
33. **Laurence K.M., James N., Miller M.H., Tennant G.B., Campbell H.** Double-blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects // *Br. Med. J. (Clin Res Ed)*. 1981. **282**:1509–1511.
34. **Leff M.A., Fretland A.J., Doll M.A., Hein D.W.** Novel *N*-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype // *Biol. Chem.*, 1999. **274**:34519-34522.
35. **Loehle J.A., Cornish V., Wakefield L., Doll M.A., Neale J.R., Zang Y., Sim E., Hein D.W.**
36. **Martell K.J., Vatsis K.P., Weber W.W.** Molecular genetic basis of rapid and slow acetylation in mice // *Mol. Pharmacol.*, 1991. **40**:218-227.
37. **McNulty, H., McPartlin, J., Weir, D. and Scott, J.** Folate catabolism is increased during pregnancy in rats. // *Nutr.*, 1993. **123** :1089-1093.
38. **McPartlin, J., Halligan, A., Scott, J.M., Darling, M. and Weir, D.G.** Accelerated folate breakdown in pregnancy // *Lancet*, 1993. **341** :148-149.
39. **Minchin R.F.** Acetylation of *p*-aminobenzoyl-glutamate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine *N*-acetyltransferase and U937 cells // *Biochemistry*. 1995. **30**:7:1–3.
40. **Mitchell M.K., Futscher B.W., McQueen C.A.** Developmental expression of *JV*-acetyltransferases in C57Bl/6 mice // *Drug Metab. Dupo.* 1999. **v.**, **27**:261-264.
41. **MRC Vitamin Study Research Group.** Prevention of neural tube defects: results of the MRC vitamin study. *Lancet*, 1991. **338**:131-137.
42. **Murdoch J.N., Henderson D.J., Doudney K., Gaston-Massuet C., Phillips H.M., Pater-**

- notte C., Arkell R., Stanier P., Copp A.J.* // Hum. Mol. Genet. 2003. 12. :87–98 (цит. по Sim E. 2003).
43. *Ohsako S., Deguchi T.* Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases of human liver // J. Biol. Chem., 1990. 265 :4630-4634.
44. *Pacific I., Benicini C., Rane A.* Acetyltransferases in humans: development and tissue distribution // Pharmacology, 1986. 32:283-291.
45. *Payton M., Smelt V., Upton A. and Sim E.* A method for genotyping murine arylamine / V-acetyltransferase type 2 (NAT2): a gene expressed in preimplantation embryonic stem cells encoding an enzyme acetylating the folate catabolite p-aminobenzoylglutamate // Biochem. Pharmacol., 1999. 58:779-785.
46. *Pursel V.G., Pinkert C., Miller K., Campbell R.G., Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E.* Genetic engineering of livestock // Science. 1989. 244:1281-1288.
47. *Risch A., Smelt V., Lane D., Stanley L.A., van der Slot W., Ward A., Sim E.* Arylamine N-acetyltransferase in erythrocytes of cystic fibrosis patients // Pharmacol. Toxicol., 1996. 78:235-240.
48. *Robertson G.R., Field J., Goodwin B., Bicerach S., Tran M., Lehnert A., Liddle C.* Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation // Mol. Pharmacol. 2003 Jul; 64(1):42-50.
49. *Sadrieh N., Davis C.D., Snyderwine E.G.* N-acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland // Cancer Res., 1996. 56:2683-2687.
50. *Sakuma T., Takai M., Endo Y., Kuroiwa M., Ohara A., Jarukamjorn K., Honma R., Nemoto N.* (2000) A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver. Arch Biochem Biophys 377: 153-162.
51. *Sim E., Pinter K., Mushtaq A., Upton A., Sandy J., Bhakta S.* Arylamine N-acetyltransferases: a pharmacogenomics approach to drug metabolism and endogenous function // Biochem. Soc. Trans. 2003. 31:615–619.
52. *Smelt V.A., Upton A., Adjaye J., Payton M.A., Boukouvala S., Johnson S., Mardon H.J. and Sim E.* Expression of arylamine /V-acetyltransferases in pre-term placentas and in human pre-implantation embryos // Hum. Mol Genet., 2000. 9:1101-1107.
53. *Smelt V.A., Mardon H.J., Sim E.* Placental expression of arylamine N-acetyltransferases: evidence for linkage disequilibrium between NAT1*10 and NAT2*4 alleles of the two human arylamine N-acetyltransferase loci NAT1 and NAT2 // Pharmacol. Toxicol., 1999. 83:149-157.
54. *Stanley L.A., Mills I.G., Sim E.* Localization of polymorphic A'-acetyltransferase (NAT2) in tissues of inbred mice. //Pharmacogenetics.. 1997. 7:121-130.
55. *Sugamori K., Brennehan D., Grant D.M.* Liver-Selective Expression of Human Arylamine N-Acetyltransferase NAT2 in Transgenic Mice // Drug metabolism and disposition. 2011. 39:882–890.
56. *Sugamori K., Wong S., Gaednigk A., Abramovici H., Rozmahel R., Grant D.* Generation and functional characterization of arylamine N-acetyltransferase Nat1/Nat2 double knockout mice // Mol. Pharmacol. 2003. 64:170–179.
57. *Wakefield L., Cornish V., Long H., Griffiths W.J., Sim E.* Deletion of a xenobiotic metabolizing gene in mice affects folate metabolism // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. 364:556–560.
58. *Wakefield L., Long H., Lack N., Sim E.* Ocular defects associated with a null mutation in the mouse arylamine N-acetyltransferase 2 gene // Mamm. Genome. 2007. 18:270–27.
59. *Ward A., Summers M.E., Sim E.* Purification of recombinant human N-acetyltransferase type 1 expressed in *E.coli* and characterisation of its potential role in folate metabolism // Biochem. Pharmacol., 1995. 49:1759-1767.
60. *Weber W.W., Vatsis K.P.* Individual variability in p-amino-benzoic acid acetylation by human N-acetyltransferase (NAT1) of peripheral blood. Pharmacogenetics, 1993. 3:209-212.
61. *Windmill K.F., McKinnon R.A., Zhu X.Y., Gaedigk A., Grant D.M., McManus M.E.* The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies // Mutat. Res., 1997. 376:153-160.
62. *Xie W., Barwick J.L., Downes M., Blumberg B., Simon C.M., Nelson M.C., Neuschwander-Tetri B.A., Brunt E., Guzelian P.S., Evans R.M.* (2000a) Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. Nature (Lond) 406:435-439.

Creation of humanized mice for pharmacological and toxicological research (progress, failures and prospects)

N.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, V.N. Karkischenko, E.M. Koloskova

Analysis of successes and failures in obtaining transgenic mice with integrated human *Nat* genes and *CYP3A4*, based on the literature data and the results of our own research to use them as biomodels when tested pharmacological efficacy and toxicity of drugs. The analysis of possible causes of failure in obtaining transgenic mice with increased expression of human genes *Nat1*, *Nat2*, and *CYP3A4*, transmitting the transgene inheritance and humanized mice were done. The importance of the role of the promoter in the creation of genetically engineered structures discusses. Its own evidence that to obtain transgenic animals by microinjection method gene constructs into the zygotes pronucleus little different variants cytomegalovirus promoter (*cmv*). This *cmv*-promoter starts to include uncontrolled transgene expression at very early stages of embryo development, which often leads to his death provides. The possibility to obtain lines of humanized mice with integrated human genes *Nat1* and *Nat2* and a very low level of activity of endogenous *Nat2* without using mice with knockout genes, *Nat1* and *Nat2* for crossing with transgenic mice. The analysis of our own results and causes of failures in obtaining of transgenic animals helped to get us humanized mice with integrated *Nat1* and *Nat2* genes, providing specific transgenes expression and create DNA-construction for animals with *CYP3A4* gene.

Key words: transgenic mice with integrated human genes, humanized mice, chimera animals, *N*-acetyltransferase (*Nat1* and *Nat2*), cytochrome P450, *Cyp3A4* genes, expression of *Nat1*, *Nat2*, and *Cyp3A4* genes, choice and construction of promoters, biomodels, extrapolation to human population.

Противоишемические свойства метаболических средств в эксперименте

А.И. Селезнёва, И.Е. Макаренко, А.Е. Касторнова, С.В. Ходько,
М.А. Ковалёва

ЗАО «НПО «Дом фармации», Санкт-Петербург

Контактная информация: к.м.н. Селезнёва Арина Игоревна, arina_selezneva@mail.ru

В статье рассмотрена сравнительная характеристика эффективности лекарственных средств базовой терапии ишемической болезни сердца и препаратов метаболического действия при экспериментальном инфаркте миокарда. В результате проведенных исследований установлена патогенетическая направленность эффективности метаболических средств и обоснована целесообразность и необходимость их лечебно-профилактического применения при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Ключевые слова: ишемия, метаболические средства, эксперимент, неоваскуляризация.

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и инфаркт миокарда (ИМ) являются одними из ведущих причин смертности и снижения качества жизни во всем мире [8, 14]. Для лечения ИБС используются различные группы препаратов, позволяющие снизить выраженность симптоматики, увеличить выживаемость и улучшить качество жизни, снизить риск развития ИМ [1, 5, 6]. Долгое время основными препаратами «базовой терапии» ИБС были лекарственные средства таких групп как β -блокаторы, ингибиторы РААС (ренин-ангиотензин-альдостероновой системы), блокаторы кальциевых каналов, гиполипидемические средства и антиагреганты [9, 10]. Однако большинство препаратов этих групп характеризуются способностью эффективно влиять только на основные симптомы ИБС, не затрагивая патогенетические звенья ишемии. Следует отметить, что для препаратов «базовой

схемы лечения» характерны многочисленные побочные эффекты, являющиеся, по сути, продолжением их основного терапевтически желательного воздействия на сердечно-сосудистую систему и, в ряде случаев, существенно ограничивающие их применение [13].

В связи со всем вышеописанным, можно сделать вывод, что современная схема лечения и профилактики ИБС фактически не предполагает наличия препаратов для патогенетической терапии. Исключение составляют гиполипидемические средства, которые способны снизить риск ИМ за счет влияния на атерогенез.

Наибольшие потребности в кислороде испытывает миокард и кора головного мозга, а, следовательно, эти органы наиболее подвержены ишемическому поражению. Основной причиной ишемии миокарда является гипоксия. Гипоксия может быть вызвана спазмом коронарных сосудов и системной артериальной

гипертензией, атеросклерозом сосудов, гипертрофией миокарда и увеличением работы сердца и другими факторами.

Ишемия в результате гипоксии вызывает преходящие изменения метаболизма, электрической и механической активности сердца. Внезапная тяжелая ишемия (окклюзия или субтотальный стеноз коронарной артерии) почти сразу нарушает сокращение и расслабление миокарда.

В основе нарушений сократимости лежат изменения метаболизма, структуры и функции кардиомиоцитов. При тяжелой гипоксии жирные кислоты не окисляются, а глюкоза распадается до молочной кислоты. Внутри клеток снижается рН, резко уменьшаются запасы макроэргических фосфатов – АТФ и креатинфосфата. Нарушается работа $\text{Na}^+\text{K}^+\text{АТФазы}$: калий выходит из клетки, а натрий поступает внутрь. Будет ли повреждение преходящим или разовьется инфаркт миокарда, зависит от тяжести и продолжительности гипоксии. Таким образом, для патогенетической терапии ИБС необходимо использовать средства, применение которых способно ограничить продолжительность гипоксии и восполнить энергетические потребности миокарда. Такими эффектами характеризуются метаболические средства – антиоксиданты и антигипоксанты (Убихинон, Гипоксен), ангиопротекторы (Кверцетин), миокардиальные цитопротекторы (Триметазидин) [6, 7]. Применение этих групп препаратов является одним из ключевых перспективных направлений патогенетической терапии ИБС.

Появление в современной медицине новых и воспроизведенных лекарственных средств во многом зависит от

широты спектра проведенных экспериментальных и клинических испытаний, которые позволяют установить перспективность применения и возможности использования нового препарата. Доклинические исследования эффективности ЛС позволяют выявить основные эффекты и механизмы действия, а грамотный подбор методологии способствует прогнозированию широты применения нового препарата и его судьбы в клинике.

В нашем исследовании проведена сравнительная экспериментальная оценка эффективности применения средств патогенетической и симптоматической терапии при моделировании острого ИМ у крыс, а также применения метаболических средств, антиоксидантов и цитопротекторов при ИБС.

Материалы и методы

Сравнивали эффективность применения метаболических препаратов Триметазида (группа цитопротекторов), Гипоксена и нового препарата на основе Убидекаренона (группа антиоксидантов и антигипоксантов) с препаратами базового спектра терапии – Верапамил (блокатор кальциевых каналов) и Анаприлин (β -блокатор).

Экспериментальное исследование проводилось на крысах-самцах линии Wistar. Животные конвенциональные, 12-недельного возраста, самцы, в количестве 180 особей, массой 250-300 г, были получены из питомника лабораторных животных РАМН «Рапполово». Животные содержались в виварии, в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» от 2 де-

кабря 2009 г. В период акклиматизации и эксперимента животные были размещены в поликарбонатных клетках фирмы Charles River laboratories Inc тип 3Н со стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. В каждой клетке размещалось по 5 крыс (площадь пола на 1 животное составляла 474 см²). Для кормления использовали комбикорм ПК-120-1, приготовленный по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.

Индукция острого ИМ осуществлялась по методу Н. Selye [19] – окклюзия нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка.

Для оценки противоишемического действия исследуемых средств были сформированы 9 групп животных по 20 крыс в каждой.

Растворы исследуемых препаратов вводили внутривенно. Животным контрольной группы моделировали острый ИМ и вводили плацебо. В исследование были включены интактная группа животных без патологии, не получавшая лечения, и ложнооперированная группа животных, которым был осуществлен оперативный доступ без перевязки коронарной артерии.

Животные получали препараты согласно лечебно-профилактической схеме в течение 7 дней до и 14 после ОЭИМ (острой экспериментальной ишемии миокарда).

Для изучения и сравнения противоишемического действия исследуемых средств оценивали их влияние на выживаемость животных в постинфарктном периоде, параметры деятельности миокарда по ЭКГ через 24 ч и 14-е сутки после инфаркта, активность аминотран-

сфераз, ЛДГ (лактатдегидрогеназы) и КФК (креатинфосфокиназы).

Гистологическая и патоморфологическая оценка повреждения и восстановления миокарда осуществлялась методом микроскопической оценки срезов миокарда и количественной оценки васкуляризации зоны инфаркта и глубины поражения ткани.

Полученные данные анализировали с помощью программы Статистика 6.0 (StatSoft, Россия). Для всех данных применялась описательная статистика.

Результаты и их обсуждение

Важнейшим критерием эффективности терапии в постинфарктном периоде является влияние исследуемых препаратов на смертность экспериментальных животных. При применении препаратов в большинстве случаев смертность снижалась на 5-10% (табл. 1).

Таблица 1
Смертность животных при ОЭИМ

Характеристика группы	Пало/выжило	Смертность, %
Интактная	0/20	0
Ложнооперированная	1/20	5
Контрольная	6/20	30
Верапамил 25 мг/кг	4/20	20
Анаприлин 6,4 мг/кг	4/20	20
Препарат на основе Убидекаренона 1,6 мг/кг	5/20	20
Гипоксен 50 мг/кг	6/20	30
Кверцетин 3,3 мг/кг	5/20	25
Триметазидин 5,2 мг/кг	5/20	25

Как видно из табл. 1, применение препаратов «базовой» терапии ИБС приводило к снижению уровня смертности на

10%. При этом терапия метаболическими средствами также выражено снижала уровень смертности при ОЭИМ. Так, смертность животных в группах, получавших Кверцетин и Триметазидин, составляла 25%. Смертность животных, которым вводили препарат на основе Убидекаренона, снижалась на фоне применения препарата на 10% и составляла 20%, также как и в группах, получавших Анаприлин и Верапамил.

Влияние на степень выраженности патофизиологических изменений при ОЭИМ оценивали по параметрам ЭКГ экспериментальных животных через 24 ч и 14 дней после перевязки коронарной артерии. Было установлено выраженное влияние препаратов разных групп на сегмент ST (рис. 1, 2).

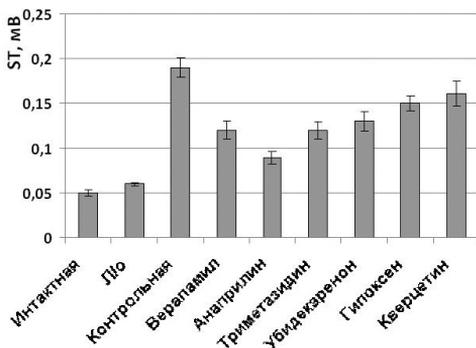


Рис. 1. Амплитуда сегмента ST через 24 ч после ОЭИМ.

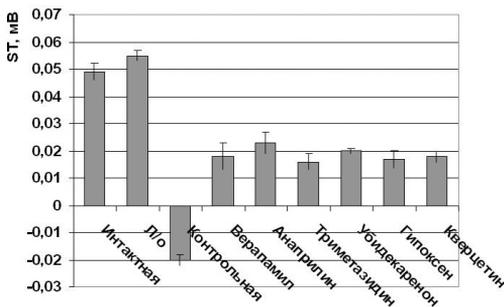


Рис. 2. Амплитуда сегмента ST через 14 дней после ОЭИМ.

Через 24 ч после моделирования инфаркта у животных контрольной группы наблюдался подъем сегмента ST, в среднем, в 3,5 раза по сравнению с интактной группой. У животных, получавших препараты «базовой» схемы, амплитуда сегмента ST увеличивалась, в среднем, в 1,8-2 раза. Применение препаратов базовой схемы (Анаприлин и Верапамил) в острой фазе ОЭИМ оказалось эффективнее использования средств метаболического ряда на 10-27%. Однако использование метаболических препаратов также приводило к статистически значимому снижению амплитуды ST на 21-37% по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что препараты «базовой» схемы и средства метаболического ряда могли реализовать эффективность в отношении острого ишемического процесса через разные механизмы. Так, применение Анаприлина и Верапамила ограничивает распространение ишемии за счет уменьшения работы сердца – снижения ЧСС, сердечного выброса и ударного объема. Однако именно в результате этого механизма действия проявляются такие побочные эффекты β -блокаторов и блокаторов кальциевых каналов как атрио-вентрикулярная блокада, сердечная недостаточность, спазм периферических сосудов и др. Метаболические средства в этом случае, вероятно, осуществляли свой эффект через участие в процессах синтеза АТФ в митохондриях, не оказывая существенного влияния на функциональную активность миокарда. При этом профилактическое применение данных препаратов даже в течение 7 дней позволило ограничить степень поражения сердечной мышцы.

Через 14 дней после инфаркта в контрольной группе на ЭКГ наблюдали

снижение сегмента ST ниже изолинии, что говорило о развитии некротических процессов в ишемизированном участке миокарда (рис. 2).

В группах, получавших препараты обеих схем лечения, сегмент ST был положительным. Следует отметить, что эффективность препаратов обеих схем лечения на 14-й день была сопоставимой.

При оценке влияния исследуемых препаратов на биохимические маркеры (активность ЛДГ, КФК и АСТ) было установлено, что эффективность препаратов «базовой» схемы и средств метаболического ряда в отношении этих параметров сопоставимы.

Гистологическая оценка глубины поражения миокарда и подсчет количества новообразованных сосудов дифференцированного и недифференцированного типа позволили расширить представления о возможных механизмах действия метаболических средств.

Так, было установлено, что применение метаболических препаратов, в отличие от средств базовой терапии, приводило к уменьшению глубины поражения миокарда и увеличению количества новообразованных сосудов. Для восстановления деятельности сердца в постинфарктный период в миокарде происходит активизация процессов образования новых сосудов. Это сосуды с тонкой стенкой, недифференцированные, обладающие слабой функциональной активностью. Поэтому в дальнейшем подобные сосуды дифференцировались на артериолы и венулы (рис. 3). Следует отметить, что при применении препарата Убидекаренона происходило увеличение количества дифференцированных сосудов относительно синусоидов, что является благоприятным диагностическим признаком, свидетельствующим об усилении процессов ревазуляризации и восстановления функциональной активности поврежденного миокарда (табл. 2, рис. 4).

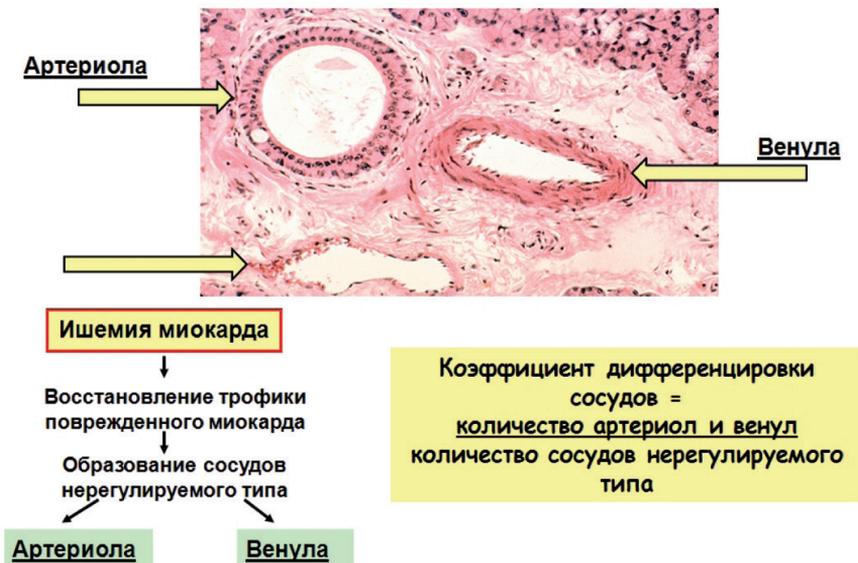


Рис. 3. Дифференцировка сосудов при ишемии миокарда.

Таблица 2

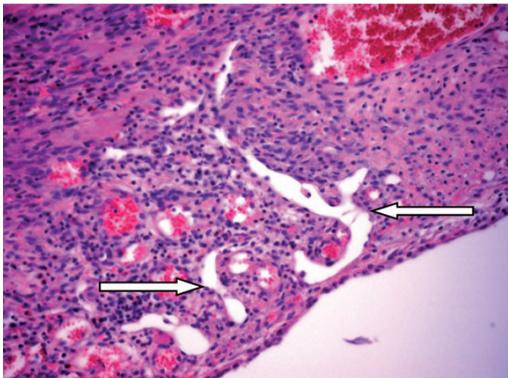
Влияние применение метаболических средств на коэффициент дифференцировки сосудов поврежденного миокарда

Характеристика группы	Коэффициент дифференцировки сосудов, $M \pm m$
Контрольная	0,4±0,03
Верапамил 25 мг/кг	0,9±0,08
Анаприлин 6,4 мг/кг	0,8±0,03
Препарат на основе Убидекаренона 1,6 мг/кг	2,2±0,08*
Гипоксен 50 мг/кг	1,5±0,02*
Кверцетин 3,3 мг/кг	1,7±0,01*
Триметазидин 5,2 мг/кг	1,3±0,02*

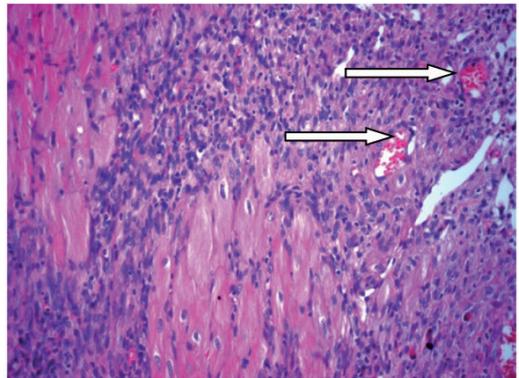
Примечание: * – различия статистически значимые по сравнению с контрольной группой (t-тест для независимых переменных при $p < 0,05$).

Заключение

В условиях экспериментального исследования было установлено, что эффективность препаратов метаболического действия и препаратов из групп β -блокаторов и блокаторов кальциевых каналов в отношении острой ишемии миокарда равносоставима. Было доказано, что использование средств метаболической коррекции в течение длительного периода способствует ускорению восстановительных процессов и усилению неоваскуляризации (Убидекаренон), что было нехарактерным для применения препаратов «базовой» терапии. Стоит отметить, что применяемые в исследовании препараты метаболического действия характеризуются выраженными антиоксидантными свойствами. Одним из эффективных кардиоцитопротекторов и антиоксидантов является Убидекаренон (Кознзим-Q10, Убихинон) [2]. Показано, что Убидекаренон обладает выраженным антиатеро-



А



Б

Рис. 4. Влияние применения препарата на основе Убидекаренона на выраженность ишемических повреждений миокарда через 14 дней после ОЭИМ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.

А – инфаркт миокарда без лечения. В зоне организации инфаркта преобладают капилляры синусоидного типа (с прерывистым эндотелием, обозначены стрелками);

Б – инфаркт миокарда при лечении препаратом на основе Убидекаренона. В зоне организации инфаркта преобладают капилляры регулируемого типа.

генным эффектом [20], что еще раз доказывает необходимость его включения в терапию и профилактику ишемических процессов. Кроме того, имеются данные о прямом положительном эффекте Убидекаренона на эндотелиальную функцию [17]. Свойства Коэнзим-Q10, связанные с восстановлением NO-зависимой дилатации коронарных артерий, и его прямые антиоксидантные эффекты чрезвычайно важны для лечения стенокардии, атеросклероза, метаболического синдрома и др. Получено большое количество сведений, касающихся эффективности и безопасности применения Коэнзим-Q10 при сахарном диабете и гипертонической болезни [16, 18]. Была установлена также высокая эффективность применения Триметазидина, реализующаяся за счет цитопротекторного антиишемического действия и антиоксидантных свойств [7]. Применение Гипоксена способствовало снижению смертности и уменьшению выраженности повреждения миокарда преимущественно через 14 дней после перевязки артерии. Антигипоксическое действие Гипоксена осуществляется в результате шунтирования транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий (с I-го и II-го комплексов на III-й), так как его окислительно-восстановительный потенциал составляет 300 мВ, что близко к значениям для цитохромоксидазы [3, 12]. Эффективность Кверцетина в условиях ОЭИМ была также сопоставима с таковой препаратов «базовой» схемы, что подтверждает его выраженные антиоксидантные и кардиопротективные свойства [15].

Проведенное исследование позволило сделать интересное наблюдение относительно характера эффективности

двух направлений терапии ИБС. Так, при лечении Анаприлином и Верапамилом наблюдали наибольшую эффективность в острой стадии ОЭИМ, что проявлялось в более выраженном снижении амплитуды сегмента ST, чем при применении метаболических препаратов. Это отличие характеристики эффективности препаратов, вероятно, связано с тем, что основным механизмом противоишемического действия β -блокаторов и блокаторов кальциевых каналов связан с ограничением участка инфаркта за счет резкого снижения сократительной функции миокарда. В этом периоде ОЭИМ метаболические средства были менее эффективны, так как точкой приложения этих препаратов является восстановление процессов энергообеспечения миокарда, неоваскуляризация, кардио- и ангиопротекторное действие и восстановление коронарного кровотока за счет влияния на эндотелий-зависимую регуляцию сосудистого тонуса. Препараты метаболического действия слабо влияют на сократительную функцию миокарда, более того, в исследованиях на изолированном сердце был установлен положительный инотропный эффект препарата на основе Убидекаренона, проявляющийся, вероятно, за счет его кардиотонического действия [11]. Через 14 суток после ОЭИМ эффективность препаратов «базовой» схемы и метаболических средств была одинаковой, что свидетельствует о нарастающем, постепенном развитии и усилении эффекта метаболических средств за счет влияния на восстановительные процессы в поврежденной ткани. Важнейшим подтверждением проявления активности метаболических препаратов в восстановительных процессах мио-

карда является влияние на образование новых сосудов и их дифференцировку. В проведенном исследовании было установлено преимущество эффективности метаболических средств перед Анаприлином и Верапамилом в отношении параметров неоваскуляризации. Следует отметить, что ключевой вклад как в регенераторные, так и в протекторные свойства вносят выраженные антиоксидантные свойства каждого из исследуемых метаболических препаратов. Важной характеристикой фармакологического действия метаболических препаратов является более продолжительное развитие их эффектов, нежели у препаратов «базовой» схемы. Как свидетельствует многолетний опыт клинической и экспериментальной фармакологии, препараты, способные развивать свой эффект «на кончике иглы», имеют такую же острую и выраженную опасность развития побочных эффектов и осложнений. Применение β -блокаторов и блокаторов кальциевых каналов, безусловно, остается исключительно важным ключом экстренной терапии острых сердечно-сосудистых катастроф, так как эти препараты способны обеспечить выраженный и быстрый эффект. Однако эффективность метаболических средств в большинстве случаев сопоставима с таковой препаратов «базовой» схемы лечения и, в отличие от них, имеет патогенетическую направленность, обеспечивающую постепенное усиление восстановительных процессов и защитную функцию при профилактическом применении.

Таким образом, наличие выраженных антиоксидантных, антиатеросклеротических свойств метаболических средств, отсутствие их способности

снижать сократительную функцию миокарда, способность ускорять процессы неоваскуляризации и восстановления функциональной активности поврежденного миокарда позволяют обосновать целесообразность и необходимость применения препаратов метаболического типа действия, как для предотвращения острого ишемического повреждения, так и для успешной реабилитации после уже перенесенного ИМ. Характер действия метаболических средств позволяет сделать вывод о возможности патогенетической терапии ишемической болезни сердца и других заболеваний, связанных с гипоксией и окислительным стрессом. Таким образом, практически не уступая средствам «базовой» терапии по эффективности в отношении симптомов ИМ, метаболические препараты, такие как Триметазидин, Убидекаренон, Гипоксен и Кверцетин, можно в полной мере считать средствами патогенетической терапии и профилактики сердечно-сосудистых патологий.

Список литературы

1. *Аронов Д.М., Лупанов В.П.* Диагностика и лечение хронической ишемической болезни сердца. Качество жизни. - М. Медицина. 2003. С. 16-24.
2. *Аронов Д.М.* Применение коэнзима-Q10 в кардиологической практике // РМЖ. Т. 12. № 15. 2004. С. 905-909.
3. *Гришин Е.В.* Ускорение утилизации лактата под влиянием гипоксена после Напряженной мышечной работы // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2008. № 2. С. 158-161.
4. *Косарев В.В., Бабанов С.А., Астахова А.В.* Фармакология и лекарственная терапия / под ред. В.К. Лепяхина. - М. Эксмо. 2009. С. 10-15.
5. *Косарев В.В., Бабанов С.А.* Клиническая фармакология лекарственных средств, применяемых при сердечно-сосудистых заболеваниях. - Самара. «Офорт». 2010. 140 с.

6. *Мухин В.П.* Кардиоцитопротекторы – новое направление клинической кардиологии // Архив внутренней медицины. 2011. № 1. С. 21-28.
7. *Морозова Т.Е.* Метаболические лекарственные средства в кардиологической практике // Лечащий врач. Кардиология. 2008. С. 1-12.
8. *Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я.* Сердечно-сосудистые заболевания в Российской Федерации во второй половине XX столетия: тенденции, возможные причины, перспективы // Кардиология. 2000. № 6. С. 4-8.
9. Российские рекомендации, разработанные группой экспертов ВНОК. Диагностика и лечение больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы. - М. 2007. 146 с.
10. Российские рекомендации, разработанные группой экспертов ВНОК. Диагностика и лечение стабильной стенокардии. - М. 2009. 37 с.
11. *Селезнева А.И.* Противоишемические, кардиопротективные и антигипертензивные свойства нового антиоксидантного препарата Валокар-Q10 (экспериментальное исследование): Автореф. дис. канд. мед. наук. - СПб. 2013. 23 с.
12. *Смирнов В.С., Кузьмич М.К.* Монография. Гипоксен. - СПб-М. ФАРМиндекс. 2001. С. 34-36.
13. *Сыркин А.Л., Добровольский А.В.* Антиишемические препараты метаболитического действия // Consilium Medicum. 2002. № 4 (11). С. 572-575.
14. *Шальнова С.А., Деев А.Д., Оганов Р.Г.* Факторы, влияющие на смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в российской популяции // Кардиоваск. тер. и проф. 2005. № 4 (1). С. 4-9.
15. *Galindo P., González-Manzano S., Zarzuelo M.J., Gómez-Guzmán M., Quintela A.M., González-Paramás A., Santos-Buelga C., Pérez-Vizcaíno F., Duarte J., Jiménez R.* Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats // Food Funct. 2012. Vol. 3. № 6. P. 643-650.
16. *Lim S.C., Tan H.H., Goh S.K., Subramaniam T., Sum C.F., Tan I.K., Lee B.L., Ong C.N.* Oxidative burden in prediabetic and diabetic individuals: evidence from plasma coenzyme Q(10) // Diabet Med. 2006. Vol. 23. № 12. P. 1344-1349.
17. *Mohr D., Bowry V.W., Stocker R.* Dietary supplementation with coenzyme Q10, results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation // Biochim. Biophys. Acta. 1992. Vol. 1126. P. 247-254.
18. *Rosenfeldt F.L., Haas S.J., Krum H., Hadj A., Ng K., Leong J.Y., Watts G.F.* Coenzyme Q10 in the treatment of hypertension: a meta-analysis of the clinical trials // J. Hum. Hypertens. 2007. Vol. 21 (4). P. 297-306.
19. *Selye E., Bajus S. Grasso.* Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat // Angiology. N 2. 1960. P. 398-407.
20. *Tiano L., Belardinelli R., Carnevali P., Principi F., Seddaiu G., Littarru G.P.* Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: a double-blind, randomized controlled study // Eur. Heart. J. 2007. N 28(18). P. 2249-2255.

Anti-ischemic properties of metabolic drugs in the experiment

A.I. Selezneva, I.E. Makarenko, A.E. Kastornova, S.V. Khodko,
M.A. Kovaleva

In this article the comparative characteristic efficacy of medicines basic therapy of coronary heart disease and metabolic drugs action in experimental myocardial infarction. The studies established pathogenetic orientation metabolic efficiency means and expediency and necessity of their treatment-and-prophylactic use in cardiovascular diseases.

Key words: ischemia, metabolic means, experiment, neovascularization.



Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки

А.А. Карпов^{1,3}, Д.Ю. Ивкин^{1,2}, А.В. Драчева³, Н.Н. Питухина²,
Ю.К. Успенская³, Д.Д. Ваулина⁴, И.С. Усков¹, Ш.Д. Эйвазова³,
С.М. Минасян^{1,3}, Т.Д. Власов³, А.В. Бурякина², М.М. Галагудза^{1,3}

¹ – ФГБУ «ФМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

² – ГБОУ ВПО СПХФА МЗ РФ, Санкт-Петербург

³ – ГБОУ ВПО «СПГМУ им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург

⁴ – ФБГУН «ИМЧ им. Н.П. Бехтеревой» РАН, Санкт-Петербург

Контактная информация: Карпов Андрей Александрович, a--karpoff@mail.ru

В статье обсуждены основные методологические особенности выполнения моделей постинфарктной хронической сердечной недостаточности путем перманентной и временной окклюзии коронарной артерии, а также наиболее эффективные морфофункциональные подходы к оценке постинфарктных изменений миокарда.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, ишемически-реперфузионное повреждение, эхокардиография, RV-петли, перфузия изолированного сердца.

Введение

На сегодняшний день, по данным ВОЗ, инфаркт миокарда (ИМ) занимает лидирующее место среди причин смерти от сердечно-сосудистых заболеваний. Безвозвратная утрата кардиомиоцитов ведет к развитию постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ПИ ХСН), что снижает качество и продолжительность жизни. Несмотря на активное развитие фармакологических подходов в лечении ПИ ХСН, радикального решения этой проблемы добиться не удается. Необходим поиск новых подходов в ле-

чении ИМ, позволяющих сохранить сократительную функцию сердца.

В связи с этим, большой интерес представляют различные экспериментальные модели, воспроизводящие ишемически-реперфузионное повреждение. В реальной клинической практике зачастую невозможно выполнить раннюю реваскуляризацию (тромболизис, коронаропластика), поэтому не теряют своей актуальности модели перманентной ишемии. Эти модели позволяют более детально изучить патофизиологические процессы, происходящие в миокарде при пораже-

нии коронарного русла. Также с их помощью возможно оценить эффективность различных фармакологических агентов и кардиохирургических вмешательств, направленных на сохранение миокарда.

Одним из наиболее точных и показательных подходов к моделированию ПИ ХСН является наложение лигатуры на левую коронарную артерию у крыс [12].

Сложность и многогранность изменений структуры и функциональных показателей сердца в разные периоды после ишемического или ишемически-реперфузионного повреждения потребовали поиска современных подходов к выявлению и оценке этих изменений.

В последние годы в экспериментальной медицине и фармакологии активно используется ряд морфо-функциональных методик, в частности: электрокардиография, трансторакальная эхокардиография, катетеризация камер сердца с регистрацией циклов «объем-давление», перфузия изолированного миокарда, морфологические методы [8].

Целью настоящей работы явилась детальная сравнительная оценка способов моделирования ишемического и ишемически-реперфузионного повреждения миокарда с последующей оценкой его выраженности с помощью различных инструментальных методов.

Материалы и методы

Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности

Эксперименты были выполнены на крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г (питомник «Рапполово», Ленинградская область), содержащихся в условиях 12/12-часового свето-темнового режима и получавших стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*.

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованием лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья США, № 85-23) и были одобрены локальным этическим комитетом.

Моделирование постинфарктной хронической сердечной недостаточности включает в себя ряд обязательных этапов:

- 1) наркотизация,
- 2) искусственная вентиляция легких,
- 3) торакотомия,
- 4) моделирование перманентного ишемического или ишемически-реперфузионного повреждений.

Наркотизация

Основными путями введения наркоза для описываемой модели являются ингаляционный и инъекционный (внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный) (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика ингаляционного и инъекционного путей введения наркоза

Ингаляционный наркоз	Инъекционный наркоз
Преимущества	
Легкость управления глубиной наркоза; окончание действия сразу после отключения животного от дыхательного контура	Техническая легкость выполнения; не требует специальной аппаратуры
Недостатки	
Требуется специальное дорогостоящее оборудование; часто требуется парентеральная премедикация – например, перед интубацией	Сложность управления глубиной сна, риск развития кардиальных и дыхательных осложнений; фиксированное время длительности наркотического сна

На сегодняшний день в качестве препаратов для наркоза преимущественно используют Хлоралгидрат, Кетамин, Тиопентал натрия, Пентобарбитал, Изофлуран и др. Несколько менее востребованными при операциях на грызунах являются Ксилазин, Золетил, Пропофол. Ксилазин (Рометар, Ксила) в моноведении вызывает только седацию и миорелаксацию без сна. Наркоз при однократном введении Пропофола (Диприван) продолжается всего 2-3 мин, в связи с чем требуется непрерывная его инфузия. Использование Золетила (Тилетамина гидрохлорид + Золазепам гидрохлорид) требует внутримышечного введения.

В данной работе был использован Хлоралгидрат, который вводился внутрибрюшинно в дозе 450 мг/кг во время операции. Продолжительность наркоза составляла, в среднем, 1-1,5 часа. Животные располагались на термостатируемом столике.

Искусственная вентиляция легких (ИВЛ)

ИВЛ является обязательным условием выполнения экспериментальных моделей с нарушением герметичности грудной клетки, т.к. при вскрытии единой плевральной полости у крыс дальнейшее самостоятельное расправление легких невозможно.

В данной работе ИВЛ осуществлялась с помощью аппарата SAR-830/AP (США). Частота дыхания: 60/мин, дыхательный объем: 3 мл/100 г массы тела.

Существует два основных способа подключения ИВЛ к дыхательной системе животного:

1) интубация трахеи (интубационная трубка проводится в трахею без нарушения ее целостности, проводя через головые связки);

2) трахеостомия (трахеостомическая трубка проводится через разрез между кольцами трахеи).

Интубация трахеи

Этапы:

1) обработка гортани 2% р-ром Лидокаина для подавления вагусных реакций;

2) визуализация гортани путем переразгибания шейного отдела позвоночника (продольная ось головы, совпадает с продольной осью тела крысы);

3) установка проводника в трахею (во время открытия голосовой щели в фазу вдоха);

4) установка интубационной трубки в трахею по проводнику;

5) удаление проводника;

6) подключение интубационной трубки к ИВЛ.

Трахеостомия

Этапы:

1) разрез кожи по средней линии в области шеи;

2) разведение краев раны и собственных мышц шеи, визуализация трахеи;

3) рассечение ткани передней стенки трахеи в межхрящевом пространстве;

4) установка трахеостомической трубки через образовавшееся отверстие;

5) подключение трахеостомической трубки к ИВЛ.

После завершения эксперимента:

б) удаление трахеостомической трубки;

7) ушивание трахеостомического отверстия узловым швом (шовный материал – пролен 6/0);

8) ушивание операционной раны области шеи;

9) обработка шва послеоперационной раны антисептиком.

Для хронических моделей интубация трахеи является наиболее предпочти-

тельным и физиологичным вариантом, однако выполнение этой манипуляции сопряжено с рядом сложностей (риск интубации пищевода, остановка сердца при раздражении вагусных рецепторов гортани) и требует значительного навыка экспериментатора (табл. 2).

Торакотомия

Доступ к сердцу обычно производится через четвертое межреберье с предварительным L-образным разрезом кожи от верхнего края тела грудины до мечевидного отростка по средней линии и далее по ходу VII ребра до средней аксиллярной линии и с разведением грудных мышц (рис. 1).

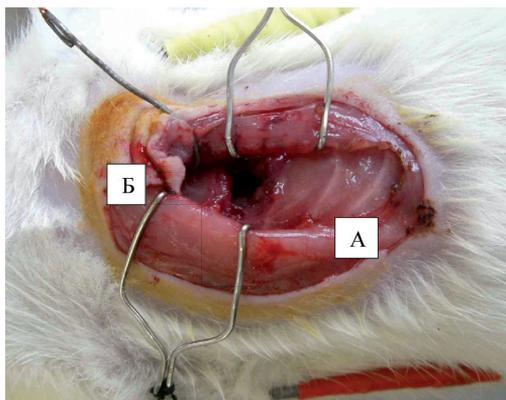


Рис. 1. Доступ к сердцу через четвертое межреберье.
А – передне-боковая поверхность сердца;
Б – ранорасширители, разводящие края раны.

Таблица 2

Сравнительная характеристика интубации трахеи и трахеостомии при проведении ИВЛ

Интубация трахеи	Трахеостомия
Преимущества	
Методика выбора для хронических экспериментов; физиологична: не повреждает целостности трахеи	Простота исполнения методики
Недостатки	
Требует высокой квалификации экспериментатора; риск осложнений во время проведения интубации (интубация пищевода, остановка сердца на фоне раздражения вагусных рецепторов гортани)	Нарушает целостность трахеи и мягкой тканой области шеи (при выполнении хронического эксперимента требуется ушивание); частые поздние осложнения (гнойно-воспалительные процессы в области ушивания трахеи и мягкой тканей, формирование свищей, послеоперационный стеноз трахеи)
	

Моделирование перманентного ишемического повреждения

После осуществления торакотомии через четвертое межреберье производилась визуализация сердца. Далее, тупым способом, с помощью браншей анатомических пинцетов удалялся перикард.

На границе свободного края ушка левого предсердия визуализировалась левая коронарная артерия (ЛКА), под которую подводилась лигатура (пролен 6/0, Ethicon, Германия), непосредственно у края ушка левого предсердия.

Размер инфаркта миокарда (ИМ) сильно зависит от уровня перевязки: при выполнении высокой перевязки ЛКА (под ушком левого предсердия (ЛП)) размер ишемии обычно значительный и отличается низкой вариабельностью, однако при этом типе наложения лигатуры имеется выраженное нарастание приоперационной и ранней послеоперационной смертности. При более низкой перевязке (на 1-2 мм ниже свободного края ушка ЛП) отмечается возрастание вариабельности и уменьшение размера

ишемии, в то же время отмечается большая выживаемость животных после операции.

В ходе эксперимента у животных рекомендуется запись электрокардиограммы в стандартных отведениях до операции (рис. 2А) и через 10 мин после наложения лигатуры на левую коронарную артерию (рис. 2Б). Наступление ишемии верифицировали визуально и по электрокардиографическим критериям: элевации сегмента ST, наступлению ишемических аритмий.

Далее производилось послойное ушивание операционной раны. Шов на коже обрабатывали спиртовым 5% раствором йода. После операции внутрибрюшинно производили инъекцию Цефтриаксона (50 мг/кг) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

Моделирование ишемически-реперфузионного повреждения

Существует целый ряд различных подходов к воспроизведению обратной окклюзии ЛКА. В данной работе

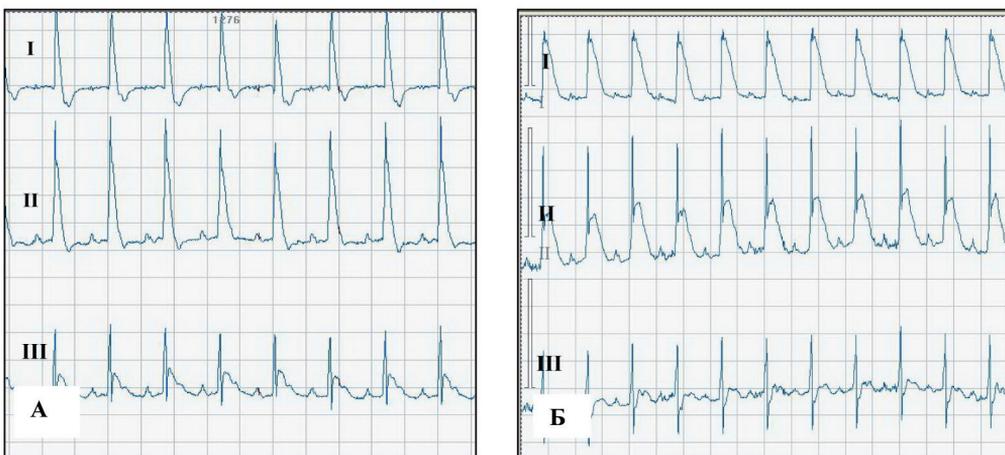


Рис. 2. Изменения на электрокардиограмме в ходе эксперимента:

А – до наложения лигатуры на ствол левой коронарной артерии;

Б – через 10 мин после наложения лигатуры на ствол левой коронарной артерии.

использовался метод, включающий несколько этапов [5]:

1) подведение лигатуры под ЛКА, отрезание иголки, если это атравматический шовный материал;

2) два свободных конца лигатуры проводились через полиэтиленовую трубку малого диаметра;

3) натяжение концов нитки с последующей их фиксацией с помощью наложения зажима на полиэтиленовую трубку;

4) при необходимости реперфузии – снятие зажима.

Для снижения риска травматизации ткани миокарда между ним и полиэтиленовой трубкой укладывается небольшой кусочек трубки, сжатый посередине.

Методы оценки морфофункциональных показателей сердца

Трансторакальная эхокардиография

Эхокардиография (ЭхоКГ) является одним из самых информативных визу-

ализирующих методов исследования состояния миокарда в эксперименте *in vivo* (рис. 3). В последние годы он активно применяется для оценки анатомических и функциональных показателей деятельности сердца у крыс. Преимуществами этой методики являются неинвазивность, высокая точность, возможность многократного проведения (наблюдения показателей в динамике), а также легкость выполнения, что позволяет обследовать большое количество животных в течение непродолжительного времени [9].

Для морфофункциональных измерений используется ряд стандартных показателей (табл. 3). В данной работе использовалась эхокардиографическая ультразвуковая установка высокого разрешения (MyLabTouchSL 3116, Esaot; Италия). Для обеспечения необходимого качества изображения использовали сосудистые линейные датчики с частотой 13 МГц, глубина сканирования составляла 2 см.

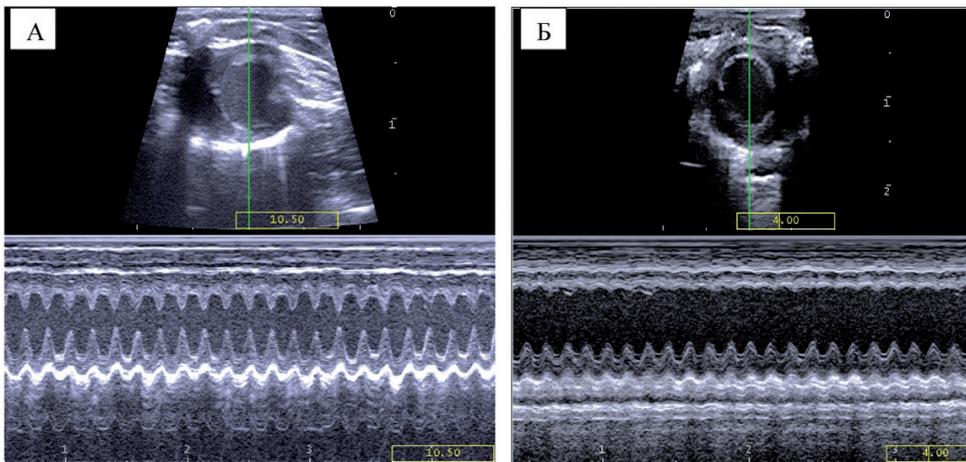


Рис. 3. Эхокардиографическое исследование, М-режим, короткая парастернальная позиция (PSAX). А – нативное сердце, Б – 3 недели после наложения лигатуры на левую коронарную артерию (акинезия передней стенки).

Основные морфофункциональные показатели, оцениваемые при трансторакальном эхокардиографическом исследовании

Аббре-виатура показателя	Показатель	Референсные значения		
		Weytjens C., et al., 2006 [6]	Radovits T., et al., 2013 [7]	Kocsis G.F., et al., 2012 [8]
LVAWd ПСЛЖд	Left Ventricle Anterior wall during diastole Толщина передней стенки ЛЖ в диастолу	1,9±0,2 мм	1,87±0,03 мм	1,87±0,07 мм
LVAWs ПСЛЖс	Left Ventricle Anterior wall during systole Толщина передней стенки ЛЖ в систолу	2,9±0,3 мм	2,89±0,16 мм	3,31±0,05 мм
LVPWd ЗСЛЖд	Left Ventricle Posterior wall during diastole Толщина задней стенки ЛЖ в диастолу	1,8±0,2 мм	1,99±0,07 мм	2,18±0,07 мм
LVPWs ЗСЛЖс	Left Ventricle Posterior wall during systole Толщина задней стенки ЛЖ в систолу	3±0,2 мм	2,97±0,05 мм	3,77±0,11 мм
LVIDd КДД	Left Ventricle Internal diameter during diastole Конечный диастолический диаметр ЛЖ	7,6±0,6 мм	9,12±0,09 мм	7,25±0,17 мм
LVIDs КСД	Left Ventricle Internal diameter during systole Конечный систолический диаметр ЛЖ	4,5±0,9 мм	4,4±0,11 мм	3,77±0,2 мм
LVvoid КДО	Left Ventricle volume during diastole Конечный диастолический объем ЛЖ	0,69±0,16 мл	-	-
LVvoids КСО	Left Ventricle volume during systole Конечный систолический объем ЛЖ	0,15±0,07 мл	-	-
SV УО	StrokeVolume Ударный объем	-	0,257±0,010 мл	0,252±0,014 мл
EF ФВ	Ejection fraction Фракция выброса	78±8%	61,2±1,8%	54,9±1,7%
SF ФУ	Fractional shortening Фракция укорочения ЛЖ, %	41±11%	39,1±2,1%	

Катетеризация левого желудочка с регистрацией давления и объема

Катетеризация камер сердца с регистрацией характеристик объема и давления, а также построением на их основе графических кривых зависимости (PV-loops) является признанным «золотым стандартом» прижизненной инвазивной оценки морфофункциональных показателей сердца.

В современных экспериментальных моделях на мелких животных используется два основных подхода к выполнению данной методики для оценки функции ЛЖ:

1. Каротидный доступ (эндоваскулярная катетеризация ЛЖ через правую сонную артерию). В этом случае катетер проводится ретроградно относительно тока крови, проникая в сердце через аортальный клапан.

2. Апикальный доступ, путем пункции верхушки сердца.

Каждый из указанных подходов имеет ряд преимуществ и недостатков (табл. 4).

Для исследования действия фармакологических агентов и выполнения хронического эксперимента катетеризация через правую сонную артерию является менее инвазивной, при этом состояние животных во время длительного эксперимента остается более стабильным. Каротидный доступ позволяет также катетеризировать сердце в моделях сердечной недостаточности, произведенной с помощью перевязки передней ветви ЛКА, т.к. при этой операции на верхушке сердца образуется рубец, что препятствует катетеризации сердца через верхушечный прокол.

Основные показатели, оцениваемые с помощью катетеризации ЛЖ

Благодаря прямой регистрации зависимости «давление-объем» внутри ЛЖ

Таблица 4

Сравнительная характеристика различных подходов к выполнению методики катетеризации ЛЖ

Каротидный доступ	Апикальный доступ
Преимущества	
Более стабильный; малотравматичный (не требует вскрытия грудной клетки), в связи с этим является методом выбора для хронических экспериментальных моделей	Легкость выполнения; возможность проведения даже в случае тяжелого атеросклероза каротидных артерий и аортального клапана, выраженной гипертрофии ЛЖ, крайней степени артериальной гипертензии
Недостатки	
Сложный в исполнении (риск кровотечения, требуется высокая квалификация экспериментатора)	Менее стабильный; большая потеря жидкости; требуется вскрытие грудной клетки; сложность выполнения в случае перехода рубца на область верхушки ЛЖ

возможно получение целого ряда показателей, как измеряемых напрямую, так и математически рассчитанных (табл. 5, рис. 4).

Таблица 5

Основные морфофункциональные показатели, оцениваемые при катетеризации ЛЖ с регистрацией зависимости «давление-объем»

Аббревиатура показателя	Полное название показателя	Примечания и формулы расчета	Диапазон референсных значений		
			Zakharova L., et al., 2010 [9]	Fomovsky G., et al., 2010 [10]	Khong F.L., et al., 2011 [11]
ESV КСО	End-systolic volume Конечный систолический объем	Параметр, регистрируемый напрямую	0,069±0,03 (мл)	0,24±0,12 (мл)	-
EDV КДО	End-diastolic volume Конечный диастолический объем	Параметр, регистрируемый напрямую	0,157±0,029 (мл)	0,48±0,16 (мл)	0,21±0,017 (мл)
ESP КСД	End-systolic pressure Конечное систолическое давление	Параметр, регистрируемый напрямую	122±7 (мм рт.ст.)	84,6±15 (мм рт.ст.)	-
EDP КДД	End-diastolic pressure Конечное диастолическое давление	Параметр, регистрируемый напрямую	6±0,3 (мм рт.ст.)	5,1±0,7 (мм рт.ст.)	4,62±0,51 (мм рт.ст.)
SV УО	Stroke Volume Ударный объем	SV=EDV-ESV	0,109±0,028 (мл)	-	-
CO СВ	Cardiac Output Сердечный выброс	CO=SV*HR	26±6 (мл/мин)	70±19 (мл/мин)	-
EF ФВ	Ejection Fraction Фракция выброса	EF=SV/EDV	66±10 (%)	52±11 (%)	-
dP/dtmax	Максимальная скорость изменения давления в желудочке	Показатель миокардиальной сократимости. Зависит от пред- и постнагрузки, ЧСС и ГЛЖ	6524±388 (мм рт.ст./с)	-	-
ESPVR ОКСД/О	End-systolic pressure-volume relationship Соотношение конечного систолического давления и объема	Наиболее надежный показатель миокардиальной сократимости, т.к. не зависит от пред- и постнагрузки, ЧСС	-	V0=0,04±0,11 (мл) Emax=675±385 (см вод.ст./мл)	-
EDPVR ОКДД/О	End-diastolic pressure-volume relationship Соотношение конечного диастолического давления и объема	Описывает кривую заполнения ЛЖ. Угол наклона кривой EDPVR в любой точке графика обратно пропорционален диастолической эластичности	-	-	0,026±0,004 Наклон – мм рт.ст./мл

Примечание: данные авторов приведены к стандартным значениям.

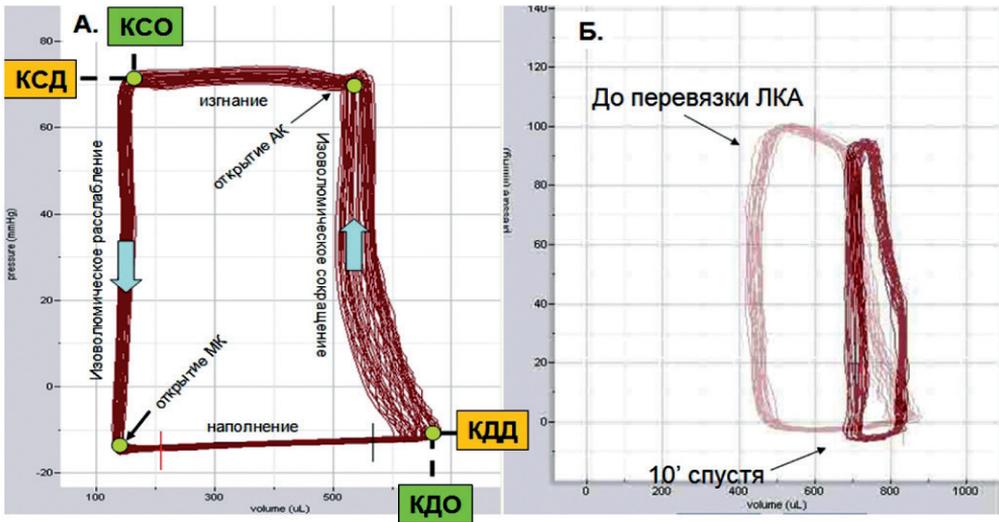


Рис. 4. Графическое изображение зависимости «давление-объем» во время катетеризации ЛЖ (PV-loops). А – принципиальная схема петли «давление – объем», где: АК – аортальный клапан, МК – митральный клапан; Б – сравнение PV-loop интактного сердца и спустя 10 мин после перевязки ЛКА; КСО – конечный систолический объем, КДО – конечный диастолический объем, КСД – конечное систолическое давление, КДД – конечное диастолическое давление.

Протокол проведения

Для инвазивной регистрации показателей давления и объема внутри ЛЖ и построения PV-петли был использован программно-аппаратный комплекс Advantage PV system (Science, США), состоящий из блока управления, аналого-цифрового преобразователя, PV-катетера и программного обеспечения для персонального компьютера. Крысы наркотизировались с помощью однократного внутрибрюшинного введения Хлоралгидрата (Acros Organics, США) в дозе 450 мг/кг.

▪ Каротидный доступ

В области шеи выполнялся разрез по средней линии. Паратрахеальные мышцы и грудиноключичнососцевидная мышца справа разводились тупым способом. Выделялась общая сонная артерия. На дистальный конец выделен-

ного отрезка артерии накладывалась лигатура. С помощью пункции сосудистой стенки катетер заводился в просвет сосуда и проводился ретроградно по ходу сосуда (рис. 5). Прохождение катетером аортального клапана характеризовалось изменением кривой давления и снижением диастолического давления до нулевых значений.

После регистрации гемодинамических показателей ЛЖ на сосуд ниже места пункции накладывалась лигатура. Производилось ушивание кожи. В качестве шовного материала использовался викрил 4-0 (Ethicon, Германия). Шов на коже обрабатывался настойкой йода (5%). После операции внутрибрюшинно производилась инъекция Цефтриаксона (50 мг/кг) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

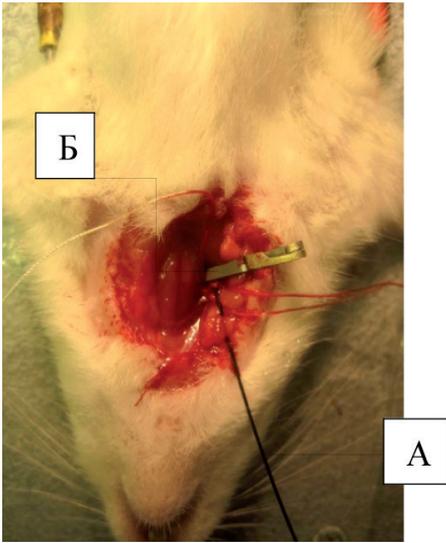


Рис. 5. Заведенный в просвет правой сонной артерии PV-катетер. А – PV-катетер; Б – зажим, наложенный на сосуд.

▪ Апикальный доступ

После наркотизации лабораторного животного (по схеме, описанной выше) производился разрез кожи и мышц передней брюшной стенки непосредственно ниже мечевидного отростка грудины, начиная от средней линии до левой средней подмышечной линии. Далее разрез продлялся на грудную клетку с пересечением 2-3-х нижних ребер и рассечением диафрагмы, тем самым обеспечивая доступ к верхушке сердца. Перикард рассекался тупым способом.

Для заведения PV-катетера в полость ЛЖ выполнялось пункционное отверстие с помощью инъекционной иглы 21G, с последующим быстрым проведением катетера через образовавшейся канал в ткани миокарда.

Если постинфарктный рубец распространяется на верхушку сердца, пункция ЛЖ должна проводиться пре-

дельно внимательно, т.к. в этом случае неизбежно кровотечение из неспадающего отверстия. Для остановки остаточного кровотечения после заведения катетера целесообразно использовать гемостатический материал, для этих целей в данной работе использовалась гемостатическая коллагеновая губка (Белкозин, Россия).

Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

При отсутствии возможности выполнения ЭхоКГ и катетеризации ЛЖ в качестве метода оценки функциональных показателей сердца может рассматриваться методика изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу.

Протокол проведения

Через 21 день после моделирования ишемически-реперфузионного повреждения (40 мин ишемии) животных наркотизировали с помощью Хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Грудная клетка вскрывалась широким чрездиафрагмальным билатеральным доступом, быстро вырезалось сердце и помещалось в ледяной (2-4°C) раствор Кребса-Хенселейта с гепарином, содержащий (в mM): глюкозы – 11; NaCl – 118; KCl – 4,7; CaCl₂ – 3,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 25.

После остановки сердца его присоединяли к аппарату Лангендорфа и осуществляли ретроградную перфузию через канюлю, введенную в аорту, раствором Кребса-Хенселейта под постоянным давлением гидростатического столба 80 мм рт. ст. Температуру перфузионного раствора, насыщенного газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂, поддерживали равной 37±0,5°C, pH раствора – 7,4. После завершения подготовки

препарата изолированного сердца его помещали в термостатическую камеру. Тотальная ишемия воспроизводилась путем временной остановки поступления перфузата к сердцу. Длительность тотальной ишемии в эксперименте составила 30 мин, последующая реперфузия – 120 мин. В ходе эксперимента регистрировали исходные функциональные показатели изолированного сердца, а именно: систолическое, конечно-диастолическое и пульсовое давление в левом желудочке (ЛЖ), частоту сердечных сокращений и коронарный поток. Для выявления снижения функционального резерва миокарда после ишемического/ишемически-реперфузионного повреждения рекомендуется использовать эпизод глобальной ишемии. В ходе периода глобальной ишемии осуществляли мониторинг среднего давления в ЛЖ, что позволило оценивать амплитуду и скорость наступления ишемической контрактуры. Регистрация гемодинамических показателей проводилась с помощью программного обеспечения PhysExp [2].

Гистологическое исследование

После прижизненной оценки морфофункциональных показателей сердца животных подвергали эвтаназии и забирали сердце для последующего гистологического анализа. Сердца фиксировались в 10% забуференном формалине. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином (рис. 6А, Б). Для более детального исследования соединительнотканного рубца ЛЖ использовалась окраска SiriusRed (рис. 6В). Препараты изучали с помощью микроскопа Axiostarplus (CarlZeiss, Германия) при увеличении от 5 до 40. Проводился морфометрический анализ площади рубцовой ткани. Результаты микроскопии оценивали с помощью программного обеспечения «ВидеоТест-Морфология» (ВидеоТест, СПб).

Обработка полученных данных

Статистическую достоверность различий функциональных и морфологических данных между группами оценивали с использованием программного пакета Statistica (критерий Манна-Уитни). Значения $p < 0,05$ рассматривали в качестве достоверных.

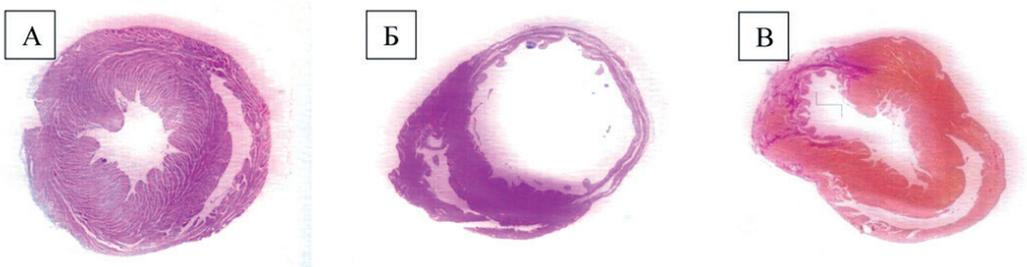


Рис. 6. Поперечный срез сердца. А – контрольная группа, без перевязки ЛКА (окраска гематоксилин-эозин); Б – сердце спустя 3 недели после перевязки ЛКА (окраска гематоксилин-эозин), выявляются трансмуральные рубцовые изменения передней, задней и боковой стенок ЛЖ, а также выраженная дилатация его камеры; В – сердце спустя 3 недели после перевязки ЛКА (окраска SiriusRed). Стрелкой показан рубец в области боковой стенки ЛЖ.

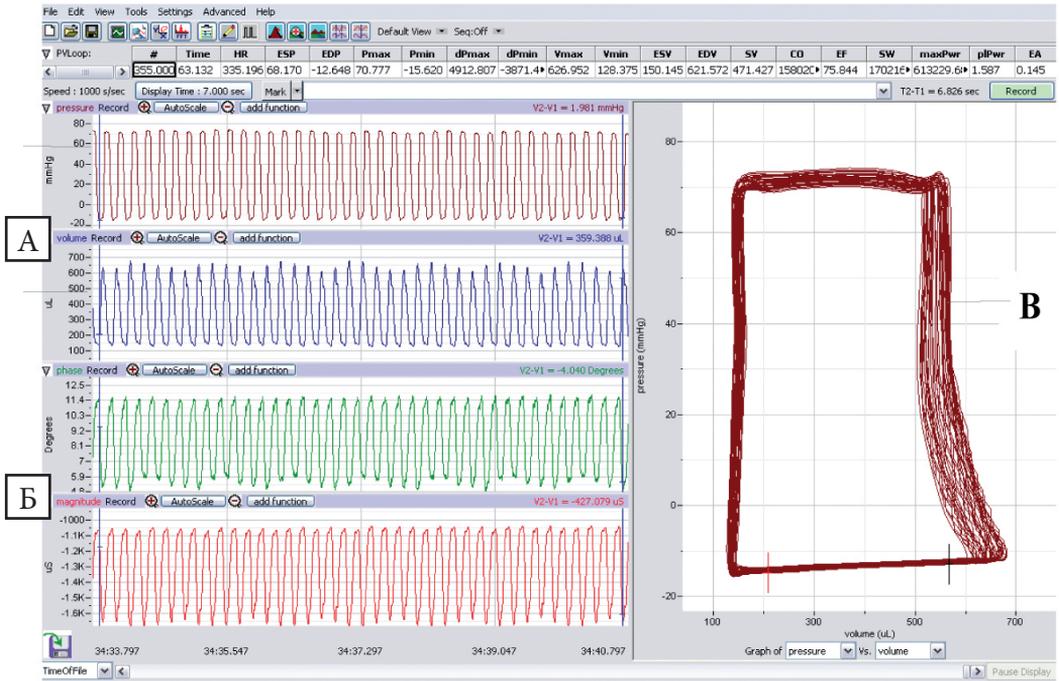


Рис. 7. Внутрисердечные показатели здорового животного. PV-катетер установлен в полость левого желудочка. Регистрация проводится с помощью программного обеспечения LabScribe 2.2. А – регистрация изменения давления в левом желудочке; Б – регистрация изменения объема в левом желудочке; В – PV-петля.

Полученные данные также обрабатывались с помощью программного обеспечения LabScribe 2.2 (Informer Technologies, Inc., США) (рис. 7).

Результаты и их обсуждение

Трансторакальная эхокардиография

Результаты проведенных измерений отражены в табл. 6. Ряд дополнительных показателей, измерения которых не производилось в данном исследовании, представлен ранее в табл. 3.

Отмечались достоверные различия как морфологических показателей ремоделирования сердца (КДР, КСР), так и ФВ между группой контрольных животных и группой ПИ ХСН (рис. 8).

Таблица 6

Морфофункциональные показатели здорового сердца крысы и через 3 недели после моделирования ПИ ХСН по данным ЭхоКГ

Показатели	Контроль	ПИ ХСН
ПСЛЖД (мм)	1,8±0,12	1,6±0,35
ПСЛЖс (мм)	3,2±0,09	Акинезия
ЗСЛЖД (мм)	1,8±0,11	2,4±0,23
ЗСЛЖс (мм)	3,0±0,18	3,2±0,34
КДР (мм)	4,9±0,13	7,8±0,81*
КСР (мм)	1,2±0,06	6,2±1,1*
УО (мл)	0,46±0,051	0,32±0,168
ФВ (%)	71,3±5,21	20,2±6,32*

Примечание: * – достоверное отличие от группы контроля (p< 0,05).

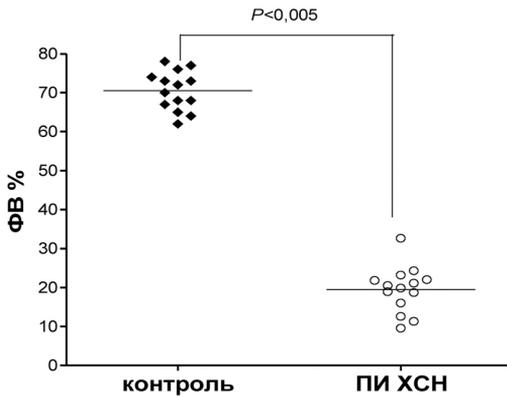


Рис. 8. Значения фракции выброса в группах контроля и ПИ ХСН.

Катетеризация левого желудочка с регистрацией давления и объема

В качестве иллюстрации приводим данные наших экспериментов по оценке морфофункциональных показателей сердца после моделирования ПИ ХСН.

Для моделирования ПИ ХСН крысам-самцам линии Wistar массой 200-240 г (7 особей) была произведена перманентная перевязка ветви ЛКА. Через 21 день после моделирования ишемического повреждения выполнялась катетеризация ЛЖ с регистрацией давления и объема с помощью каротидного доступа. Строилась графическая кривая зависимости «давление-объем» левого желудочка, а также определялся ряд показателей функции сердца. В качестве контроля использовались ложнооперированные крысы линии Wistar той же массы.

Полученные результаты отражены в табл. 7. Ряд дополнительных показателей, измерения которых не производилось в данном исследовании, представлено ранее в табл. 5.

Из табл. 7 видны значимое снижение ФВ ($p < 0,05$) в группе ПИ ХСН, а также увеличение КДО ($p < 0,05$) и КСО ($p < 0,05$), что указывает на выраженное ремоделирование в постинфарктном периоде. Значимых различий в уровне УО и СВ выявлено не было.

Таблица 7

Морфофункциональные показатели здорового сердца крысы и через 3 недели после моделирования ПИ ХСН по данным катетеризации ЛЖ с регистрацией давления и объема

Показатель	Контроль	ПИ ХСН
Масса животного (г)	200-250	200-250
ЧСС (уд. в мин)	298±49,0	285±75,1
КСД (мм рт. ст.)	112±30,6	67±15,2
КДД (мм рт. ст.)	1±7,1	11±2,7
КСО (мкл)	121±25,3	326±76,2*
КДО (мкл)	443±36,2	576±51,3*
УО (мкл)	332±108,3	250±119,1
СВ (мл/мин)	92±45,2	70±44,8
ФВ (%)	69±11,3	42±10,6*

Примечание: * – достоверное отличие от группы контроля ($p < 0,05$).

Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

Несмотря на имеющееся ишемически-реперфузионное повреждение миокарда, исходное систолическое и пульсовое давление в ЛЖ в опытной и контрольной группах достоверно не отличались. На 20-й мин тотальной ишемии давление в ЛЖ в экспериментальных группах составило: контрольный инфаркт – 54±23 мм рт. ст., ложнооперированные животные – 82±10 мм рт. ст.; на 30-й мин: контрольный инфаркт

Таблица 8

Уровень маркёров повреждения миокарда в острой стадии ишемического повреждения в плазме и ткани сердца

– 53 ± 22 мм рт. ст., ложноперированные животные – 73 ± 12 мм рт. ст. (рис. 9). Эти данные косвенно свидетельствуют о степени сохранности миокарда, т.к. степень ишемической контрактуры коррелирует с данным показателем.

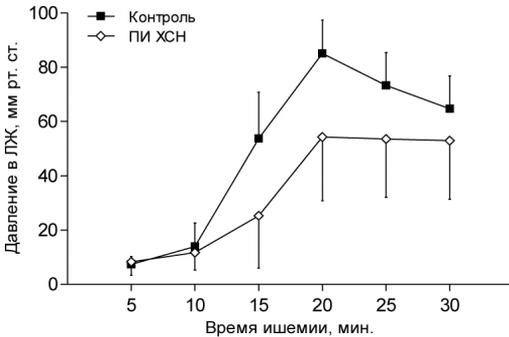


Рис. 9. Изменение ишемической контрактуры во время глобальной ишемии при перфузии изолированного сердца по Лангендорфу.

Гистологическое исследование

Размер рубца в группе ишемически-реперфузионного повреждения (20 животных) через 3 недели после перевязки ЛКА составил $37 \pm 3\%$. В контрольной группе (15 животных), где производилась ложная операция с рассечением перикарда, но без перевязки ЛКА, рубцовых изменений выявлено не было.

Оценка биохимических показателей

Для оценки биохимических изменений вследствие ишемического повреждения миокарда производили забор ткани сердца и плазмы крови спустя сутки после перевязки ЛКА. Биохимические показатели, определенные по стандартным методикам [3, 1], приведены в табл. 8.

Показатель	Интактный контроль	Группа инфаркта
Миокард		
Креатинфосфат, ммоль/г	$7,72 \pm 0,50$	$4,67 \pm 0,58^*$
АТФ, ммоль/г	$4,31 \pm 0,10$	$2,49 \pm 0,09^*$
АДФ, ммоль/г	$0,84 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,02$
АМФ, ммоль/г	$0,39 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,03^*$
Лактат, ммоль/г	$3,86 \pm 0,07$	$4,99 \pm 0,25^*$
Пируват, ммоль/г	$0,27 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,09^*$
Каталаза, ЕД/мг белка	$0,083 \pm 0,008$	$0,028 \pm 0,008^*$
Глутатион, ммоль/г белка	$38,18 \pm 0,32$	$23,19 \pm 1,09^*$
Малоновый диальдегид, ммоль/г	$17,47 \pm 3,10$	$35,75 \pm 5,80^*$
Плазма		
Глюкоза, ммоль/л	$8,61 \pm 0,41$	$8,15 \pm 0,39$
Холестерин, ммоль/л	$2,19 \pm 0,10$	$2,59 \pm 0,12$
Мочевина, ммоль/л	$8,09 \pm 0,39$	$4,48 \pm 0,21^*$
Креатинин, ммоль/л	$46,10 \pm 2,20$	$53,30 \pm 2,50$
Общий билирубин, ммоль/л	$7,51 \pm 0,36$	$9,11 \pm 0,43$
Общий белок, г/л	$66,00 \pm 3,10$	$65,30 \pm 3,10$
АЛТ, нмоль/л	$49,10 \pm 2,40$	$150,50 \pm 8,90^*$
АСТ, нмоль/л	$149,9 \pm 9,10$	$448,40 \pm 21,80^*$
КФК, нмоль/л	7296 ± 597	$18789 \pm 1616^*$
Щелочная фосфатаза, нмоль/л	$316,0 \pm 16,30$	$314,60 \pm 15,50$

Примечание: * – достоверное отличие от группы контроля ($p < 0,05$).

Заключение

Проблемы ишемического повреждения миокарда не теряют своей актуальности, как не теряет своей актуальности необходимость исследования самого процесса этого повреждения и путей воздействия на него. В доклинических исследованиях моделирование ишемического повреждения с помощью наложения лигатуры на ЛКА остается неотъемлемой частью исследования этого процесса. Благодаря высокой точности воспроизведения и хорошим результатам выживаемости данная модель стала «золотым стандартом» данного направления. Более того, учитывая современные тенденции в подходах к лечению острого коронарного синдрома в клинической практике (активное внедрение методик ревазуляризации (тромболизис, коронаропластика) в ранние сроки ишемии), все большую популярность приобретает модель ишемически-реперфузионного повреждения миокарда. Данный факт позволил адаптировать экспериментальные технологии к современным тенденциям развития клинической медицины.

Представленные в этой работе инструментальные методы исследования позволяют с высокой точностью регистрировать ишемическое повреждение, наблюдая в дальнейшем в динамике процессы формирования рубца и ремоделирования миокарда.

Глубокое понимание особенностей и преимуществ каждой из представленных методик позволит экспериментатору достичь желаемых результатов и в полной мере раскрыть возможности модели ишемического или ишемического-реперфузионного повреждения миокарда у крыс в хроническом эксперименте.

Список литературы

1. *Кашина Е.А.* Изыскание фармакологических препаратов, улучшающих энергетический обмен и активирующих восстановительные процессы в миокарде. Автореф. дис... канд. мед. наук. - СПб. 1994. 22 с.
2. *Королев Д.В., Александров И.В., Галагузда М.М. и др.* Автоматизация получения и обработки данных физиологического эксперимента // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008. Т. 7. № 2(26). С. 79-84.
3. *Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П.* Лабораторные методы исследования в клинике. - М.: Медицина. 1987. 368 с.
4. *Fomovsky G.M., Holmes J.W.* Evolution of scar structure, mechanics, and ventricular function after myocardial infarction in the rat // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2010. Vol. 298. № 1. P. 221-8.
5. *Karpov A.A., Uspenskaya Y.K., Minasian S.M., et al.* The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodelling in the rat model of ischaemic heart failure // Int. J. Exp. Pathol. 2013. Vol. 94. № 3. P. 169-77.
6. *Khong F.L., Zhang Y., Edgley A.J., et al.* 3',4'-Dihydroxyflavonol antioxidant attenuates diastolic dysfunction and cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic m(Ren2)27 rats // PLoS One. 2011. Vol. 6. № 7.
7. *Kocsis G.F., Sárközy M., Bencsik P., et al.* Preconditioning protects the heart in a prolonged uremic condition // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2012. Vol. 303. № 10. P. 1229-36.
8. *Radovits T., Oláh A., Lux Á., et al.* Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2013. Vol. 305. № 1. P. 124-34.
9. *Ribeiro H.B., Okoshi K., Cicogna A.C., et al.* Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supra-valvular aortic stenosis // Arq. Bras. Cardiol. 2003. Vol. 81. № 6. P. 569-75.
10. *Weytjens C., Cosyns B., D'hooge J., et al.* Doppler myocardial imaging in adult male rats: reference values and reproducibility of velocity and deformation parameters // Eur. J. Echocardiogr. 2006. Vol. 7. № 6. P. 411-7.

11. *Zakharova L., Mastroeni D., Mutlu N., et al.* Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function // *Cardiovasc. Res.* 2010. Vol. 87. № 1. P. 40-9.
12. *Zornoff L.A., Paiva S.A., Minicucci M.F., et al.* Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model // *Arq. Bras. Cardiol.* 2009. Vol. 93. № 4. P. 434-40.

Rat model of post-infarct heart failure by left coronary artery occlusion: technical aspects, functional and morphological assessment

A.A. Karpov, D.Yu. Ivkin, A.V. Dracheva, N.N. Pitukhina, Yu.K. Uspenskaya, D.D. Vaulina, I.S. Uskov, Sh.D. Eyvazova, S.M. Minasyan, T.D. Vlasov, A.V. Buryakina, M.M. Galagudza

This article describes the main methodological issues related to modeling of post-infarct heart failure by permanent and temporary occlusion of the left coronary artery, and also the most effective morphological and functional approaches to the assessment of post-infarct myocardial changes.

Key words: chronic heart failure, myocardial infarction, ischemia-reperfusion injury, echocardiography, PV-loops, perfusion of the isolated heart.

Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C_{60}

Л.А. Шарафутдинова¹, Е.Н. Горшкова², И.И. Садртдинова¹,
З.Р. Хисматуллина¹, С.А. Башкатов¹

¹ – ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа

² – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

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

В работе представлены результаты исследования влияния фуллерена C_{60} на морфологические параметры нейтрофилов с целью выявления его возможной токсичности. Проведена оценка морфометрических параметров нейтрофилов крови методом атомно-силовой микроскопии. Установлено, что диаметр тела и ядра клеток после воздействия фуллерена C_{60} существенно изменяется.

Ключевые слова: нейтрофилы, биосовместимость, фуллерены, атомно-силовая микроскопия.

Введение

В настоящее время одним из приоритетных направлений научно-технического прогресса является изучение и применение наноразмерных объектов. Исследования материалов на наноразмерном уровне и их использование ведутся несколько десятилетий, однако традиционно считают началом зарождения эпохи нанотехнологий открытие углеродных материалов, построенных исключительно из атомов углерода. Главная особенность этих молекул – это их каркасная форма. Среди множества структурных разновидностей углеродных наноматериалов наибольший интерес представляют фуллерены. Впервые фуллерены были открыты в 1985 г. Х. Крото, Дж. Хит, О'Брайен и Р. Смолли [8, 11], а в 1992 г. их обнаружили в

древних пластах земной коры, шунгите, а позже и в метеоритном веществе. Открытие фуллеренов удостоено Нобелевской премии по химии за 1996 г. и стало одним из ярких научных достижений конца XX века.

Наиболее полно изученный представитель семейства фуллеренов – фуллерен C_{60} . Его иногда называют «бакминстер-фуллерен», в котором 60 атомов углерода образуют многогранник из 12 пятиугольников и 20 шестиугольников, что придает такому фуллерену полное сходство с крышкой футбольного мяча, размер такой молекулы – приблизительно 10 \AA . Фуллерены считаются идеальным наноконтейнером, обладающим исключительной избирательностью и высокой биодоступностью. Практически сразу фуллерены привле-

кли внимание многих исследователей, в том числе благодаря возможности их использования в биологии и медицине.

Однако в последнее время в литературе широко обсуждается вопрос о токсичности фуллеренов. Начиная с самых ранних работ [8, 11], в которых были получены данные о низкой острой токсичности фуллеренов, остался открытым вопрос о выраженности их токсичности при длительном применении. Так, были получены данные о его неблагоприятном влиянии на эмбриогенез у мышей [10], а также о его мутагенном действии на дрожжи [9] и дрозофилу [12]. Еще более остро этот вопрос встал в связи с потенциальным широкомасштабным производством фуллеренов и их широким использованием, а также высокой вероятностью загрязнения ими окружающей среды [7]. В связи с этим, начиная с 2005 г., изучению возможной токсичности фуллеренов уделяется все большее внимание.

На значимость проблемы токсичности наноматериалов указывает то, что в России 31 октября 2007 г. была утверждена «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов», разработанная Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека совместно с ведущими научными центрами и НИИ РАМН, Минобрнауки РФ и Роспотребнадзора. Исследования влияния наноматериалов на организм человека, деградации наночастиц при взаимодействии с биологическим материалом, их влиянии на метаболические процессы в живых организмах и разработка методов, позволяющих получать

эту информацию, являются в настоящее время весьма важными и актуальными задачами.

Изучение влияния наночастиц на клетки крови как важного гомеостатического фактора и показателя функционального состояния организма в целом представляется нам весьма актуальной задачей. В связи с этим, изучено влияние фуллерена C_{60} на морфометрические показатели нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с использованием сканирующей зондовой микроскопии. Как объект исследования биосовместимости наночастиц фуллерена нейтрофилы нами взяты ввиду того, что любой вариант введения наноматериалов при использовании *in vivo* предполагает контакт с клетками неспецифической и специфической защиты. НГ периферической крови человека – наиболее чувствительные и мобильные элементы системы неспецифической резистентности организма. Это клетки, характеризующиеся высокой морфологической пластичностью, которые, выполняя свои физиологические функции, подвергаются значительным внешним перестройкам. НГ являются клетками с богатым деструктивным потенциалом, запускают процесс биодеструкции вновь поглощенных частиц, с одной стороны, и, с другой стороны, частицы сами могут оказывать негативное воздействие на различные звенья цитотоксического комплекса нейтрофилов [2].

В настоящее время изменение морфологических параметров клеток крови человека часто соотносят с физиологическими свойствами, что наряду с функциональной характеристикой дает полноценную информацию об их участии в поддержании гомеостаза [1, 2, 5].

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели была проведена пробоподготовка нейтрофильных гранулоцитов. Выделение НГ проводили по методу И.С. Подосинникова и соавт. (1981) из венозной крови условно здоровых доноров студентов-добровольцев (n=10). Выделяли нейтрофилы по стандартной методике в градиенте плотности фиколл-урографина.

Поскольку фуллерены нерастворимы в воде, готовили суспензию фуллерена C₆₀, для чего к нанопорошку добавляли физиологический раствор. Конечная концентрация фуллерена C₆₀ составила 0,75 мг/мл. Полученную суспензию тщательно перемешивали с использованием Vortex-3 и подвергали диспергированию в ультразвуковой ванне. Для определения размеров наночастиц, находящихся в исследуемой суспензии фуллерена C₆₀, использовали лазерный анализатор размеров частиц SALD-7101 (Shimadzu): спектральное разрешение 1 нм, диапазон от 10 нм до 300 мкм, метод – лазерная дифракция (УФ-лазер, длина волны излучения 375 нм). Показано, что в полученной суспензии присутствовали наночастицы фуллерена C₆₀ от 10 до 40 нм.

На базе лаборатории Научно-образовательного центра «Физика твердотельных наноструктур» Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского была создана сертифицированная методика измерений фиксированных нейтрофилов, в основе которой лежит их фиксация глутаровым альдегидом с последующими исследованием на атомно-силовом микроскопе (АСМ) [3]. Методика включает контактный режим измерения как наиболее точно передающий топографические и размерные характеристики фиксированного биоло-

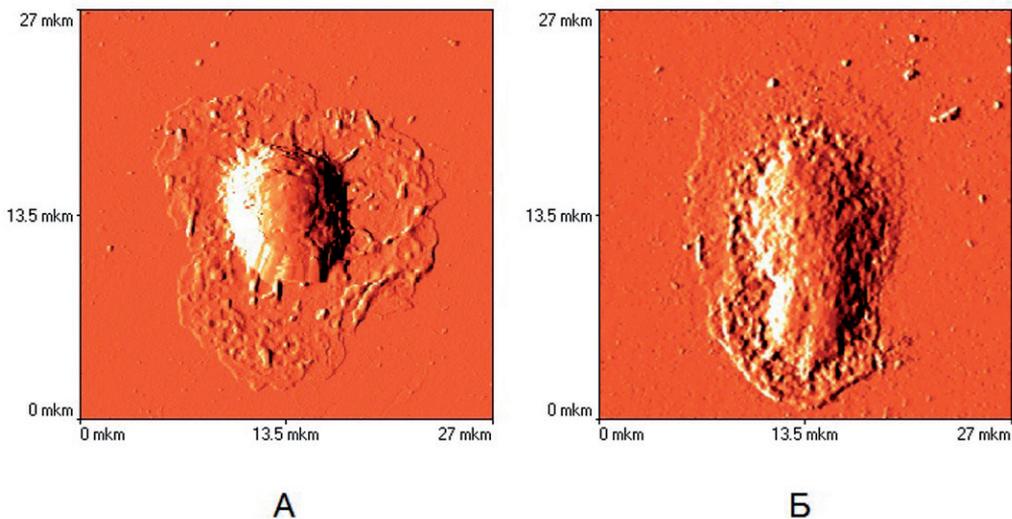
гического объекта. На АСМ-изображении четко визуализируются ядро и гранулы, причем существует возможность определения латеральных размеров нейтрофилов и их высоты. Нейтрофильные гранулоциты (2·10⁶ клеток/мл) инкубировали с фуллереном C₆₀ (0,75 мг/мл) в течение 30 мин при 37°C. Далее осуществляли фиксацию нейтрофилов 1,5% глутеральдегидом на предметном стекле.

В серии экспериментов изучали нейтрофилы, полученные из крови здоровых доноров, и сравнивали морфометрические показатели до и после воздействия фуллерена C₆₀. Сканирование образцов для измерения геометрических параметров нейтрофилов производили с помощью АСМ. Исследования проводились на установке SOLVER BIO™ (NT-MDT, г. Зеленоград).

Для исследования морфологических изменений НГ в системе с фуллеренами C₆₀ проводили сканирование топографии НГ в полуконтактном режиме с использованием зондов DNP (Veeco, USA) [3]. Для визуализации сканируемых объектов применялась программа Nova NT-MDT SPM Software (NT-MDT, г. Зеленоград). Дальнейшая обработка изображений проводилась с использованием программного обеспечения SPMLab Analysis Only (Topometrix, США). В программном пакете прикладных программ Statistica (v.6.0) проведен статистический анализ полученных результатов измерений.

Результаты и их обсуждение

На рисунке представлены результаты сканирования нейтрофилов. В контрольных образцах (рис. А) нейтрофил имеет ядро округлой формы, ядерная

Рис. Нейтрофилы до (А) и после (Б) инкубирования с фуллереном C_{60} .

мембрана практически ровная, с незначительными выбуханиями. Цитоплазма занимает большой объем и имеет трехлопастную форму.

В таблице представлены замеры высоты нейтрофилов и поперечных размеров (диаметр) клеток.

Таблица
Морфометрические параметры нейтрофильных гранулоцитов, полученные методом сканирующей зондовой микроскопии, до и после воздействия фуллерена C_{60}

Параметры	Контроль	Опыт
Диаметр тела, мкм	$18,2 \pm 0,72$	$15,16 \pm 0,47^*$
Высота ядра, мкм	$4,34 \pm 0,61$	$5,98 \pm 0,71$
Диаметр ядра, мкм	$4,85 \pm 0,69$	$5,85 \pm 0,85^*$

Примечание: * – различия достоверны при $p < 0,01$.

Как следует из данных табл. и заметно на рис. Б, после воздействия фуллерена C_{60} морфология нейтрофила изменяется: ядро приобретает овально-вытянутую форму, что отражается на его размере. Так, если до воздействия диаметр ядра составлял $4,85 \pm 0,69$ мкм, то после инкубации с фуллереном C_{60} этот показатель достоверно увеличивается и составляет $5,85 \pm 0,85$ мкм. Ядерная мембрана приобретает пористый, разрыхленный вид. Объем цитоплазмы уменьшается, в некоторых областях имеет опустошенный вид, что может свидетельствовать о гибели органелл. Следует отметить, что при сравнении на АСМ-изображении контрольного образца определяется нежная зернистость, тогда как в опытном образце в цитоплазме видны грубые гранулы, что можно определить как патологическую зернистость. Также отмечается истончение мембраны на периферии клетки.

На сегодняшний день общепринято, что изменение формы клеточного ядра

является существенным диагностическим признаком: деформация ядер цитоплазматическими включениями при дистрофических процессах, полиморфизм ядер при воспалении (гранулематоз) и опухолевом росте (клеточный атипизм) свидетельствует о дифункциональных изменениях клетках крови в ответ на токсическое воздействие.

Выводы

Таким образом, сравнение морфометрических показателей нейтрофильных гранулоцитов показало, что воздействие фуллерена C₆₀ приводит к значительному снижению диаметра тела клетки и увеличению диаметра ядра ($p < 0.01$). Наблюдаемый нами сдвиг морфометрических параметров нейтрофилов является маркером изменения их функциональной активности и может свидетельствовать о потенциальной цитотоксичности фуллерена C₆₀.

Список литературы

1. Гуцина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. № 1. С. 48-53.
2. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф. 1993. 192 с.
3. Плескова С.Н. Атомносиловая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Уч. пособие. Интеллект-групп. 2011. 184 с.
4. Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., Михеева Э.Р., Шушунов А.Н. Исследование биосовместимости нанопорошка с флюоресцирующим центром Er/Yb в системе с нейтрофильными гранулоцитами // Цитология. 2011. Т. 53. № 5. С. 444-449.
5. Сапрыкин В.П. Морфологические варианты нейтрофильных гранулоцитов крови практически здоровых людей // Морфология. 2001. Т. 120. № 6. С. 37-41.
6. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C. C60: Buckminsterfullerene // Nature. 1985. Т. 318. P. 62-63.
7. Kulkarni P.P., Jafvert C.T. Solubility of C60 in solvent mixtures // Environ. Sci. Technol. 2008. Т. 42. P. 845-851.
8. Nelson M.A., Domann F.E., Bowden G.T., Hooser S.B., Fernando Q., Carter D.E. Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin // Toxicol. Ind. Health. 1993. Т. 9. P. 623-630.
9. Sera N., Tokiwa H., Miyata N. Mutagenicity of the fullerene C60-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides // Carcinogenesis. 1996. Т. 17. P. 2163-2169.
10. Tsuchiya T., Oguri I., Yamakoshi Y.N., Miyata N. Novel harmful effects of fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo // FEBS Lett. 1996. Т. 393. P. 139-145.
11. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: 14C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // Chem. Biol. 1995. Т. 2. P. 385-389.
12. Zakharenko L.P., Zakharov I.K., Vasiunina E.A., Karamysheva T.V., Danilenko A.M., Nikiforov A.A. Determination of the genotoxicity of fullerene C60 and fullerol using the method of somatic mosaics on cells of *Drosophila melanogaster* wing and SOS-chromotest // Genetika. 1997. Т. 33. P. 405-409.

Neutrophiles morphological parameters estimation by nuclear and power microscopy after fullerene C₆₀ influence

L.A. Sharafutdinova, E.N. Gorshkova, I.I. Sadrtidinova, Z.R. Khismatullina

Fullerene C₆₀ possible toxicity upon morphological parameters of human neutrophiles influence was investigated. Blood neutrophiles morphological parameters by nuclear and power microscopy were estimated. It was disappeared that cell soma and nuclei diameters after fullerene C₆₀ exposure were changed significantly.

Key words: neutrophils, biocompatibility, fullerenes, atomic force microscopy.



Физические методы модуляции (инициации) переходных процессов между устойчивыми функциональными состояниями нервной системы

Н.Н. Каркищенко¹, Д.Б. Чайванов², Ю.А. Чудина²

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 статье рассмотрены способы инициации функциональных состояний нервной системы, классификация которых предложена в рамках трехмерной векторной модели функциональных состояний. Описание этих способов инициации требует определения устойчивых функциональных состояний и возможных переходных процессов между ними. Такое уточнение элементов модели позволяет создать эффективный инструментарий, позволяющий не только диагностировать функциональные состояния, но и модулировать их с помощью физических методов воздействия на нервную систему.

Ключевые слова: функциональные состояния, физические методы, транскраниальная нейростимуляция, диагностика.

Введение

Основной сложностью модуляции различных функциональных состояний, классификация которых была предложена в рамках трехмерной векторной модели функционального состояния (ФС) нервной системы [18], является определение физических аналогов физиологических реакций, специфических для каждого из трех компонентов векторной модели – уровня возбуждения, фокуса первой сигнальной системы и фокуса второй сигнальной системы. Уровень возбуждения (УВ) нервной системы

напрямую зависит от соотношения процессов возбуждения и торможения, осуществляющихся в нервной ткани. Следовательно, УВ может быть рассмотрен как интегральный показатель общей активации нервной системы, ее реактивности и определен, например, путем измерения суммарной электрической активности головного мозга человека по данным электроэнцефалографии [7].

Напротив, фокусы первой и второй сигнальных систем не удается соотнести с каким-либо измеряемым технически-

ми методами физиологическим маркером. Это связано с подвижностью фокусов данных систем и их непрерывной динамикой. Ориентация фокусов обеих систем на внешние процессы определяется двумя факторами, к которым относятся внешнее воздействие, вызывающее произвольное переключение, и волевое усилие, произвольно направляемое на удержание внешней стимуляции в фокусе внимания. В данном случае сигнальные системы различаются типом информации, которая может восприниматься как перцептивная (первая сигнальная система) и вербальная (вторая сигнальная система). Ориентация фокусов обеих систем на внутренние процессы определяется типом задачи, эффективность решения которой требует отвлечения от внешнего потока стимулов, что представляет произвольную локальную «сенсорную депривацию». Обращение фокусов обеих сигнальных систем на внутренние процессы также может происходить под воздействием монотонно повторяющихся сенсорных или вербальных внешних воздействий, которые вызывают своеобразное локальное «привыкание». Вторая сигнальная система может быть обращена вовнутрь с помощью внутреннего монолога или диалога. В последнем случае УВ нервной системы повышается, а не снижается, как при монотонных воздействиях. Невозможность определения физиологических маркеров, однозначно определяющих компоненты ФС (в частности – разную ориентацию фокусов сигнальных систем), требует введения системного анализа. Преимуществом системного анализа является рассмотрение ФС как интегрального явления, обусловленного вкладом всех трех

компонентов. Предложенный вариант системного анализа позволил рассмотреть каждое ФС в рамках трехмерной векторной модели как синдром, представляющий собой определенный набор физиологических маркеров или симптомов [5]. Синдромный анализ является диагностическим инструментарием, который будет дополнен технологией инициации заданного ФС. С этой целью было введено понятие устойчивых ФС и переходных процессов.

Связи компонентов вектора функционального состояния нервной системы

Для введения понятия устойчивых ФС необходимо рассмотреть специфические взаимодействия компонентов ФС. Между ориентацией фокуса внимания первой сигнальной системы и уровнем возбуждения нервной системы имеется тесная связь [10].

Ориентация фокуса первой сигнальной системы на внешние процессы ведет к активации сенсорных систем и увеличению потока раздражителей к соответствующим областям головного мозга. Это приводит к повышению уровня активации, возбуждения коры и тонуса мускулатуры. Напротив, смещение фокуса первой сигнальной системы вовнутрь приводит к уменьшению потока раздражителей извне и рефлекторному расслаблению мускулатуры, что активизирует процессы торможения.

Уменьшение потока внешних раздражителей, поступающего через сенсорные системы, способствует торможению подкорковых и корковых мозговых структур, что определяет переориентацию фокуса внимания первой сигнальной системы вовнутрь. Напротив, уве-

личение потока раздражителей через сенсорные системы увеличивает возбуждение структур головного мозга и ведет к перемещению фокуса первой сигнальной системы на внешние процессы.

Удержание внешне ориентированного фокуса внимания первой сигнальной системы определяется двигательной активностью и внешней речью. Реализация движений и внешней речи во время бодрствования требует постоянного контроля со стороны первой сигнальной системы, которая автоматически оказывается ориентированной на внешние процессы. Следовательно, любая двигательная и речевая активность приводит к увеличению УВ.

Описанные связи между компонентами вектора функционального состояния с уровнем движений и действий в описанных случаях носят определенный характер. Для наглядности приведем схему, демонстрирующую связи между компонентами вектора ФС нервной системы, действиями и движениями (рис. 1). Увеличение уровня активности,

движений и действий приводит к переориентации фокусов внимания обеих систем на внешние процессы (показано стрелками 1 и 3). Разнонаправленная ориентация фокуса внимания первой сигнальной системы приводит к изменению УВ: направленность на внешние процессы увеличивает, а направленность на внутренние процессы – уменьшает возбуждение нервной системы (стрелка 5). УВ, в свою очередь, способствует переориентации фокуса первой сигнальной системы (стрелка 6). УВ и изменение фокуса внимания второй сигнальной системы влияют на уровень активности, движения и действия (стрелки 2 и 4, соответственно).

Важно отметить, что сила УВ определяется фокусом первой сигнальной системы, а знак связей УВ определяется фокусом второй сигнальной системы. При ориентации фокуса первой сигнальной системы на внешние процессы уровень активации нервной системы увеличивается, а при переориентации первой системы на внутренние процес-



Рис. 1. Связи между компонентами вектора функционального состояния нервной системы, уровнем активности движений и действий. Стрелками показаны связи между компонентами вектора ФС и уровнем активности движений и действий.

сы – УВ снижается. Возбуждающие связи УВ нервной системы детермируются внешней ориентацией фокуса второй сигнальной системы, а наличие тормозных связей УВ задается ориентацией фокуса второй системы на внутренние процессы. Это связано с особенностями перефокусировки второй сигнальной системы, которая во всех ФС управляется независимо от первой системы и УВ.

Устойчивые функциональные состояния нервной системы

При такой организации взаимодействий компонентов вектора ФС с уровнем активности движений и действий в трехмерном пространстве функциональных состояний нервной системы можно выделить 4 устойчивые области: область медленного сна, область быстрого сна, область гипнотического сна и область бодрствования. Эти области

в трехмерном векторном пространстве ФС соответствуют устойчивым функциональным состояниям (УФС). Рассмотрим каждое из них подробно и в соотношении с уровнем активности, движениями и действиями.

УФС «Медленный сон» характеризуется снижением общей двигательной активности на фоне понижения УВ нервной системы. Этому способствует ориентация первой и второй сигнальных систем на внутренние процессы. В то же время, внутренняя фокусировка первой сигнальной системы увеличивает торможение подкорковых структур мозга, являющееся источником сонного торможения для коры и сенсорных систем.

Состояние медленного сна характеризуется тормозными взаимодействиями между компонентами вектора ФС (рис. 2).



Рис. 2. Устойчивое состояние медленного сна. Стрелками показаны тормозные связи между компонентами вектора функционального состояния и уровнем активности, движениями и действиями. Синим цветом обозначен низкий уровень возбуждения нервной системы и общей активности.

Другое устойчивое состояние быстрого сна характеризуется избирательной активацией подкорковых и корковых структур мозга и быстрыми движениями глаз на фоне общего торможения и расслабления всей другой мускулатуры. В состоянии быстрого сна фокусы обеих сигнальных систем ориентированы на внутренние процессы на фоне локальной активации мозговых структур, которая вызывает повышение УВ нервной системы локально. Схема взаимодействия компонентов вектора функционального состояния демонстрирует преимущественно активирующие или тормозные связи между ними стрелками разного цвета (рис. 3).

При этом важно отметить редукцию связи между первой сигнальной системой и уровнем активности, движениями и действиями, которая указывает на то, что во время быстрого сна внутренняя ориентация первой сигнальной системы определяется торможением не со стороны организма и внешней среды, а со стороны спе-

цифических подкорковых структур. Наличие активирующих связей УВ с фокусом первой системы и уровнем активности в состоянии быстрого сна определяется ориентацией фокуса второй сигнальной системы на внешние процессы, которая является локальной и связанной с управлением собственным поведением в сновидениях.

Состояние гипнотического сна также считается устойчивым в связи с тем, что это состояние проявляется у всех людей в той или иной степени. По мнению Л.П. Гримака, состояние транса или гипнотического сна является таким же естественным для человека, как состояния естественного сна и бодрствования [3]. Состояние гипнотического сна сочетает формальные признаки медленного и быстрого сна [9], а по сути представляет собой локальную активацию мозга, вызванную речью гипнолога, на фоне общего торможения мозговой активности и произвольной регуляции движений. В данном случае гипнолог выступает в качестве внутренней речи, являющей-

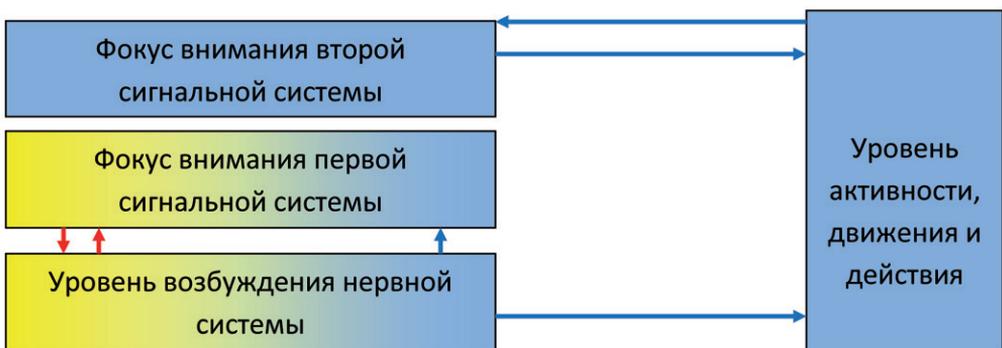


Рис. 3. Устойчивое состояние быстрого сна. Стрелками показаны преимущественно активирующие (красные стрелки) и тормозные (синие стрелки) связи между компонентами вектора функционального состояния и уровнем активности, движениями и действиями. Желтым цветом обозначены средний уровень возбуждения нервной системы, средний уровень активности, распределение фокусов внимания сигнальных систем между внутренними и внешними процессами.

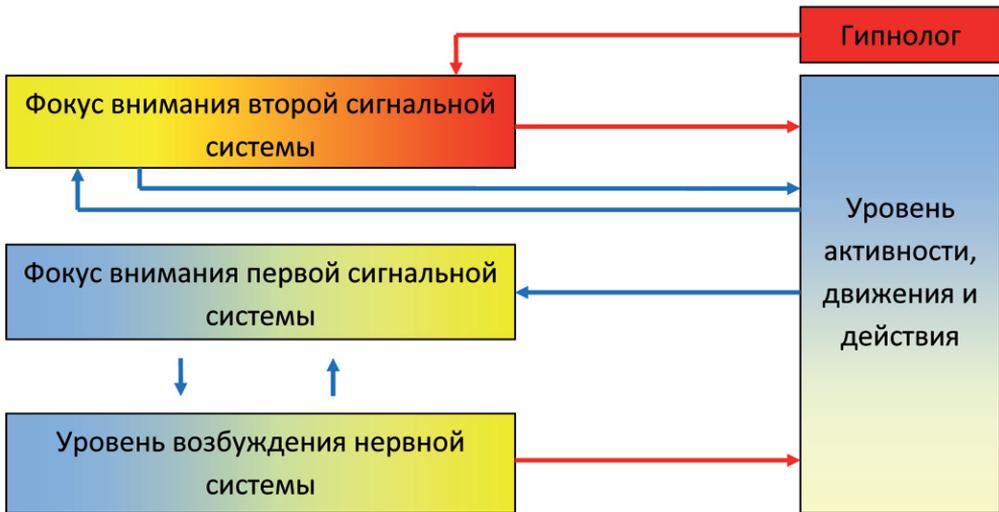


Рис. 4. Устойчивое функциональное состояние гипнотического сна. Стрелками показаны преимущественно активирующие (красные стрелки) и тормозные (синие стрелки) связи между компонентами вектора функционального состояния и уровнем активности, движениями и действиями. Красным цветом обозначены ориентация фокуса второй сигнальных систем на внешние процессы и воздействие со стороны гипнолога, желтым цветом обозначены средний уровень возбуждения нервной системы, средний уровень активности движений и действий, распределение фокуса первой сигнальной системы между внутренними и внешними процессами.

ся волевым усилием, направленным на управление действиями испытуемого. В случае гипнотического воздействия происходит замещение внутренней регуляции собственного поведения посредством внутренней речи внешней речью гипнолога. На рис. 4 показано, что гипнолог частично переориентирует фокус второй сигнальной системы испытуемого на внешние процессы при некоторой обращенности первой системы вовне и увеличении УВ на фоне общего снижения мозговой и двигательной активности. Первоначально состояние гипнотического сна характеризуется каталепсией, которая считается признаком достижения транса, и дальнейшим подчинением инструкциям гипнолога [13, 14].

Устойчивое состояние бодрствования (рис. 5) характеризуется преимущественно активирующими связями между компонентами вектора ФС. В данном состоянии уровень активности обеспечивает успешное и эффективное выполнение движений и действий. Однако ориентация фокусов обеих сигнальных систем не может быть четко определена, так как она динамически меняется. Надо отметить, что бодрствование среди всех устойчивых состояний включает наиболее широкий спектр динамических сочетаний всех трех компонентов вектора ФС. Эта особенность позволяет состояние бодрствования представить в виде наиболее обширной области в трехмерной векторной модели ФС, в то время как все другие УФС похожи,

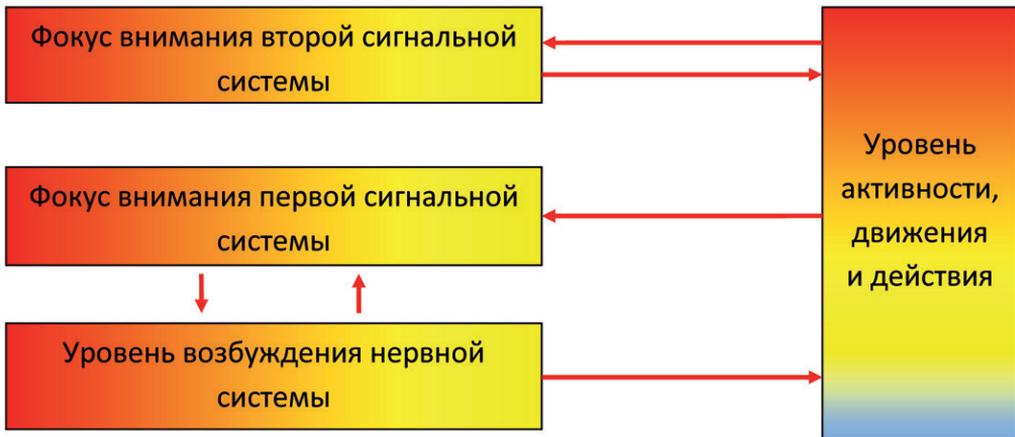


Рис. 5. Устойчивое функциональное состояние бодрствования. Красным цветом обозначены высокий уровень возбуждения нервной системы, высокий уровень активности, движений и действий, ориентация фокусов внимания сигнальных систем преимущественно на внешние процессы. Желтым цветом обозначены средний уровень возбуждения нервной системы, средний уровень активности движений и действий, распределение фокусов внимания сигнальных систем между внутренними и внешними процессами.

скорее, на небольшие области. По-видимому, состояние бодрствования может быть дифференцировано. В рамках трехмерной векторной модели ФС различные варианты состояния бодрствования определяются, главным образом, преимущественной направленностью фокусов сигнальных систем.

Переходные процессы

Изменения описанных УФС могут быть связаны с модификацией определенного состояния или его преобразованием в другое устойчивое состояние. Такие изменения были обозначены как переходные процессы, соответственно модулирующие и изменяющие УФС. Модулирующие переходные процессы влияют на внутреннюю динамику каждого отдельного УФС, обеспечивая незначительные изменения вкладов разных компонентов трехмерного век-

тора. Изменяющие переходные процессы обеспечивают смену одного УФС другим. В данном случае существуют некоторые ограничения и особенности. Рассмотрим все варианты изменяющих переходных процессов.

Наиболее очевидным является переход из состояния бодрствования в состояние медленного сна, которое переходит в быстрый сон, затем следует чередование медленного и быстрого сна, оканчивающееся обычно пробуждением. Прямой переход от бодрствования к медленному сну возможен. При этом прямого перехода от бодрствования к быстрому сну не обнаружено даже в ситуации крайнего утомления или предыдущей депривации быстрого сна [6, 8]. Прямые переходы к бодрствованию из состояний медленного сна и быстрого сна существуют, так как являются важными для выживания особи.

Переход из состояния бодрствования в состояние гипнотического сна подтверждается многочисленными исследованиями в данной области [2, 15]. Как правило, не вызывает сомнений прямой переход из состояния транса в состояние бодрствования, осуществляемый специфическими приемами гипнолога. Относительно перехода из состояния транса в быстрый сон специальных исследований не проводилось, но, по-видимому, такая возможность существует. Возможность перехода из состояния транса в состояние медленного сна также, предположительно, существует и может быть реализована техническими средствами, заменяющими воздействия гипнолога. Использование технических средств для введения в гипнотический сон и управления состоянием транса требует осуществления непрерывной диагностики изменений физиологических показателей работы мозга и организма.

Переходные процессы из состояния медленного и быстрого сна в гипнотический транс, скорее всего, не могут быть реализованы, так как естественный сон является процессом, запускаемым эндогенными мозговыми механизмами, которые не допускают изменения состояния без нарушения его, то есть перехода в бодрствование.

Интерпретация особенностей УФС в терминах трехмерных векторов и переходных процессов, модулирующих и изменяющих УФС, позволяет разработать технические способы инициации переходных процессов с помощью физических методов стимуляции мозга.

Переход из состояния бодрствования в состояние медленного сна связан с изменением знака связей компонентов вектора ФС и переориентацией фо-

кусов сигнальных систем на внешние процессы. Эффективным техническим способом, обеспечивающим переход из бодрствования в медленный сон, является метод электросна [1]. Этот метод осуществляется путем воздействия на головной мозг пациента постоянным импульсным током прямоугольной формы низкой частоты (1-100 Гц) и малой силы (амплитуда до 10 мА) [4, 16]. Данное воздействие вызывает дремотное состояние, переходящее в медленный сон. Основой электросна является тормозный эффект электрического тока на активирующую систему ретикулярной формации среднего мозга, приводящий к подавлению активности подкорковых и корковых структур мозга. Глубину медленного сна можно регулировать, увеличивая электрическое воздействие, при непрерывном контроле динамики физиологических показателей. Переход в обратном направлении из состояния медленного сна в бодрствование обеспечивается прекращением электрического воздействия.

Переход из состояния медленного сна в состояние быстрого сна характеризуется появлением локальной активации в нервной системе и частичным переориентированием фокуса первой сигнальной системы на внешние процессы. Данное состояние можно создать на фоне состояния медленного сна, инициированного методом электросна, путем воздействия на кору методом микрополяризации [11, 12, 17]. Метод микрополяризации позволяет создавать избирательное и локальное возбуждение или торможение достаточно ограниченных участков коры (около 2 см). С помощью микрополяризации можно создавать паттерн возбужденных и заторможенных зон коры

[17], определяющий известную психическую и физическую деятельность. На фоне сонного торможения мозга воссоздание этого паттерна позволит вызвать не саму деятельность, а только представление о ней, которое, возможно, будет переживаться как сновидение. Прекращение микрополяризационного воздействия приведет к возвращению в состояние медленного сна.

Переходный процесс из состояния бодрствования в состояние гипнотического сна характеризуется двумя важными особенностями. Во-первых, необходимо снизить уровень возбуждения нервной системы до состояния медленного сна, во-вторых, при этом требуется оставить фокус второй сигнальной системы частично ориентированным вовне, на речь гипнолога. Техническим средством снижения уровня возбуждения нервной системы и переориентацией фокусов обеих систем преимущественно на внутренние процессы является электросон. Формирование частичной ориентации фокуса второй сигнальной системы на внешние процессы может осуществляться с помощью записанной на пленку или генерируемой речи гипнолога. Характеристики этой звучащей речи должны в начале воздействия подстраиваться под состояние пациента, изменяясь зависимо от физиологических процессов его организма. В ходе суггестивного воздействия характеристики звучащей речи должны незначительно меняться, обеспечивая настройку физиологических систем пациента. В качестве речи гипнолога может быть использована речь самого пациента, предварительно записанная и затем преобразованная. Такой прием, возможно, позволит сделать процедуру воздейст-

вия более похожей на недирективный гипноз [19]. Переход из состояния гипнотического транса в состояние медленного сна может осуществляться посредством отмены суггестивного речевого воздействия, а дальнейшее прекращение электрического воздействия приведет к постепенному пробуждению.

Эффективность рассмотренных способов инициации переходных процессов между устойчивыми функциональными состояниями обеспечивается использованием параметров физических методов воздействия на нервную систему, определенных на основе диагностического анализа показателей динамики функционального состояния.

Список литературы

1. *Гиляровский В.А., Ливенцев Н.М., Сегаль Ю.Е., Кириллова З.А.* Электросон. - М.: Медгиз. 1958. 172 с.
2. *Гримак Л.П.* Моделирование состояний человека в гипнозе. - М.: Либриком. 2009. 272 с.
3. *Гримак Л.П.* Тайны гипноза. Современный взгляд. - СПб: Питер. 2004. 304 с.
4. *Гурленя А.М., Бабель Г.Е., Смычек В.Б.* Физиотерапия в неврологии. - М.: Медицинская литература. 2008. 296 с.
5. *Каркищенко Н.Н., Чудина Ю.А., Чайванов Д.Б.* Синдромный анализ функциональных состояний в контексте трехмерной векторной модели // Биомедицина. 2014. № 2. С. 25-36.
6. *Ковальзон В.М.* Основы сомнологии: физиология и нейрохимия цикла «бодрствование-сон». Изд-во «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2012. 239 с.
7. *Кулаичев А.П.* Компьютерная электрофизиология и функциональная диагностика. - М.: Инфра-М, Форум. 2007. 640 с.
8. *Левин Я.И.* Депривация сна у человека: поведенческие, психофизиологические и биохимические аспекты // Сомнология и медицина сна. Избранные лекции / под ред. Я.И. Левина, М.Г. Полуэктова. - М.: Медфорум. 2013. С. 129-137.

9. *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.
10. *Окс С.* Основы нейрофизиологии / под ред. Г.Д. Смирнова. - М.: Изд-во «Мир». 1969. 448 с.
11. *Пинчук Д.Ю.* Транскраниальные микрополяризации головного мозга. - СПб. 2007.
12. *Пономаренко Г.Н.* Физические методы лечения. - СПб. 2002.
13. *Сакеллион Д.Н., Кадиоров Б.Р.* Психофизиологические критерии гипнотической катаlepsии // Психотерапия. 2010. № 2. С. 37-42.
14. *Сакеллион Д.Н., Мухамеджанов Н.З., Султанходжаева Н.Д., Каримбердиев Д.Р., Кадиоров Б.Р.* Объективизирующие депривацию электроэнцефалографические корреляты моделируемой гипнозом катаlepsии // Журнал неврологии и психиатрии. 2006. Т. 106. № 3. С. 39-47.
15. *Тукаев Р.Д.* Гипноз. Механизмы и методы клинической гипнотерапии. - М. 2006. 448 с.
16. *Ушаков А.А.* Практическая физиотерапия. - М.: Медицинское информационное агентство. 2009. 608 с.
17. *Шелякин А.М., Пономаренко Г.Н.* Микрополяризация мозга. - СПб.: Балтика. 2006.
18. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Трехмерная векторная модель функционального состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной стимуляции // Биомедицина. 2013. № 3. С. 18-25.
19. *Эрикссон М.* Стратегии психотерапии. - М.: Летний сад. 2000. 512 с.

Physical methods of modulation (initiation) of transients between steady functional conditions of nervous system

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

In the present article ways of initiation of functional conditions of the nervous system which classification is offered within three-dimensional vector model of functional states are considered. The description of these ways of initiation demands definition of steady functional states and possible transients between them. Such specification of elements of model allows to create the effective tools allowing not only to diagnose functional states, but also to modulate them by means of physical methods of impact on nervous system.

Key words: functional states, physical methods, transcranial neurostimulation, diagnostics.

Исследование свойств надмолекулярного кластера «алкогольдегидрогеназа-лактатдегидрогеназа» в субклеточных фракциях печени крыс в норме и при токсическом гепатите

А.Г. Соловьёва¹, А.А. Уланова¹, А.К. Мартусевич¹, С.П. Перетягин²

¹ – ФГБУ «ННИИТО» Минздрава России

² – Ассоциация российских озонотерапевтов

Контактная информация: к.б.н. Соловьёва А.Г., sannag5@mail.ru

Показана возможность образования надмолекулярного функционального кластера «алкогольдегидрогеназа-лактатдегидрогеназа» для различных компарментов клеток печени и его участие в молекулярных механизмах реализации метаболического эффекта гепатотоксичного ксенобиотика. Кластер ЛДГ пр-АДГ пр ответственен за образование в печени таких метаболитов как этанол и лактат, от функционирования кластера ЛДГобр-АДГобр зависит содержание в печени ацетальдегида и пирувата. Преобладание того или иного субстрата играет определяющую роль в усилении или ослаблении токсического действия тетрахлорметана.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, фермент-ферментные комплексы, токсический гепатит.

Введение

Известно, что изучению молекулярных механизмов действия очищенных препаратов-ферментов в последние десятилетия уделяется огромное внимание. Однако такой классический подход мало даёт для оценки каталитических свойств ферментов клетки, находящихся в динамическом взаимодействии друг с другом и обуславливающих ее функционирование и поведение [2].

Способность образовывать комплексы характерна для ключевого фермента биотрансформации печени – алкогольдегидрогеназы (АДГ), которая участвует в регуляции отношения НАДН/НАД в клетке, конкурируя с другими НАД-оксидоредуктазами за кофермент. Существуют сведения о взаимодействии АДГ с лактатдегидро-

геназой (ЛДГ) *in vitro* [14, 20, 22, 23]. Лактатдегидрогеназа как фермент гликолиза играет важную роль в регуляции энергетического обмена клетки [2, 21, 23]. Ранее уже высказывалась гипотеза о связи образованного комплекса ЛДГ-АДГ со структурными компонентами клетки, в частности, с митохондриями [3]. Подобные исследования раскрывают молекулярную сущность функции печени и составляют рациональную основу для разработки новых подходов к профилактике, ранней диагностике и возможности эффективного лечения различных патологических альтераций данного органа.

Поражения печени наблюдаются уже в первые часы после воздействия различных ксенобиотиков [7, 9, 10, 15], к числу которых с высокой степе-

нью избирательной гепатотоксичности относится тетрахлорметан (CCl_4). Имеются данные, что в результате введения CCl_4 происходит усиление свободнорадикальных процессов и, как следствие, изменение метаболизма печени, сопровождающееся нарушением активности ферментативных систем [9, 12].

В настоящее время отсутствуют какие-либо представления о роли функционального взаимодействия ЛДГ-АДГ в составе надмолекулярного кластера в молекулярных механизмах поражения печени на модели острого токсического гепатита при однократном действии ксенобиотика.

Целью данной работы явилось исследование каталитических параметров надмолекулярного кластера ЛДГ-АДГ в норме и при токсическом действии гепатотропного ксенобиотика CCl_4 .

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 105 крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г. Все экспериментальные животные были разделены на следующие группы: 1 группа – интактные животные; 2 группа – контрольные животные после однократного введения растительного масла внутривентрально, забитые на 1, 7 и 14 сутки; 3 группа – опытные животные с токсическим гепатитом, забитые на 1, 7 и 14 сутки. Модель экспериментального токсического гепатита создавали внутривентральным введением 40%-тетрахлорметана в растительном масле в дозе 1,0 мл на 100 г массы однократно.

Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом, печень извлекали, перфузировали охлажденным физиологическим раствором.

Субклеточные фракции ткани печени получали методом дифференциального центрифугирования [13], все процедуры проводили на холоде (0-4°C). Для этого навеску органа (1 г) помещали на поставленную в лёд чашку Петри, измельчали ножницами, переносили в стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком (зазор между стенкой гомогенизатора и пестиком составлял 0,2-0,3 мм). Гомогенизирование проводили в течение 30-40 сек в охлажденной среде выделения (0,25 М раствор сахарозы с 1 мМ ЭДТА, pH 7,4). Конечный объем среды выделения, пошедшей на гомогенизирование всей навески, составил 10 мл. Полученный гомогенат центрифугировали при 200 g 10 мин. Рыхлый осадок, содержащий ядра и неразрушенные клетки, отбрасывали. Надосадочную жидкость центрифугировали на центрифуге Multifuge 1S-R 20 мин при 26000 g. Для исследований использовали супернатант (цитоплазматическая фракция) и осадок, содержащий митохондрии, который ресуспензировали.

Исследование активности ЛДГ и АДГ проводили на спектрофотометре Power Wave XS. Активность лактатдегидрогеназы определяли с использованием в качестве субстрата молочной кислоты (прямая реакция, ЛДГпр) и пировиноградной кислоты (обратная реакция, ЛДГобр) [6]. Определение активности алкогольдегидрогеназы проводили с использованием в качестве субстрата этилового спирта (прямая реакция, АДГпр) по методу W.M. Keung, et al. [17] и ацетальдегида (обратная реакция, АДГобр) по методу M. Koivusalo, et al. [18]. Оценку каталитических свойств ферментов в надмолекулярной системе

(АДГобр-ЛДГобр и ЛДГпр-АДГпр) проводили путём одновременного внесения в пробу субстратов для ЛДГ и АДГ. Концентрацию белка определяли по методу Лоури в модификации [16].

Результаты исследований обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента с помощью программы Statistica 6.0, Biostat.

Результаты исследований

Полученные результаты показали, что в цитоплазматической фракции печени удельная активность ЛДГпр у интактных и контрольных животных в составе кластера АДГпр-ЛДГпр статистически значительно уменьшилась на 60% и 59%, а АДГпр, наоборот, увеличилась на 89% и 67% соответственно (рис. 1).

Уменьшение активности ЛДГ в прямой реакции в цитоплазматической фракции печени на 1-е (на 70%), 7-е (на 42%) и 14-е сутки после поражения (на 60%) по сравнению с контрольными животными способствует накоплению лактата. При этом активизируется протеолиз, усиливается внутриклеточный ацидоз, что, в свою очередь, вызывает повреждение цитомембран. Увеличение количества лактата сопровождается инициацией перекисного окисления липидов и накоплением в жидких средах его продуктов (малонового диальдегида, диеновых и триеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов, диенкетон) [9]. Удельная активность ЛДГпр в цитоплазматической фракции печени крыс с токсическим гепатитом

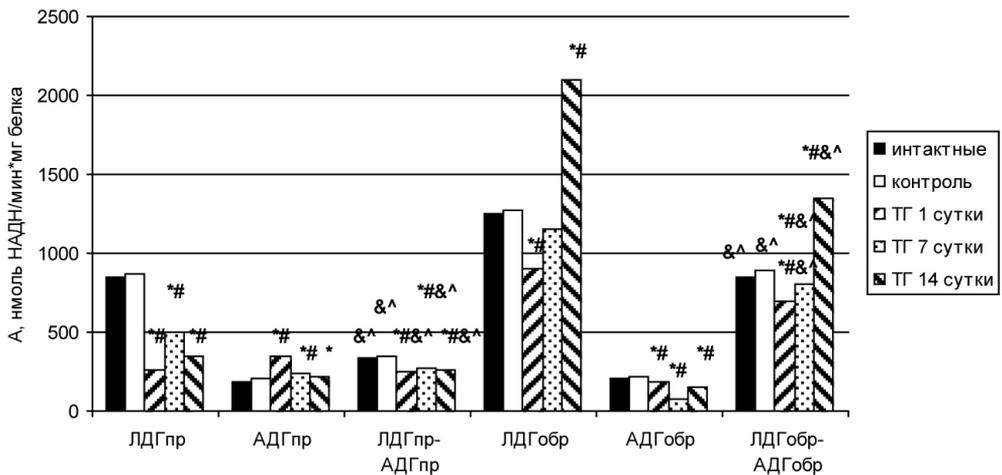


Рис. 1. Активность ЛДГ, АДГ и кластеров АДГ-ЛДГ в прямой и обратной реакциях в цитоплазматической фракции печени у интактных животных и при токсическом гепатите.

Примечания:

& – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе ЛДГпр, ЛДГобр;
 ^ – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе АДГпр, АДГобр;
 * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе «интактные»;
 # – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль»;
 ТГ – токсический гепатит.

на 7-е и 14-е сутки после поражения в составе кластера статистически значительно снизилась на 46% и 26% соответственно (рис. 1).

В цитоплазматической фракции печени отмечено повышение активности АДГпр в составе кластера на 7-е и 14-е сутки после поражения на 12% и 19% соответственно и увеличение активности АДГ в прямой реакции на 1-е (на 67%) и 7-е сутки (на 13%) по сравнению с контрольными животными, что способствует накоплению высокотоксичного ацетальдегида, который в повышенных концентрациях нарушает структуру и функции плазматических мембран [1].

Показано, что в цитоплазматической фракции печени каталитическая активность ЛДГобр у интактных и контрольных животных в составе кластера ЛДГобр-АДГобр уменьшилась на 35%, а АДГобр, наоборот, увеличилась на 74% (рис. 1).

На 1-е и 7-е сутки токсического гепатита в цитоплазматической фракции печени происходило снижение активности лактатдегидрогеназы в обратной реакции по сравнению с контрольными животными на 29% и 11% соответственно. Удельная активность ЛДГобр цитозоля печени в составе кластера при воздействии тетрахлорметана статистически значительно уменьшилась на 1-е сутки на 22%, на 7-е сутки – на 31%, на 14-е сутки – на 36%. Отмечено снижение активности АДГобр на 1-е сутки токсического гепатита на 14%, на 7-е сутки – на 64% и на 14-е сутки – на 32% по сравнению с контрольными животными в цитоплазматической фракции. Удельная активность АДГобр цитозоля печени в составе кластера на фоне воздействия CCl_4 возросла на 1-е, 7-е и 14-е сутки в 3, 10 и 9 раз соответственно.

В митохондриальной фракции в составе кластеров АДГпр-ЛДГпр и АДГобр-ЛДГобр удельная активность ЛДГпр и ЛДГобр печени интактных и контрольных животных уменьшилась на 59% и на 22% соответственно, каталитическая активность АДГпр увеличилась на 84%, АДГобр повысилась на 53% (рис. 2). Удельная активность ЛДГпр и ЛДГобр в митохондриях в составе кластеров при воздействии тетрахлорметана понизились на 1-е сутки на 20% и 18% соответственно, на 7-е сутки – на 45% и 16%, на 14-е сутки – на 52% и 38%. Показано, что активность АДГпр в составе кластера АДГпр-ЛДГпр при токсическом гепатите уменьшилась на 1-е сутки на 33%, на 7-е сутки – увеличилась на 47%, а на 14-е сутки возросла на 38% в митохондриальной фракции печени. На фоне воздействия CCl_4 активность АДГобр в составе кластера АДГобр-ЛДГобр повысилась на 1-е, 7-е и 14-е сутки в 4, 8 и 14 раз соответственно (рис. 2).

Полученные результаты показали, что в митохондриальной фракции печени при токсическом гепатите активность ЛДГобр увеличилась на 1-е сутки в 1,3 раза, активность ЛДГобр и ЛДГпр возросла на 7-е сутки в 1,7 и 1,3 раза соответственно, и на 14-е сутки – в 2,7 и 2 раза по сравнению с контрольными животными. Активность АДГобр в митохондриях при действии тетрахлорметана уменьшилась на 1-е, 7-е и 14-е сутки в 1,5; 2 и 3 раза соответственно по сравнению с контролем. Удельная активность АДГпр при воздействии CCl_4 возросла на 1-е сутки в 4 раза, на 7-е сутки – в 5 раз, на 14-е сутки – в 7 раз по сравнению с контрольными животными (рис. 2).

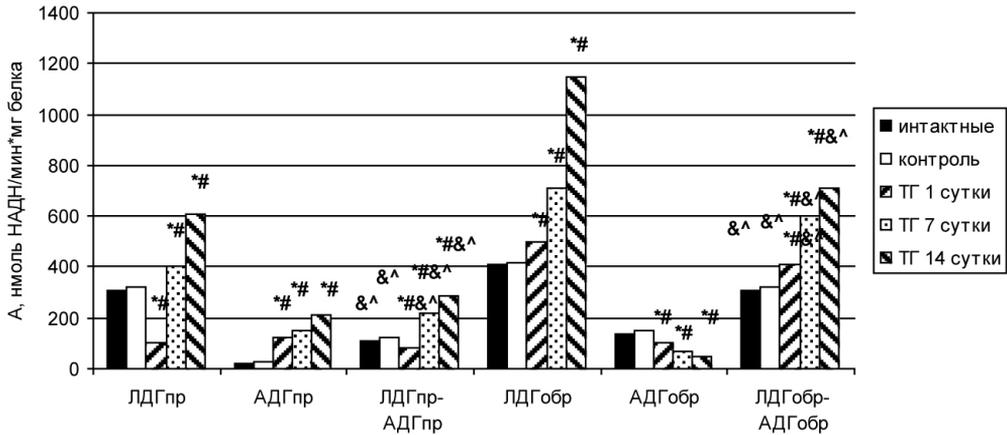


Рис. 2. Активность ЛДГ, АДГ, кластеров АДГ-ЛДГ в прямой и обратной реакциях в митохондриальной фракции печени в норме и при токсическом гепатите.

Примечания:

& – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе ЛДГпр, ЛДГобр;
 ^ – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе АДГпр, АДГобр;
 * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе «интактные»;
 # – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль»;
 ТГ – токсический гепатит.

Обсуждение результатов

Дисфункция митохондрий – это начальный этап проявлений гепатотоксичности, а сами митохондрии служат первичной мишенью для токсинов [19].

Уменьшение удельной активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции в митохондриальной фракции печени на 1-е сутки после поражения и повышение удельной активности ЛДГОбр на все сутки после введения крысам тетрахлорметана способствуют накоплению лактата и развитию тканевой гипоксии. Увеличение активности АДГпр и снижение АДГобр в митохондриальной фракции печени крыс на 1-е, 7-е и 14-е сутки после воздействия CCl_4 вызывают возрастание уровня высокотоксичного ацетальдегида, который ингибирует активность многих ферментов мембран и сыворотки крови [4]. Повышенное

содержание ацетальдегида и лактата, которые могут стимулировать синтез коллагена фибробластами, приводит к накоплению соединительной ткани в печени и развитию цирроза, к опухолевому росту и возникновению гепатом [4, 12].

Таким образом, в митохондриальной фракции печени на 1-е, 7-е и 14-е сутки после однократного введения токсического ксенобиотика (тетрахлорметана) возникают изменения активности ЛДГ и АДГ, вследствие чего можно ожидать возрастания концентрации ацетальдегида и лактата, снижения уровня эндогенного этанола и пирувата. Это указывает на существенные нарушения в метаболических реакциях в данном компартменте клетки. Данная биохимическая картина характеризуется выраженным аэробным гликолизом [11].

В результате проведенных исследований установлено, что энзиматические механизмы взаимодействия лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в норме и при токсическом гепатите состоят в следующем: у контрольных животных реакция лактатдегидрогеназы сдвинута в сторону обратной реакции и характеризуется накоплением лактата и кофермента НАД. В норме количество пирувата в тканях на 2-3 порядка ниже, чем лактата, а сам пируват, подобно ацетальдегиду, легко вступает в химические реакции. Аналогичные реакции отмечаются при токсическом гепатите (преобладание активности ЛДГобр по сравнению с ЛДГпр).

В то же время, наблюдается иная картина в отношении алкогольдегидрогеназы. В норме реакция алкогольдегидрогеназы сдвинута в сторону обратной реакции и характеризуется преобладанием этанола и кофермента НАД. При токсическом гепатите равновесие сдвигается в сторону АДГпр, что сопровождается увеличением количества ацетальдегида и восстановленного НАД. Установлено, что у интактных животных энзиматические механизмы взаимодействия обмена «лактат-пируват» и «этанол-ацетальдегид» направлены в сторону увеличения содержания эндогенного пирувата и этанола в клетке. Это создаёт условия эффективного использования пирувата митохондриями в условиях аэробного синтеза АТФ [8]. В то же время, поддержание оптимальной концентрации ацетальдегида играет важную роль в регуляции работы дыхательной цепи митохондрий [5].

Таким образом, на примере энзимов в гетерогенной системе (интактные крысы, контрольная группа) установ-

лена общая закономерность изменения каталитической активности исследуемых оксидоредуктаз при образовании комплекса. Так, в процессе формирования кластера происходит снижение активности лактатдегидрогеназы, как в прямой, так и в обратной реакциях. Напротив, для АДГ, как в прямой, так и в обратной реакциях, показано увеличение каталитических свойств фермента, в результате чего активность образовавшегося комплекса ЛДГобр-АДГобр больше активности АДГпр-ЛДГпр.

Гепатотоксический ксенобиотик тетрахлорметан вызывает структурно-функциональные изменения метаболических компартментов клеток печени, способствует развитию жировой дегенерации, фиброза, апоптоза, канцерогенеза. Установлено, что токсическое действие CCl_4 связано, в первую очередь, с прооксидантным действием образующихся в процессе его метаболизма свободных радикалов – трихлорметильного и высокореактивного трихлорметилпероксильного [9]. Данное воздействие тетрахлорметана вызывает кластерокинетическое изменение надмолекулярных комплексов ферментов субклеточных органелл.

Кластер ЛДГпр-АДГпр ответственен за образование в печени таких метаболитов как этанол и лактат, а от функционирования кластера ЛДГобр-АДГобр зависит содержание в печени ацетальдегида и пирувата. При этом преобладание того или иного субстрата играет определяющую роль в усилении или ослаблении токсического действия ксенобиотика.

Таким образом, в результате конформационно-структурных перестроек

образуются кластеры ЛДГпр-АДГпр и ЛДГобр-АДГобр, от соотношения которых будет зависеть соотношение (количество) окисленных и восстановленных форм кофермента в клетке.

Выводы

1. В цитоплазматической и митохондриальной фракциях печени при токсическом гепатите на 1-е, 7-е и 14-е сутки после воздействия тетрахлорметана удельная активность лактатдегидрогеназы, как в прямой, так и в обратной реакциях, в составе кластера снижается, а алкогольдегидрогеназы – увеличивается.

2. Введение крысам тетрахлорметана вызывает изменение каталитических свойств АДГ печени, способствуя снижению удельной активности АДГобр и повышению каталитической активности АДГпр на 1-е, 7-е и 14-е сутки после воздействия CCl_4 в цитоплазматической и митохондриальной фракциях печени крыс. При токсическом гепатите отмечено уменьшение каталитических свойств ЛДГпр в цитозоле и повышение удельной активности ЛДГобр в митохондриях.

Список литературы

1. *Ашмарин И.П.* Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины // Успехи биологической химии. 2003. Т. 43. С. 3-18.
2. *Зимин Ю.В., Сяткин С.П., Березов Т.Т.* Надмолекулярная регуляция активности некоторых оксидоредуктаз клетки в норме и патологии // Вопросы медицинской химии. 2001. Т. 47. № 3. С. 247-287.
3. *Зимин Ю.В., Соловьёва А.Г.* Регуляторная роль надмолекулярного комплекса алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы митохондрий клетки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. № 12. С. 644-645.

4. *Кленова Н.А.* Биохимия патологических состояний. - Самара: Изд-во «Самарский университет». 2006. 216 с.
5. *Корнеев А.А., Комиссарова И.А.* О биологическом значении ацетальдегида как клеточного регулятора дыхательной цепи митохондрий // Успехи современной биологии. 1994. Т. 114. № 2. С. 212-221.
6. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
7. *Михайлова Е.В., Попова Т.Н., Сафонова О.А.* Каталитические свойства NADP-зависимой малатдегидрогеназы из печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2009. № 3. С. 39-43.
8. *Островский Ю.М., Островский С.Ю.* Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма. - Минск: Наука и техника. 1995. 280 с.
9. *Перетягин С.П., Большухин С.Ю., Мартусевич А.К.* Экспериментальная токсикология тетрахлорметана: оценка влияния на систему липопероксидации // Теоретическая и прикладная экология. 2012. № 3. С. 55-59.
10. *Попова Т.Н., Азарков А.А., Семенихина А.В.* Каталитические свойства глутатионредуктазы из печени крысы в норме и при токсическом гепатите // Биомедицинская химия. 2009. № 2. С. 169-176.
11. *Ткачук В.А.* Клиническая биохимия. - М.: Издательство «ГЕОТАР-МЕД». 2004. 267 с.
12. *Тутельян В.А., Аксенов И.В., Кравченко Л.В. и др.* Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса // Токсикологический вестник. 2009. № 1. С.12-17.
13. *Финдлей Дж., Эван У.* Биологические мембраны. Методы. - М.: Мир. 1990. 424 с.
14. *Chaubey A., Gerard M., Singh V.S.* Immobilization of lactate dehydrogenase on tetraethylorthosilicate-derived sol-gel films for application to lactate biosensor // Appl. Biochem. Biotechnol. 2001. Vol. 96. № 1-3. P. 293-301.
15. *Clichici S., Catoi C., Mocan T., et al.* Non-invasive oxidative stress markers for liver fibrosis development in the evolution of toxic hepatitis // Acta Physiol. Hung. 2011. Vol. 98. № 2. P. 195-204.
16. *Dawson J.M., Heatlic P.L.* Lowry method of protein quantification. Evidence for Photosensitivity // Anal. Biochem. 1984. Vol. 140. № 2. P. 391-393.

17. *Keung W.M., Ho Y.W., Fong W.P.* Isolation and characterization of shrew liver alcohol dehydrogenase // *Comp. Biochem. and Physiol. B.* 1989. Vol. 93. № 1. P. 169-173.
18. *Koivusalo M., Baumann M., Votila L.* Evidence for the identity of glu-tathione - dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcoholdehydrogenase // *FEBS Lett.* 1989. Vol. 257. № 1. P. 105-109.
19. *Martin E.J., Racz W.J., Forkert P.G.* Mitochondrial dysfunction is an early manifestation of 1,1 – dichloroethylene induced hepatotoxicity in mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. Vol. 304. P. 121-129.
20. *Nicolau E., Méndez J., Fonseca J.J., et al.* Bioelectrochemistry of non-covalent immobilized alcohol dehydrogenase on oxidized diamond nanoparticles // *Bioelectrochemistry.* 2012. Vol. 85. P. 1-6.
21. *Peretyagin S.P., Martusevich A.K., Solovyeva A.G., et al.* Enzymological evaluation of hepatotropic effect of ozone in a subchronic experiment // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2013. Vol. 154. Iss. 6. P. 789-791.
22. *Trivedi A., Heinemann M., Spiess A.C., et al.* Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases // *J. Biosci Bioeng.* 2005. Vol. 99. № 4. P. 340-347.
23. *Tsai Y.-C., Chen S.-Y., Liaw H.-W.* Immobilization of lactate dehydrogenase within multivalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors // *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2007. Vol. 2. P. 474-481.

Investigation of supramolecular cluster «alcohol dehydrogenase – lactate dehydrogenase» in subcellular fractions of liver healthy rats and animals with toxic hepatitis

A.G. Soloveva, A.A. Ulanova, A.K. Martusevich, S.P. Peretyagin

Possibility of formation of supramolecular functional cluster «alcohol dehydrogenase – lactate dehydrogenase» for various compartment of liver cells and its participation in molecular mechanisms of realization of metabolic effect of a hepatotoxic xenobiotic is shown. Cluster $LDH_{dir}-ADH_{dir}$ is responsible for education in a liver of such metabolites as ethanol and a lactate, from functioning of cluster $LDH_{back}-ADH_{back}$ depends the contents in a liver of acetaldehyde and pyruvate. Prevalence of this or that substratum plays defining role in strengthening or weakening of toxic effect of tetrachlormethane.

Key words: alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase, enzyme-enzyme complexes, toxic hepatitis.



Взаимовлияния микроэлементов в мышцах 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 имени К.А.Тимирязева, Москва

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

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

Ключевые слова: металлохелаты, микроэлементы, атомно-абсорбционная спектрометрия.

В данной статье продолжается анализ результатов исследования особенностей распределения металлов в тканях лабораторных животных при их нормальном и избыточном пищевом потреблении, частично опубликованных нами ранее [2-5].

Материалы и методы

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 системы RairIsoSystem. В качестве корма для животных 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 сушильном шкафу при температуре +105°C до достижения постоянной сухой массы, затем озолялись в муфельной печи при температуре +850°C. Навески золы растворяли в 30% химически чистой соляной кислоте и определяли содержания металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии [6] (прибор «Спектр

5-4», производство ОАО «Союзцветметавтоматика», Россия, номер Государственного реестра средств измерений 13743-04). Полученные количественные результаты измерений из зольных навесок пересчитывались в содержание металлов в тканях (мг/100 г ткани).

Исследуемые металлохелатные комплексы были получены путем совместной инкубации при комнатной 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 мышцах лабораторных животных.

Результаты и их обсуждение

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

Таблица 1

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

Статистический параметр	Ca	Cu	Mn	Fe	Mg	Zn
Среднее	15,50	0,38	0,08	8,02	8,35	3,22
Стандартная ошибка	0,83	0,01	0,01	0,27	0,13	0,05
Медиана	16,92	0,37	0,07	7,99	8,49	3,18
Мода	20,00	0,40	0,07	10,19	8,20	3,00
Стандартное отклонение	4,59	0,07	0,03	1,48	0,74	0,29
Дисперсия выборки	21,14	0,01	0,01	2,21	0,56	0,08
Эксцесс	-1,466	0,654	-1,133	-0,332	-0,035	-0,529
Асимметричность	-0,342	0,818	0,296	-0,242	-0,659	0,555
Интервал	13,6	0,28	0,12	5,95	2,94	0,98
Минимум	8,4	0,27	0,02	4,72	6,78	2,84
Максимум	22,0	0,55	0,14	10,67	9,72	3,82
Коэффициент вариации	0,29	0,18	0,48	0,18	0,08	0,09
Нижняя граница среднего уровня, мг/100 г ткани	10,0	0,30	0,04	6,50	7,70	2,90
Нижняя граница верхнего уровня	20,0	0,45	0,11	9,00	9,00	3,50

Анализ табл. 1 показывает, что основная масса металлов (за исключением меди) имеет характер распределения содержания в мышцах, далекий от кривой нормального распределения (расходящиеся значения средней величины, медианы и моды распределения, высокие значения параметров «эксцесс» и «асимметрия»), и, следовательно, в отношении содержания в мышцах кальция, марганца, железа, магния и цинка существуют значимые внешние факторы воздействия. Распре-

деление же значений содержания меди близко к кривой нормального распределения, и на него возможно минимальное влияние каких-либо внешних факторов.

Данные, характеризующие возможное влияние уровня содержания одних металлов («независимые» металлы) в мышцах на содержание других исследуемых металлов («зависимые» металлы), обработаны статистически методом дисперсионного факторного анализа и представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние уровня металла в тканях мышц животных на содержание других металлов в мышцах

Металл независимый	Металл зависимый	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания независимого металла в мышцах			Коэффициент детерминации модели (D)	Уровень значимости (p)
		низкий	средний	высокий		
Кальций	Медь	0,3	0,41	0,40	0,26	0,02
	Марганец	0,11	0,07	0,07	0,12	0,17
	Железо	8,7	7,7	8,1	0,07	0,38
	Магний	7,7	8,7	8,2	0,25	0,02
	Цинк	2,9	3,3	3,4	0,32	0,006
Медь	Кальций	8,6	16,0	17,5	0,27	0,02
	Марганец	0,10	0,08	0,07	0,03	0,63
	Железо	10,2	7,5	9,0	0,39	0,002
	Магний	8,0	8,3	9,0	0,17	0,08
	Цинк	2,9	3,2	3,4	0,19	0,06
Марганец	Кальций	21,1	14,4	15,4	0,24	0,02
	Медь	0,41	0,39	0,38	0,02	0,78
	Железо	9,0	8,3	6,7	0,26	0,02
	Магний	9,1	8,4	7,7	0,35	0,003
	Цинк	3,6	3,1	3,2	0,34	0,004
Железо	Кальций	13,5	17,0	13,6	0,14	0,12
	Медь	0,34	0,40	0,39	0,09	0,31
	Марганец	0,09	0,08	0,07	0,02	0,79
	Магний	8,0	8,3	8,6	0,06	0,44
	Цинк	3,1	3,2	3,2	0,04	0,59
Магний	Кальций	16,1	14,2	18,4	0,09	0,25
	Медь	0,37	0,38	0,45	0,14	0,14
	Марганец	0,13	0,07	0,05	0,41	0,0008
	Железо	6,7	8,0	9,3	0,37	0,02
	Цинк	3,0	3,2	3,5	0,29	0,01
Цинк	Кальций	9,2	16,0	20,6	0,50	0,00001
	Медь	0,32	0,40	0,40	0,17	0,08
	Марганец	0,08	0,08	0,05	0,09	0,28
	Железо	9,1	7,6	9,0	0,21	0,04
	Магний	8,1	8,3	8,9	0,09	0,26

Анализ табл. 2 показывает, что только для железа не выявлено влияния на содержание других металлов в мышцах. Для остальных металлов наблюдались несколько типов влияний.

Влияние по типу усиления было характерно для воздействия **кальция** на содержание цинка (коэффициент корреляции между величинами $+0,68$; коэффициент детерминации модели $0,32$; $p=0,006$) и меди (коэффициент детерминации $0,26$; $p=0,02$), для воздействия **меди** на содержание кальция (коэффициент детерминации $0,27$; $p=0,02$), цинка (коэффициент детерминации $0,19$; $p=0,06$) и магния (коэффициент детерминации $0,17$; $p=0,08$), для воздействия **магния** на содержание в мышцах железа (коэффициент детерминации $0,37$; $p=0,02$) и цинка (коэффициент детерминации $0,29$; $p=0,01$), для воздействия **цинка** на содержание в мышцах кальция (коэффициент корреляции между величинами $r=+0,68$; коэффициент детерминации $0,50$; $p=0,00001$) и меди (коэффициент корреляции между величинами $r=+0,54$; коэффициент детерминации $0,17$; $p=0,08$).

Влияние по типу конкурентного вытеснения было характерно для воздействия **марганца** на содержание в мышцах магния (коэффициент корреляции между величинами $r=-0,65$; коэффициент детерминации $0,35$; $p=0,003$), цинка (коэффициент детерминации $0,34$; $p=0,004$), железа (коэффициент детерминации $0,26$; $p=0,02$) и кальция (коэффициент детерминации $0,24$; $p=0,02$), а также для воздействия магния на содержание в мышцах марганца (коэффициент корреляции между величинами $r=-0,65$; коэффициент детерминации $0,41$; $p=0,0008$).

Влияние по типу куполообразной кривой, при котором низкому значению независимого фактора соответствует низкое значение зависимого металла, повышение уровня независимого фактора до среднего уровня вызывает максимально высокое повышение уровня зависимого металла, но дальнейшее повышение концентрации в тканях независимого металла ведет к частичному вытеснению из мышечного тканевого депо зависимого металла. Такой тип влияния был характерен для воздействия **кальция** на содержание в мышцах магния (коэффициент детерминации $0,25$; $p=0,02$).

Влияние по типу чашеобразной кривой, при котором низкому значению независимого фактора соответствует максимальное содержание зависимого металла в мышцах, при повышении содержания независимого фактора до среднего уровня происходит снижение содержания зависимого металла в тканях, однако дальнейший рост уровня независимого фактора вновь сопровождается повышением значений содержания зависимого металла в тканях. Этот тип взаимодействия характеризуется дозозависимым характером: при низких дозах независимого металла формируется конкурентное взаимодействие с приоритетом зависимого металла, затем происходит его частичное конкурентное вытеснение растущим содержанием независимого металла. Однако избыточно высокое содержание независимого металла ведет к усилению синтеза белков-носителей зависимого металла, что и проявляется ростом его содержания в тканях. Такой тип взаимодействия был характерен для влияния **меди** на содержание железа в мышцах (коэффициент

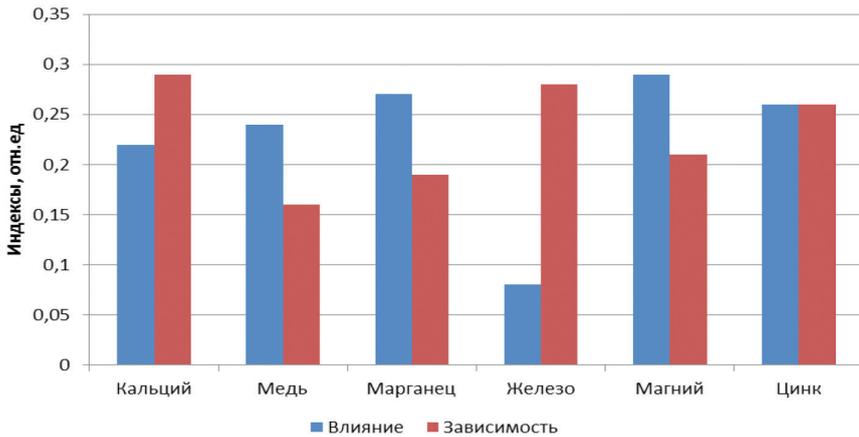


Рис. 1. Интегральная оценка влияния и зависимости металлов друг от друга в мышцах крыс.

детерминации 0,39; $p=0,002$) и цинка на содержание железа (коэффициент детерминации 0,21; $p=0,04$).

Интегральная оценка влияния и зависимости металлов от содержания друг друга в мышцах представлена на рис. 1.

Анализ рис. 1 показывает, что меньше всего влияют на концентрацию в мышцах других металлов железо (его возможное влияние находится в диапазоне до 10% всей вариативности содержания других металлов в мышцах). Среднюю степень влияния имеют кальций и медь (их возможное влияние находится в диапазоне 20-25% всей вариативности содержания других металлов в мышцах). Наиболее выраженное влияние на содержание других металлов в мышцах оказывают цинк, магний и марганец (26-30% вариативности).

В то же время, зависимость меди, марганца и магния от содержания в мышцах других металлов может быть отнесена как средняя (для этих металлов индекс зависимости находится в диапазоне 0,16-0,21 отн.ед.). Более зависимыми можно считать уровни цинка, железа и кальция в мышцах.

Уровень марганца негативно влияет на содержание других металлов в мышечной ткани. Содержание кальция и железа в мышцах существенно зависят от содержания цинка и меди.

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

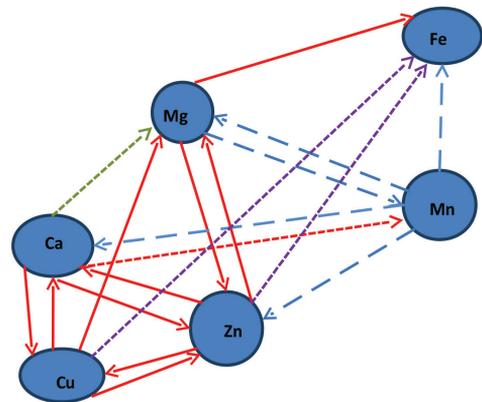


Рис. 2. Граф взаимовлияний металлов на их содержание в мышцах. Обозначения: непрерывная красная линия – влияние по типу усиления, синяя пунктирная линия – влияние по типу конкуренции, зеленая точечная линия – «куполообразный» тип влияния, фиолетовая точечная линия – «чашеобразный» тип влияния.

Выводы

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

Между содержанием марганца в мышцах и уровнем магния, цинка, железа и кальция в этой ткани существуют конкурентные взаимоотношения, которые могут быть объяснены конкуренцией веществ за места связывания в белках тканевых депо.

Меньше всего влияет на концентрацию в мышцах других металлов железо (его возможное влияние находится в диапазоне до 10% всей вариативности содержания других металлов в мышцах). Наиболее выраженное влияние на содержание других металлов в мышцах оказывают цинк, магний и марганец (26-30% вариативности).

Уровень марганца негативно влияет на содержание других металлов в мышечной ткани.

Содержание кальция и железа в мышцах существенно зависят от содержания цинка и меди.

Список литературы

1. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Люблинский С.Л., Капанадзе Г.Д., Шустов Е.Б., Ревякин А.О., Болотских Л.А., Касинская Н.В., Станкова Н.В.* Роль микроэлементов в спортивном питании и безопасности 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. № 2. С. 61-66.
5. *Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонтов Д.А., Касинская Н.В.* Взаимовлияния микроэлементов в печени лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении // Биомедицина. 2014. № 2. С. 73-79.
6. *Хавезов И., Цалев Д.* Атомно-абсорбционный анализ. - Л.: Химия. 1983. 144 с.

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

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

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

Key words: metallochelates, microcells, nuclear and absorbing spectrometry.

Влияние антиоксидантов на морфометрические показатели щитовидной железы разновозрастных крыс в условиях иммобилизационного стресса

А.Л. Ясенявская¹, М.А. Самотруева^{1,2}, С.А. Лужнова²

¹ – ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань

² – ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России, Астрахань

Контактная информация: Ясенеvская Анна Леонидовна, yasen_9@mail.ru

В данной экспериментальной работе изучали влияние антиоксидантов на структуру щитовидной железы разновозрастных крыс-самцов на фоне иммобилизационного стресса. Установлено, что длительная иммобилизация вне зависимости от возраста животных вызывает тиреонегативное действие, снижая высоту тиреоидного эпителия и площадь ядер тироцитов и увеличивая площадь фолликулов и фолликулярного коллоида. Изучаемые антиоксиданты, α -токоферол и эмоксипин, в условиях стресса корректируют морфометрические показатели щитовидной железы всех возрастных групп, увеличивая высоту тиреоидного эпителия и площади тироцитов, снижая площадь фолликулов и фолликулярного коллоида. Следует отметить, что аналог природного антиоксиданта – α -токоферол оказал более выраженное эндокринное действие.

Ключевые слова: α -токоферол, эмоксипин, иммобилизационный стресс, щитовидная железа.

Введение

Одной из важных и сложных осей, оказывающей значительное влияние на разнообразные физиологические функции нашего организма, является гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система. Важное значение для поддержания гомеостаза в организме имеет стресс-ассоциированная модуляция функционального состояния данной оси [1, 7]. Следует отметить, что щитовидная железа является ключевым звеном в данной нейроэндокринной системе, изменения в которой отражают особенности формирования стресс-реакции организма [2-4, 9].

В условиях экспериментального стресса щитовидная железа подвергается

несомненной активации с перспективой истощения при длительном воздействии интенсивного стрессогенного фактора [5]. По мнению И.Г. Акмаева (2003), щитовидная железа среди органов эндокринной системы обладает высокой чувствительностью на разных этапах постнатального онтогенеза к обстоятельствам, требующих мобилизации и перестройки гомеостатических механизмов, а также напряженности процессов компенсации и адаптации.

К настоящему времени накопилось достаточно фактов для высокой оценки роли антиоксидантов в стресс-протекторной защите. В составе антиоксидантных систем, они относятся к эффективным стресс-реализующим си-

стемам, выполняя роль основных мембрано-протекторных и мембрано-стабилизирующих агентов. Предупреждая стрессорные повреждения клеток, они активно участвуют в механизмах адаптации к стрессу [8].

Вышесказанное делает актуальным изучение влияния антиоксидантов на морфометрические показатели щитовидной железы разновозрастных крыс в условиях иммобилизационного стресса, что и явилось **целью** нашего исследования.

Материалы и методы

Исследование проведено на белых беспородных крысах-самцах 3-х возрастных групп: 1,5-2 мес. (массой 75-120 г) – молодые; 6-8 мес. (210-280 г) – зрелые; 20-24 мес. (260-350 г) – старые.

Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Все крысы были синхронизированы по питанию при свободном доступе к воде. Эксперименты проводили в весенне-летний период. Животные были разделены на группы, по 10 особей в каждой: 1-ю группу составляли контрольные крысы, получавшие эквивалент дистиллированной воды; 2-ю группу – животные, получавшие α -токоферол ацетат (10% масляный р-р α -токоферол ацетата «Марбиофарм») per os в дозе 5 мг/кг ежедневно в течение 14 дней; 3-ю группу – животные, получавшие Эмоксипин (1% р-р, «Московский эндокринный завод») в дозе 5 мг/кг внутримышечно в течение 14 дней; 4-ю группу – крысы, подвергнутые воздействию иммобилизационного стресса в течение 14 дней; 5-ю группу – особи, получавшие α -токоферол ацетат («Марбиофарм») per os в дозе 5 мг/кг

и подвергавшиеся воздействию иммобилизационного стресса в течение 14 дней; 6-ю группу – крысы, получавшие Эмоксипин («Московский эндокринный завод») в дозе 5 мг/кг внутримышечно и подвергавшиеся воздействию иммобилизационного стресса в течение 14 дней.

В качестве морфометрических показателей для изучения функционального состояния щитовидной железы были исследованы высота тиреоидного эпителия, площадь ядер, площадь фолликулов, площадь фолликулярного коллоида.

Щитовидные железы после декаптации животных фиксировали в смеси Буэна. После соответствующей проводки железы заливали в парафин с использованием в качестве промежуточной среды хлороформа. Срезы толщиной 5 мкм, ориентированные по длине железы (срединная часть органа), окрашивали по Ван-Гизону [6]. Морфометрию проводили фотографическим способом при общем увеличении микроскопа (Микмед-2) $\times 600$. От каждого животного измеряли по 50 фолликулов. Полученные данные переводились в мкм^2 с помощью объект-микрометра.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США), Biostat 2008 Professional 5.1.3.1. с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия между параметрами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные в ходе изучения морфометрических параметров

щитовидной железы, свидетельствуют о том, что ведение α -токоферола животным, находящимся в условиях физиологического покоя, способствует значительному увеличению высоты тироцитов и площади ядер: у молодых крыс – на 55% ($p < 0,01$) и 35% ($p < 0,05$); у зрелых – в среднем, на 10% ($p > 0,05$); у старых – на 50% ($p < 0,05$) и 20% ($p > 0,05$) соответственно. Площадь фолликулов и фолликулярного коллоида при этом уменьшились, но данные показатели статистически значимыми не являлись.

Под воздействием Эмоксипина тенденции в изменении морфометрических показателей щитовидной железы были тождественны таковым при введении α -токоферола, но несколько ниже по интенсивности в отношении высоты тироцитов и площади их ядер: у молодых, в среднем, на 25% ($p < 0,05$); у зрелых – на 7% ($p > 0,05$); у старых – на 35% ($p < 0,05$) и 5% ($p > 0,05$) соответственно. Снижение как площади фолликулов, так и фолликулярного коллоида не было статистически значимым (рис.).

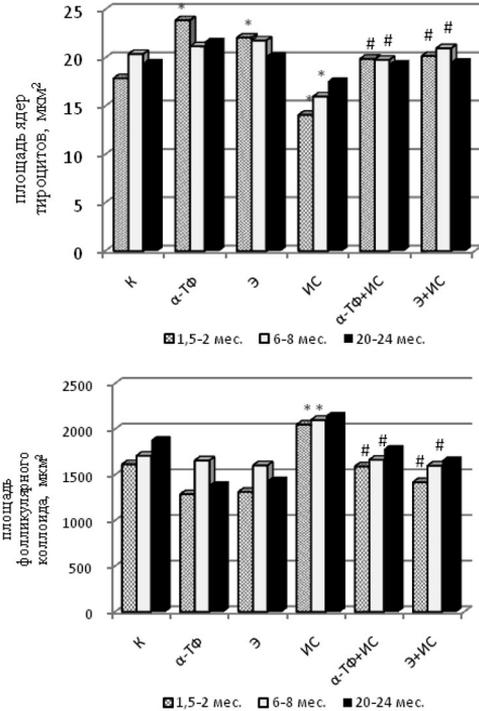
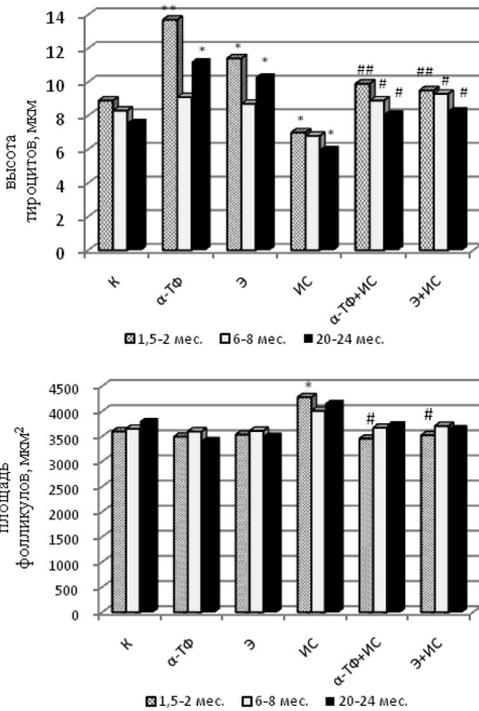


Рис. Влияние антиоксидантов на изменения морфометрических показателей щитовидной железы разновозрастных крыс-самцов в условиях иммобилизационного стресса.

Примечание:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – степень достоверности относительно контроля; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – степень достоверности относительно стрессированных животных (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений);

К – контроль; ИС – иммобилизационный стресс; α -ТФ – α -токоферол; Э – Эмоксипин.

В условиях иммобилизационного стресса у крыс всех возрастных групп наблюдалось угнетение функциональной активности, что проявлялось снижением высоты тироцитов у молодых, старых ($p < 0,05$) и у зрелых особей ($p > 0,05$), в среднем, на 20%; площади ядер тироцитов – на 20% ($p < 0,05$) у молодых и зрелых; на 10% ($p > 0,05$) у старых животных по сравнению со стрессированными животными. Кроме того, наблюдалось увеличение площади фолликулов на 20% ($p < 0,05$) у молодых и на 10% ($p > 0,05$) у зрелых и старых крыс, и площади фолликулярного коллоида, в среднем, на 25% ($p < 0,05$) у молодых и зрелых; и на 15% ($p > 0,05$) у старых особей (рис.).

Введение α -токоферола стрессированным крысам-самцам всех изучаемых возрастов привело к повышению высоты тироцитов, в среднем, на 35% у молодых при $p < 0,01$; у зрелых и старых животных при $p < 0,05$ по сравнению с крысами, подвергшимся стрессированию. В отношении площади ядер тироцитов воздействие α -токоферола по направленности было аналогичным: у молодых на 40% ($p < 0,05$); у зрелых – на 25% ($p < 0,05$) и у старых – на 10% ($p < 0,05$). Площадь фолликулов и фолликулярного коллоида была меньше таковой у опытных животных: у молодых, в среднем, на 20% ($p < 0,05$), у зрелых – на 10% ($p > 0,05$) и 20% ($p < 0,05$) соответственно, у старых – в среднем, на 15% ($p > 0,05$). Относительно контрольных крыс эти показатели были также ниже, но статистической значимости не имели (рис.).

Воздействие Эмоксипина на изучаемые показатели стрессированных животных имело аналогичный характер:

высота тироцитов и площадь их ядер статистически достоверно увеличивались относительно параметров у крыс, подвергшихся стрессу (от $p < 0,05$ до $p < 0,01$). Площадь фолликулов и фолликулярного коллоида были снижены по сравнению с животными, находившимися в условиях стресса; при этом площадь фолликулов была по величине сопоставима с контрольной. Площадь фолликулярного коллоида была снижена, но это снижение не являлось достоверно значимым.

Заключение

Таким образом, результаты исследования активности щитовидной железы на основании изменения морфометрических показателей подтвердили тиреонегативное действие иммобилизационного стресса вне зависимости от возраста животных. Следует отметить, что снижение высоты тиреоидного эпителия и площади ядер тироцитов свидетельствуют, вероятно, об ослаблении транскрипционной и, соответственно, биосинтетической активности железы, а увеличение площади фолликулов, по нашему мнению, говорит об ослаблении реабсорбции тиреоглобулина из коллоида. Последний из-за застоя уплотняется и, как следствие, увеличивается в размере, что продемонстрировано в наших экспериментах.

Изучаемые антиоксиданты – и α -токоферол, и эмоксипин – изменяют морфометрические показатели щитовидной железы у животных всех возрастных групп, увеличивая высоту тиреоидного эпителия и площади тироцитов, снижая площадь фолликулов и фолликулярного коллоида. Наиболее выраженное тиреотропное действие препараты

оказывают на организм, подверженный стрессогенному влиянию, вызывающему угнетение функциональной активности щитовидной железы. Обнаружено сходство в действии аналога природного антиоксиданта – α -токоферола и синтетического – Эмоксипина. Это свидетельствует о проявлении в действии α -токоферола на морфологические показатели щитовидной железы, главным образом, антиоксидантных свойств. Также следует отметить, что, наряду с обнаруженным сходством этих двух антиоксидантов, аналог природного антиоксиданта – α -токоферол оказал более выраженное эндокринное действие.

Список литературы

1. *Акмаев И.Г.* Нейроиммуноэндокринология: истоки и перспективы развития // Успехи физиологических наук. 2003. Т. 34. № 4. С. 4-15.
2. *Александрова Н.В., Замышляев А.В.* Влияние интервальной гипоксической тренировки на состояние эндокринных желез // Вестник Новгородского государственного университета. 2006. № 35. С. 40-41.
3. *Баженов Ю.И., Баженова А.Ф., Горбачева Л.Р.* Физиологические механизмы адаптации к холоду // Бюллетень СО РАМН. 2006. Прил.: Материалы конгресса по приполярной медицине. С. 20.
4. *Капитонова М.Ю., Дегтярь Ю.В., Смирнова Т.С., Кокин Н.И., Шаравевская М.В.* Адаптационные изменения в щитовидной железе при действии физического и психологического стрессоров // Успехи современного естествознания. 2009. № 6. С. 71-72.
5. *Красноперов Р.А., Глумова В.А., Трусов В.В. и др.* Морфофункциональные изменения щитовидной железы при различных вариантах хронического экспериментального стресса // Пробл. эндокринологии. 1992. Т. 38. № 3. С. 38-41.
6. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника / пер. с нем. В. Александров. - М.: Изд-во иностранной литературы. 1953. 718 с.
7. *Смирнова Т.С.* Морфофункциональная характеристика щитовидной железы растущего организма при хроническом стрессе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Волгоград. 2009. 24 с.
8. *Тодоров И.Н., Тодоров Г.И.* Стресс и старение и их биохимическая коррекция. - М.: Наука. 2003. 249 с.
9. *Hangalapura B.N., Nieuwland M.G., Buysse J., Kemp B., Parmentier H.K.* Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses // Poult. Sci. 2004. Vol. 83. № 10. P. 1644-1649.

The influence of antioxidants on the morphometric parameters of the thyroid gland of the different ages rats in the conditions of immobilization stress

A.L. Yasenyavskaya, M.A. Samotrueva, S.A. Luzhnova

In this experimental article was investigated the influence of antioxidants on the structure of the thyroid gland of male rats of different ages in the conditions of immobilization stress. Found that prolonged immobilization, regardless of age of the animals, influences at the thyroid gland, reducing the height of the thyroid epithelium and area of thyrocyte's nuclei and increasing the area of follicles and follicular colloid. Under the conditions of stress antioxidants, α -tocopherol and emoxipine, correct morphometric parameters of the thyroid gland in all age groups, increasing the height of the thyroid epithelium and thyrocyte's area, reducing the area of follicles and follicular colloid. It should be noted that the analogue of the natural antioxidant – α -tocopherol exerted a stronger endocrine effects.

Key words: α -tocopherol, emoxipine, immobilization stress, thyroid gland.



Сравнительный анализ воздействия цитостатических препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster*

О.Н. Антосюк, А.М. Марвин, Н.А. Марвин

Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург

Контактная информация: Антосюк Ольга Николаевна, Antosuk-olga@mail.ru

Морфометрический анализ крыла *Drosophila melanogaster* выявил различные изменения крыловых параметров при воздействии Метотрексатом, Гельданамицином и Митомицином-С, а также сходные изменения при воздействии Этопозидом и Циклофосфаном. При используемой дозе 2 мкг/кг среды повреждения типа «вырезка» на крыле наблюдались только в случае воздействия Метотрексатом. Можно предположить, что именно Метотрексат, Митомицин-С и Гельданамицин вызывают большую геномную нестабильность, судя по косвенным показателям.

Ключевые слова: цитостатики, морфометрический анализ, апоптоз, hobo-элемент.

Введение

Для изучения геномной нестабильности используются различные модельные объекты, в т.ч. и *Drosophila melanogaster* – удобный модельный объект для определения токсического действия различных химических веществ на организм, как на клеточном, так и на организменном уровне.

Особый интерес представляет анализ группы лекарственных препаратов, в т.ч. и цитостатиков. В качестве основных параметров используются средняя индивидуальная плодовитость (СИП), частота встречаемости гибели особей на ранних и поздних этапах эмбрионального развития, в период постэмбрионального развития, а также влияние цитостатиков на уровне соматических клеток крыла. Индуцированная геномная нестабильность вызывается различными стрессовыми факторами, как

физической, так и химической природы. Наибольший интерес представляет собой изучение влияния противораковых лекарственных препаратов, а именно цитостатиков с различными механизмами действия. Большинство исследований посвящено цитостатическим препаратам антиметаболического ряда, таким как Аминоптерин и Метотрексат, в связи с их негативным воздействием на синтез ДНК посредством ингибирования дигидрофолатредуктазы, а также широким применением в практике [5]. В частности, у дрозофилы, помимо негативного влияния на плодовитость и частоту смертности потомства на разных уровнях развития, происходит усиление апоптоза в крыловом имагинальном диске, впоследствии вызывающее наличие повреждения типа «вырезка» на крыловой пластине имаго.

Также интенсивно исследуются воздействия других цитостатических препаратов:

- 1) цитостатики антибиотического ряда (Митомицин-С, Актиномицин Д);
- 2) алкилирующие агенты (Циклофосфан);
- 3) препараты растительного происхождения (Этопозид, Колхицин) [9].

В ряде работ показано, что наблюдается генотоксический эффект цитостатических препаратов, применяемых при различных концентрациях [5].

Также исследуется Гельданамицин – препарат, ингибирующий активность белка теплового шока Hsp90, что, в свою очередь, отражается на уменьшении уровня стрессового ответа клеток [1].

Таким образом, **целью** данного исследования явилось определение геномной нестабильности, вызванной факторами стресса химической природы в линиях дикого типа *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы

В данном исследовании использовались 3 линии дикого типа *Drosophila*

melanogaster: Host (Екатеринбург, 2005), Белгород (Белгород, 2006), Биос-3 (Двуреченск, 2007).

Особь всех 3-х линий содержались в течение всего периода развития на средах, содержащих различные цитостатические препараты в концентрации 2 мкг/кг среды (в исследовании использовалась среда Альдерстона). Данная доза была выбрана для получения достаточного количества материала для морфометрического анализа и анализа жизнеспособности.

В работе использовались цитостатические препараты, различные по механизму воздействия: Метотрексат, Аминоптерин, Митомицин-С, Этопозид, Циклофосфан и Гельданамицин. Для определения степени токсичности препаратов полулетальная доза была определена на Метотрексате (в линиях Биос-3 и Host полулетальная, а в линии Белгород – выше полулетальной, последняя взята для выявления линейных различий), так как только при воздействии данного препарата появлялись повреждения типа «вырезка» на крыле (рис. 1). Остальные препараты исполь-

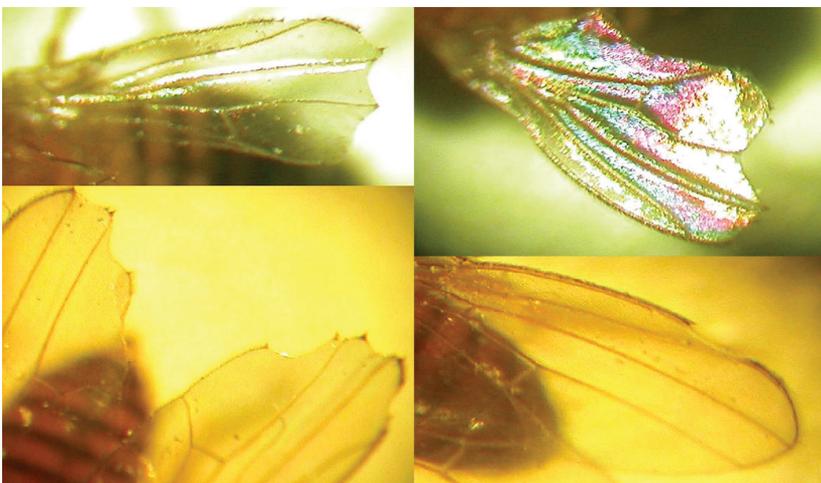


Рис. 1. Варианты повреждений типа «вырезка» на крыле у линий дикого типа *Drosophila melanogaster* после воздействия Метотрексатом в дозе 2 мкг/кг среды.

зовались в аналогичной дозе с Метотрексатом для сравнения.

После вылета имаго, выращенных на среде с цитостатическими препаратами, особи попарно помещались в пробирки, после чего анализировались на жизнеспособность по ряду показателей: средняя индивидуальная плодовитость (СИП), частота встречаемости гибели особей на ранних и поздних этапах эмбрионального развития, а также в период постэмбрионального развития. Все особи анализировались на частоту встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле, а их крылья фиксировались с помощью программы Universal Desktop Ruler.

В работе использовался морфометрический анализ крыла по 18-ти линейным и 6-ти двумерным параметрам крыловой пластины, а полученные результаты анализировались при помощи дискриминантного анализа (Statistica 6.0).

Результаты исследований

Три линии дикого типа (Host, Белгород, Биос-3), выращенные на среде, содержащей цитостатические препараты, продемонстрировали различную степень реакции на химический стресс.

Анализ линий на наличие повреждений типа «вырезка» на крыле показал, что повреждения появляются у особей, выращенных на препаратах, относящихся к группе антиметаболитов, таких как Метотрексат и Аминоптерин. Относительно остальных цитостатических препаратов подобного эффекта выявлено не было.

Концентрация 2 мкг/кг питательной среды были выбрана для получения большего количества жизнеспособных особей, необходимых для анализа плодовитости и морфометрического анализа крыла, а также для выявления линейных различий и различий в токсичности препарата. Несмотря на отсутствие визуального повреждения крыльев, был проведен морфометрический анализ, который позволяет определить изменение линейных и двумерных (S-ячей крыла) параметров после воздействия определенных факторов стресса (рис. 2). Изменение данных параметров происходит за счет перераспределения клеток в крыловом имагинальном диске, увеличения их размера и различной активности компартментов у дрозофилы.

Частота встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле при первичном воздействии Метотрексата состави-

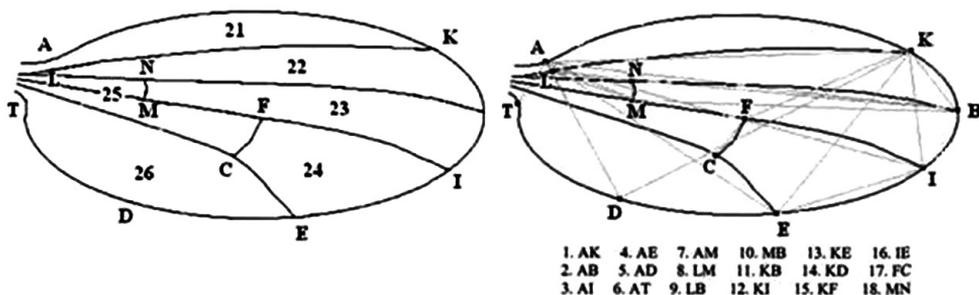


Рис. 2. Схема морфометрического анализа крыловых параметров (справа – линейные, слева – двумерные).

ла в линии Биос-3 11,2%; в линии Белгород – 35,3% и 41,5% в линии Host при концентрации препарата 2 мкг/кг среды. Максимальная частота встречаемости повреждений на крыле в течение селекции на Метотрексате наблюдалась в линии Биос-3 в F2 и составила 73,91%; в линии Белгород в F66 – 72,54%; в линии Host в F16 – 79,44%.

Анализ жизнеспособности (табл. 1) показал, что понижение плодовитости особей всех 3-х линий относительно контрольной группы наблюдается при воздействии Гельданамицином, а также Метотрексатом, за исключением в последнем случае линии Host. К тому же, линия Биос-3 при воздействии Циклофосфаном отвечает не повышением смертности особей на эмбриональном

уровне, а понижением (на всех этапах развития), подобную картину можно отметить и в линии Белгород, но при воздействии Этопозид (повышение частоты встречаемости ранней эмбриональной смертности и понижение частоты встречаемости поздней эмбриональной смертности). Таким образом, чувствительность этих двух линий к вышеуказанным 2-м препаратам только подчеркивает линейные различия и говорит об избирательной чувствительности к различным факторам химического стресса. Также можно отметить, что при воздействии Митомицина-С частота встречаемости эмбриональной смертности особей в линиях Биос-3 и Белгород также уменьшается, чего не наблюдается в линии Host.

Таблица 1
Показатели жизнеспособности линий дикого типа *Drosophila melanogaster* при воздействии цитостатических препаратов Метотрексат, Митомицин-С, Циклофосфан, Этопозид, Гельданамицин в дозе 2 мкг/кг среды

Показатель / Линия - воздействие	СИП (средняя индивидуальная плодовитость)	Частота встречаемости ранней эмбриональной смертности	Частота встречаемости поздней эмбриональной смертности
Биос-3-Контроль	26,99±2,34	3,78±0,89	1,20±0,61
Биос-3-Метотрексат	12,44±1,42	2,52±0,77	1,01±0,26
Биос-3-Митомицин-С	25,59±2,05	1,30±1,04	0,15±0,06
Биос-3-Циклофосфан	10,06±1,85	1,59±0,37	0,54±0,10
Биос-3-Этопозид	21,91±1,71	3,54±0,91	1,19±0,41
Биос-3-Гельданамицин	6,54±1,83	2,92±1,09	0,61±0,23
Белгород-Контроль	34,49±2,77	1,11±0,46	0,73±0,23
Белгород-Метотрексат	21,68±1,62	2,50±0,74	1,84±0,52
Белгород-Митомицин-С	30,58±2,42	0,23±0,22	0,13±0,09
Белгород-Циклофосфан	19,99±1,89	0,75±0,20	0,40±0,11
Белгород-Этопозид	28,36±1,61	4,48±0,85	0,45±0,12
Белгород-Гельданамицин	3,24±0,98	13,94±3,24	0,57±0,22
Host-Контроль	18,74±2,67	3,11±0,92	0,66±0,21
Host-Метотрексат	17,79±2,26	3,70±1,14	0,96±0,36
Host-Митомицин-С	24,40±1,60	0,11±0,09	0,06±0,05
Host-Циклофосфан	15,30±2,20	1,43±0,52	0,06±0,02
Host-Этопозид	23,54±1,73	6,4±1,31	0,59±0,13
Host-Гельданамицин	0,57±0,24	15,20±3,80	0,54±0,38

Воздействие цитостатических препаратов рассматривалось и относительно проявления биологического эффекта на уровне соматических клеток. Как уже указывалось выше, повреждения типа «вырезка» на крыле наблюдаются только при воздействии Метотрексата в дозе 2 $\mu\text{г}/\text{кг}$ питательной среды. Повреждения данного типа возникают как на костальной, так и на внутренней и внешней латеральной части крыловой пластинки (рис. 1). Также биологический эффект цитостатических препаратов, даже в отсутствии повреждений (в зависимости от уровня апоптоза в крыловом имгинальном диске), можно определить, используя морфометрический анализ линейных и двумерных параметров. Таким образом, было установлено, что у всех 3-х линий при воздействии цитостатических препаратов, по-разному воздействующих на генетический материал и обладающих разным биологическим эффектом, двумерные параметры крыловой пластинки (площади ячей крыла) изменяются во всех экспериментах относительно контрольной группы, несмотря на то, что повреждения типа «вырезка» на крыле встречаются только в случае воздействия Метотрексатом. В свою очередь, анализ по линейным параметрам крыловой пластинки показал, что в линиях Биос-3 и Белгород изменяется большое количество параметров, характеризующих как ширину, так и длину крыла: в линии Биос-3 – АК, АВ, АЕ, АД, LB, KB, KE, KF, IE, FC, MN; в линии Белгород – АК, AI, АЕ, АД, АТ, АМ, KE, KF, IE, FC, MN. В линии Host изменению подвергаются такие линейные параметры как АЕ, АТ, KE, KF, FC, NM, и, соответственно, характеризующие ширину крыловой пластинки (рис. 3).

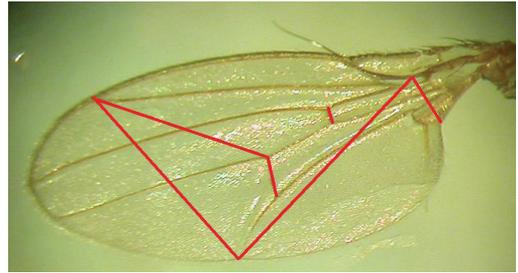


Рис. 3. Схема изменяющихся линейных параметров крыла линии Host при воздействии цитостатических препаратов в дозе 2 $\mu\text{г}/\text{кг}$ среды.

Также был проведен ряд исследований, посвященных пролонгирующему действию Гельданамицина, как на уровне генеративных, так и на уровне соматических клеток. В связи с тем, что Гельданамицин (GA) растворялся в Диметилсульфоксиде (ДМСО), для сравнения приводятся значения, полученные при воздействии Гельданамицина, только для GA+ДМСО и контрольной группы (табл. 2).

Как видно из табл. 2, линии Биос-3 и Белгород характеризуются меньшей чувствительностью к Гельданамицину, чем линия Host, но все линии после воздействия Гельданамицина имеют очень низкую плодовитость и высокую смертность на эмбриональном уровне. В линии Host после добавления в питательную среду ДМСО наблюдалась высокая гибель особей, выживаемость оказалась недостаточной для проведения анализа плодовитости и частоты встречаемости эмбриональной смертности. Также высокая частота гибели имаго наблюдалась в F1 после воздействия Гельданамицина.

Биологический эффект, оказываемый Гельданамицином на уровне соматических клеток, определялся при помощи

Показатели жизнеспособности линий дикого типа *Drosophila melanogaster* при воздействии Гельданамицина (GA) в дозе 2 мкг/кг среды, а также потомства до F2

Показатель / Линия - воздействие	СИП (средняя индивидуальная плодовитость)	Частота встречаемости ранней эмбриональной смертности	Частота встречаемости поздней эмбриональной смертности
Биос-3 Контроль	26,99±2,34	3,78±0,89	1,20±0,61
Биос-3 ДМСО	17,6±1,91	12,51±2,46	1,05±0,27
Биос-3 GA+ДМСО	6,54±1,83	2,92±1,09	0,61±0,23
Биос-3 GA+ДМСО F1	16,97±1,74	1,32±0,87	0,75±0,27
Биос-3 GA+ДМСО F2	25,28±1,68	1,52±0,52	1,09±0,34
Белгород Контроль	34,49±2,77	1,11±0,46	0,73±0,23
Белгород ДМСО	12,10±1,59	8,04±1,56	0,79±0,21
Белгород GA+ДМСО	3,24±0,98	13,94±3,28	0,57±0,22
Белгород GA+ДМСО F1	25,19±1,56	3,27±2,04	1,23±0,64
Белгород GA+ДМСО F2	17,78±1,50	2,02±0,54	0,76±0,26
Host Контроль	18,74±2,67	3,11±0,92	0,66±0,21
Host GA+ДМСО	0,57±0,24	15,20±3,80	0,54±0,38
Host GA+ДМСО F2	30,03±2,39	0,30±0,10	0,19±0,08

морфометрического анализа крыла до F3. В каждой линии проводилось 2 анализа (на уровень тератогенного и пролонгирующего эффекта). В первом случае сравнивались крыловые параметры особей, выращенных на Гельдамицине+ДМСО, на ДМСО, и особей контрольной группы. Во втором случае проводился анализ изменения крыловых параметров особей, выращенных на Гельданамицине, особей из F1, F2 и из F3.

В линии Биос-3 в ряду поколений после воздействия Гельданамицина изменяются крыловые параметры, затрагивающие все крыло; что же касается тератогенного эффекта, то при токсическом воздействии меняются линейные параметры, затрагивающие изменение ширины крыла. В линии Белгород в обоих случаях изменения затрагивают линейные параметры, характеризующие как ширину, так и длину крыла. Изме-

ние же двумерных параметров не наблюдается лишь относительно 21 ячейки в обоих случаях, а также относительно очень большой по площади ячейки 26 в случае анализа на уровень тератогенного эффекта. В линии Host проводился лишь анализ на уровень пролонгирующего эффекта. Он показал изменение параметров, характеризующих ширину крыловой пластинки, а также стабильность ячеек 21 и 22, характеризующих внутренний край крыла.

Обсуждение результатов

Биологический эффект цитостатических препаратов, широко применяемых в практике, исследуется уже длительное время [2, 3, 4]. Из исследованной группы противораковых препаратов наибольшим тератогенным эффектом обладали два цитостатика – Метотрексат и Гельданамицин. Воздействие Метотрекса-

та во всех 3-х линиях на соматические клетки имагинального мезоторакального диска вызывает изменение крыловых параметров относительно контрольной группы. При воздействии же на генеративные клетки тератогенный эффект наблюдается в линиях Биос-3 и Белгород. Частота встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле колеблется в ходе направленной селекции. В линии Биос-3 частота встречаемости повреждений максимальна лишь в самом начале эксперимента, после чего она стабилизируется и держалась практически на одном уровне. Что касается линии Host, частота встречаемости повреждений, наблюдаемая в ходе отбора, всегда была выше, чем в линиях Биос-3 и Белгород. В линии Белгород частота повреждений типа «вырезка» на крыле максимального значения достигла незадолго до гибели всех особей данной линии в ходе направленной селекции. Морфометрический анализ крыла у особей, выращенных на Метотрексате, демонстрирует изменение площадей ячеек крыла у всех 3-х линий и изменение большого количества линейных параметров, затрагивающих как длину, так и ширину крыла.

Таким образом, можно предположить, что Метотрексат, как представитель группы антиметаболитов, интенсивнее влияет на процессы формирования крыла, чем остальные, используемые в данной работе цитостатические препараты, а, соответственно, обладает наибольшим тератогенным эффектом на соматические клетки. Избирательная чувствительность линий к определенным препаратам (Циклофосфану, Этопозиду или Митомицину-С) определяется, предположительно, линейными различиями, базируемыми, по-видимому, на различном количестве

транспозонов, - в частности, Р- и hobo-элементов. Как было показано в работах Георгиева П.Г. (1990 г.), Митомицин-С, введенный в брюшко самцов инъекционным путем, вызывает у потомства перестройки и более высокий уровень мутаций [3]. В свою очередь, Циклофосфан тоже характеризовался ранее как препарат, увеличивающий уровень смертности у дрозофилы [7]. Этопозид же, посредством ингибирования топоизомеразы II, стимулирует всплеск геномной нестабильности, благодаря тому, что активность транспозонов остается без контроля [6, 10]. Таким образом, полученные нами данные о различной реакции линий на вышеуказанные препараты подтверждают предположение о линейных различиях и, соответственно, различной активности и копийности транспозонов, и об изменении этой активности и копийности после воздействия Этопозид, Циклофосфана и Митомицина-С. Возможно, различная чувствительность линий дикого типа к данным цитостатикам обусловлена значительным уменьшением или увеличением копийности hobo- и hobo-подобных элементов уже после первичного воздействия препаратов.

Исходя из данных морфометрического анализа, можно предположить, что препараты Этопозид и Циклофосфан изменяют линейные и двумерные параметры крыловой пластинки в одном направлении (рис. 4-5). Данный эффект наблюдается во всех 3-х линиях. По различным изменениям параметров крыла при воздействии Митомицина-С, Метотрексата и Гельданамицина можно заключить о биологических эффектах данных препаратов, формируемых, по-видимому, за счет различной активности компартментов, а также за счет различной чувстви-

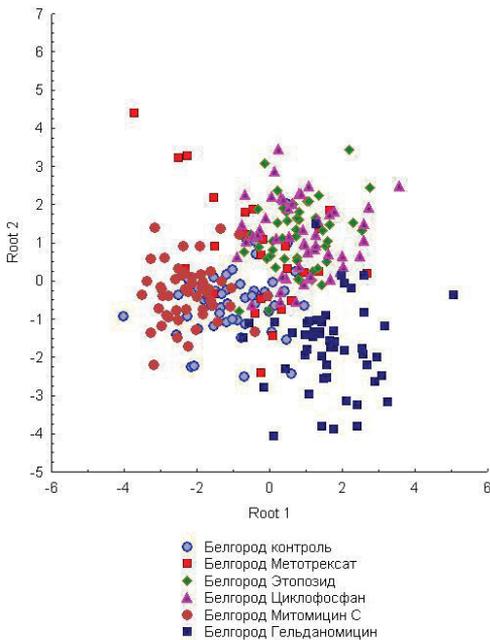


Рис. 4. Графическое отображение дискриминантного анализа линейных крыловых параметров при воздействии цитостатических препаратов в линии Белгород.

тельности к повреждающим агентам.

Особый интерес представляет линия Host, которая наименее чувствительна ко всем исследуемым в данной работе препаратам, как в отношении плодовитости, так и в отношении изменения крыловых параметров. Исключение составляет воздействие на данную линию Гельданамицина, которое вызывает сильный тератогенный эффект. В работах V. Specchia, L. Piacentini, et al. (2010 г.) проводились исследования на дрозофиле с использованием Гельданамицина, который, как известно, подавляет активность белка Hsp90, и было получено множество аномалий после воздействия данного цитостатика [8]. Авторами было высказано предположение о возможном всплеске активности транспозонов благодаря ингибированию Hsp90. Полученные

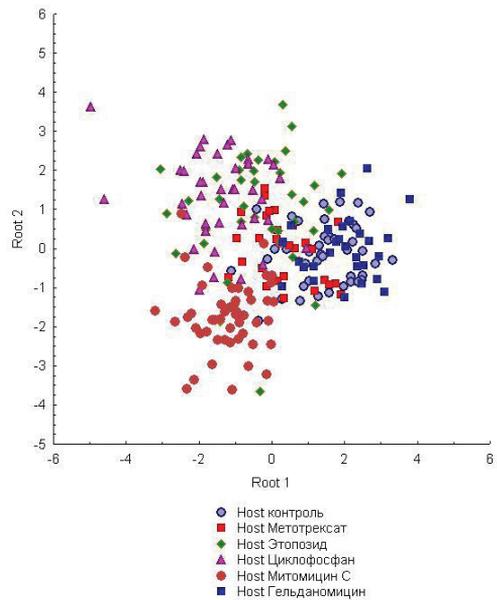


Рис. 5. Графическое отображение дискриминантного анализа линейных крыловых параметров при воздействии цитостатических препаратов в линии Host.

нами данные на всех линиях и, особенно, на линии Host подтверждают выдвинутое авторами предположение.

Морфометрический анализ крыла на всех 3-х линиях установил, что после воздействия Гельданамицина крыловые параметры особей изменяются настолько, что после культивирования в течение 3-х поколений на чистой среде они продолжают отличаться от таковых в контрольной группе. По-видимому, вызванный использованием Гельданамицина всплеск транспозонной активности сохраняется в некоторой степени и при последующей селекции на чистой среде, в отсутствие фактора химического стресса у последующих поколений, о чем также свидетельствует почти 100% гибель особей в линии Host в F1 после воздействия данного препарата.

Выводы

Различная чувствительность к группе цитостатических препаратов, использованных в работе, свидетельствует о наличии линейных различий среди особей дикого типа.

Морфометрический анализ крыла показал, что цитостатики с различным механизмом действия обнаруживают сходный биологический эффект.

Линейные различия в отношении чувствительности к повреждающим агентам, а также активизация транспозонов могут быть прослежены в ходе морфометрического анализа.

Наибольшая активность транспозонов прослеживается на фоне воздействия Метотрексата и Гельданамицина.

Список литературы

1. *Debat V., Milton C.C., Rutherford S., Klinenberg C.P., et al.* Hsp90 and the quantitative variation of wing shape in *Drosophila melanogaster* // *Evolution*. 2006. V. 60. P. 2529-2538.
2. *Depira M., Valente V.L., Margis R., Loreto E.L.* The hobo transposon and hobo-related elements are expressed as developmental genes in *Drosophila* // *Gene*. 2009. V. 448. P. 57-63.
3. *Georgiev P.G., Korochkina S.E., Georgieva S.G., Gerasimova T.I.* Mitomycin C induces genomic rearrangements involving transposable elements in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Gen. Genet.* 1990. V. 220. P. 229-233.
4. *Kim Y.J., Hice R.H., O'Brochta D.A., Atkinson P.W.* DNA sequence requirements for hobo transposable element transposition in *Drosophila melanogaster* // *Genetica*. 2011. V. 139. P. 985-997.
5. *Kislukhin G., King E., Walters K., Macdonald S.* The Genetic architecture of Methotrexate toxicity is similar in *Drosophila melanogaster* and Humans // *Genes/Genomes/Genetics*. 2013. V. 3. P. 1301-1310.
6. *Nahon E., Best-Belpomme M., Saucier J.M.* Analysis of the DNA topoisomerase-II-mediated cleavage of the long terminal repeat of *Drosophila* 1731 retrotransposon // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 218. P. 95-102.
7. *Sadiq M.F., Al-Qurashe F.A.* The effect of trifluoperarine on the induction of sex-linked recessive lethals by cyclophosphamide in *Drosophila melanogaster* // *Drug Chem. Toxicol.* 2004. V. 27. P. 169-178.
8. *Speccha V., Piacentini L., Tritto P., Fanti L.* Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons // *Nature*. 2010. V. 463. P. 662-665.
9. *Tapadia M.G., Lakhota S.C.* Expression of *mdr49* and *mdr65* multidrug resistance genes in larval tissues of *Drosophila melanogaster* under normal and stress conditions // *Cell Stress Chaperones*. 2005. V. 10. P. 7-11.
10. *Torres C., Creus A., Marcos R.* Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cell of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay // *Mutat. Res.* 1998. V. 413. P. 191-203.

The comparative analysis of influence of cytostatic drugs on genome instability of *Drosophila melanogaster*

O.N. Antosyuk, A.M. Marvin, N.A. Marvin

Morphometric analysis of *Drosophila melanogaster* wings revealed various change of wing's parameters at influence by Methotrexate, Haldanamicine and Mytomicine-C, and similar changes at influence by Etoposide and Cyclophosphane. At a used dose of 2 mkg/kg of the environment of damage like "cutting" on a wing were observed only in case of influence by the Methotrexate. It is possible to assume what exactly the Methotrexate, Mitomicine-S and Geldanamicine cause big genomic instability, judging by indirect indicators.

Key words: cytostatics, morphometric analysis, apoptosis, hobo-element.

«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ»:
ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ Х НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

The need for multi-modal and multi-functional measurement systems in laboratory animal research and matrix analysis

Dr. L. Bachdasarian¹; Dr. R. Bulthuis¹; Dr. E. Molenwijk¹; Dr. M. Boscaro²,
Dr. P. Meuth³

¹ – Metris B.V., The Netherlands, 2132 NG Hoofddorp, Kruisweg 829c, www.metris.nl

² – Data Sciences International, St. Paul, USA; www.datasci.com

³ – Institute of Physiology I, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany and Department of Neurology - Inflammatory Disorders of the Nervous System and Neurooncology, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany

Current trends in the Pharmaceutical industry requires new translational approaches for pre-clinical test. Those aspects can be achieved by animal experiments in which not only one variable (e.g. behavior) at the time is analyzed but rather a multidimensional approach (physiology+behavior) is applied. Therefore, automation and integration of different measuring technologies become the crucial aspects in this process.

There are not right Laboratories for real detailed studies of PTSD model. In many cases there are looking one or maximum two parameters simultaneously.

My approach was different and I think for the properly study of PTSD protocol we need to do multi-dimensional analysis. For mice model of Fear Conditioning protocol researchers are used Freezing and Startle behavior:

Important points for researchers!

Freezing is not immobility behavior

Startle is depends of animals (it is something individual)

Behavior definitions

Immobility behavior, if animal don't make positional changes (X,Y changes)

Freezing behavior, if animal makes no any movement

Animal individuality factor is depends of (EEG, EOG,EMG, Sleep, ECG, BP, Temperature)

My proposal was following

Behavior = function {internal stimuli / external stimuli}

or

Behavior = function {constant internal stimulus/ dynamic external stimuli},

if internal factors = constant (we need to keep

it around constant), for study of environmental influences on PTSD.

By system Laboras, freezing behavior is not immobility behavior and Laboras system recognized it separately as Freezing behavior. Laboras system automatically recognize also Startle respond behavior.

PTSD research and Fear Conditioning Protocol:

In this protocol, mouse model is very important. There are two way of measuring fear responses in mice: Startle response and Freezing behavior. Metris BV developed two special algorithms for automated Startle and Freezing detection.

Having an automated detection system is not sufficient at the behavioral level for excluding false results (e.g. short duration sleeping phases → less movement confounded as freezing). Therefore, the behavioral response needs to be integrated and synchronized with physiological parameter (e.g. EEG, ECG, BP, Data sciences Int. The best way to do so would be using Laboras system (for behavioral study), DSI (for Physiological parameter) and Sonotrack (for ultrasounds vocalization study).

LABORAS – system for fully automatic recognition, recording and analysis of the behavior and tracking of small laboratory rodents (rats, mice), based on the analysis of force and energy. SONOTRACK – system for recording, playback and visualization of ultrasounds vocalizations in laboratory animals (15KHz-125KHz).

DSI – system for measuring physiological parameters remotely (without wire measuring pressure, temperature, ECG, EEG, EMG, identification, activity, respiration).

See more information on Metris B.V.
website: www.metris.nl.

Изучение иммунного ответа крыс на введение иммуноглобулинов класса G кролика и свиньи

А.Г. Берзина¹, Н.Б. Гамалея¹, Н.В. Петрова²

¹ – ФГБУ «Национальный Научный центр наркологии» Минздрава РФ, Москва

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

В мировой практике при получении антиидиотипических антител против опасных антигенов в основном используются моноклональные антитела, полученные методом гибридомной технологии на мышах. Помимо этой технологии существует возможность получения поликлональных антиидиотипических антител, используя гетерологичные антисыворотки, т.е. сыворотки от разных видов лабораторных животных. При этом необходимо учитывать степень иммунного ответа на вводимый антиген, представляющий собой иммуноглобулин G другого вида животного. Иммунный ответ может зависеть от степени серологического родства животных. Было показано серологическое родство между иммуноглобулинами класса G человека, свиньи и крысы и отсутствие родства между иммуноглобулинами класса G крысы, кролика и лошади.

Цель настоящего исследования – оценка выраженности иммунного ответа на введение крысам серологически родственного иммуноглобулина класса G (от свиньи) и неродственного IgG (от кролика).

Материалы и методы. Крысы линии Wistar были иммунизированы IgG свиньи (8 животных) и IgG кролика (8 животных) сходным образом. Животным вводили подкожно в 2-3 точки вдоль хребта 3 раза с интервалом в 2 недели антигены в дозе 0,025 мг на крысу. При первой инъекции антигены, растворенные в 0,5 мл физиологического раствора, смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. При двух последующих инъекциях антигены смешивали с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда. Через 7 дней от последней инъекции осуществляли внутривенное введение (в хвостовую вену) такой же дозы антигена, растворенного в 50 мкл физ. раствора. Забор крови (объем 0,5 мл) проводили на 7-й день после последней инъекции антигенов из бедренной вены. Антивидовые антитела в сыворотках крови крыс определяли в «непрямом» ИФА, при котором на твердой фазе сорбировали

IgG свиньи или кролика в раститровке. На следующем этапе в лунки планшета вносили антисыворотки крыс, иммунизированных соответственно IgG свиньи или кролика, а на последнем этапе в лунки вносили антитела к IgG крысы, меченные пероксидазой хрена, коммерческого производства (Sigma). За титр сыворотки принимали конечное ее разведение, при котором оптическая плотность в ИФА превышала фон в 2 раза.

Результаты и обсуждение. Оказалось, что при иммунизации крыс свинным иммуноглобулином G среднегеометрический титр антивидовых антител составил 1:10765, \log_2 титра антител $13,39 \pm 0,89$ (среднее \pm стандартное отклонение). При иммунизации крыс кроличьим иммуноглобулином G по такой же схеме среднегеометрический титр оказался выше и составил 1:76121 (\log_2 титра антител $16,22 \pm 0,89$), различие статистически значимо ($P=0,000$ по критерию Стьюдента; $P<0,06$ по непараметрическому критерию Манна-Уитни). Надо отметить, что при подобной постановке анализа, когда в качестве антигена на твердой фазе используется иммуноглобулин вида животного, серологически родственного виду иммунизированного животного, может наблюдаться высокое значение неспецифической реакции. А именно: когда на твердой фазе сорбирован IgG свиньи, он реагирует с антикрысиным пероксидазным конъюгатом. В этом случае необходимо вычитать из значений оптической плотности для сывороток иммунных крыс значения фона, полученные в реакции с сывороткой неиммунной крысы.

Выводы. Полученные результаты наглядно показывают, что чем меньше серологическое родство иммунизируемых животных и животного-продуцента антигена (иммуноглобулина класса G), тем более высокие титры антител можно получить при прочих равных условиях. При получении антивидовых антисывороток необходимо учитывать серологическое родство иммунизируемых животных для правильной интерпретации результатов ИФА.

Изучение серологического родства иммуноглобулина G человека и некоторых видов лабораторных животных методом иммуноферментного анализа

А.Г. Берзина¹, Н.Б. Гамалея¹, Л.И. Ульянова¹, Г.Д. Капанадзе²

¹ – ФГБУ «Национальный Научный центр наркологии» Минздрава РФ, Москва

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

При создании вакцин к психоактивным веществам необходимо учитывать иммунный ответ на вводимый антиген. Для вакцинации могут быть использованы в качестве антигенов экспериментально полученные иммуноглобулины к тем или иным веществам. В связи с этим, представляет интерес изучение серологического родства или чужеродности различных видов животных, включая человека, в качестве доноров и реципиентов антител, что и явилось **целью** настоящего исследования.

Методы. Иммуноглобулины класса G выделяли из сывороток свиньи, человека, кролика и крысы методом гель-хроматографии на ДЕАЭ-сефадексе А50 по методике, описанной в работе [Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Капанадзе Г.Д., Биомедицина, 2013, № 2, стр. 95-102]. Иммуноглобулины лошади класса G производства фирмы «Sigma». Серологическое родство между иммуноглобулинами G упомянутых видов изучили с помощью «прямого» метода ИФА с использованием антивидовых антител к иммуноглобулинам G свиньи и человека, меченных пероксидазой хрена, коммерческого производства (фирма «Sigma»). При постановке такого ИФА в лунках планшета сорбировали одинаковое и постоянное количество IgG того или иного вида (в концентрации 10 мкг/мл). После сорбции в течение 18 ч при +4°C и последующей отмывки в лунки добавляли антитела к IgG человека или свиньи, меченные пероксидазой хрена.

Результаты. Показано, что в реакциях с гомологичными антителами, т.е. когда IgG человека реагировали в иммуноферментном анализе с антителами против IgG человека, меченными

пероксидазой хрена, наблюдались самые высокие единицы оптической плотности OD₄₉₂, которые были приняты за 100%. Оценка реакций в данной системе ИФА с IgG свиньи, крысы, кролика и лошади выявила наличие перекрестных реакций только с IgG свиньи и крысы (процент перекреста составил соответственно 48,6 и 30,2). Перекрестная реакция с IgG кролика и лошади составила 15,6% и 13,8% соответственно.

В системе ИФА с использованием в качестве пероксидазного конъюгата антител к IgG свиньи отмеченная выше тенденция к перекрестным реакциям сохранялась.

Обсуждение и выводы. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о значительной гомологии между иммуноглобулинами человека, свиньи и крысы [Клюкина В.И., автореф. докт. дисс., г. Щелково, 2002], а также с литературными данными о наличии в молекулах иммуноглобулинов млекопитающих, включая человека, общих эпитопов [Kobayashi K., et al., 1973]. Исследования в области иммунофармакологии показали, что используемые для иммунизации чужеродные сывороточные белки (альбумин, иммуноглобулин G), будучи введенными в организм, изменяют скорость метаболизма аналогичных белков у реципиента. В связи с этим, с целью достижения высокого иммунного ответа, с одной стороны, и предупреждения нежелательных побочных реакций, с другой стороны, на наш взгляд, необходимо осуществлять правильный подбор видов животных, используемых в качестве донора и реципиента иммуноглобулинов класса G в экспериментах по созданию вакцин.

Экспериментальное моделирование невроза

В.Ц. Болотова, В.А. Крауз

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия МЗ РФ», Санкт-Петербург

Экспериментальное изучение невроза проводили на модели хронической невротизации крыс («конфликт афферентных возбуждений»). В качестве стрессоров использовали свет электрической лампочки мощностью 300 Вт, звук электрического звонка интенсивностью 60 Дб и электрический ток пороговой величины. Раздражители подавали в соответствии с программой, составленной Ф.П. Ведяевым. Экспериментальная камера представляла собой прямоугольный аквариум размером 100x100x90 см, сделанный из прочного белого оргстекла (боковая и задняя части) и прозрачного оргстекла (передняя часть). Модель создавали в течение 1 мес., ежедневно помещая животных на 2 ч в условия невротической ситуации.

Оценку тревожности крыс в условиях невротизации проводили в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Крысу помещали в центр установки, которая состояла из крестообразно расходящихся от центральной площадки 4-х рукавов: два противоположных, открытых, без стенок и два закрытых, темных. Эксперименты проводились при обычном освещении в течение 5 мин. В течение эксперимента определяли время, проведенное животными в открытых и закрытых рукавах, число заходов в открытые и закрытые рукава, количество свешиваний и выглядываний с открытого рукава, количество стоек, груминг, время нахождения на центральной площадке, латентный период первого захода в открытый рукав, число мочеиспусканий и дефекаций.

Проведен дисперсионный и корреляционный анализ показателей в отношении контролируемого фактора «продолжительность воздействия». Установлено, что из анализируемых показателей три имеют достоверную статистическую связь с продолжительностью воздействия. Так, количество заходов в затемненный рукав может отражать развитие невротизации, остальные два

– ориентировочная активность и эмоциональная лабильность – процессы адаптации животных к условиям эксперимента. Установлено, что такие показатели как количество заходов и время пребывания в освещенном рукаве, а также ориентировочная активность животных представляют собой тесно взаимодействующую группу показателей, отражающую поведение животных в комфортном состоянии. Количество заходов в затемненный рукав, а также эмоциональная лабильность являются самостоятельными показателями, связанными с продолжительностью воздействия. Показатели груминг и латентный период первого захода в затемненный рукав, время нахождения в затемненном рукаве, время пребывания на центральной площадке являются самостоятельными показателями и не коррелируют ни с продолжительностью воздействия, ни с другими исследуемыми показателями.

При анализе динамики отобранных показателей выявляется фазность поведения животных. Интервал 1-4 день воздействия характеризуется нарастанием эмоциональной лабильности в 1,5-2 раза, снижением количества заходов в затемненный рукав и ориентировочной активности животных на 10-20 и 35% соответственно. Период с 5 по 11 день воздействия характеризуется повышением количества заходов в затемненный рукав на 50%, а также частичным восстановлением ориентировочной активности и снижением эмоциональной лабильности. С 12 дня исследования уровень ориентировочной активности превысил фоновые значения, а эмоциональная лабильность продолжала снижаться.

Установлено, что первая фаза стресса связана с необычными для животных внешними воздействиями, вторая фаза – стадия формирования хронической стресс-реакции, а третья фаза отражает формирование невроза у лабораторных животных.

Получение диагностических антисывороток к морфину на мини-свиньях светлогорской популяции

Н.Б. Гамалея¹, А.Г. Берзина¹, К.А. Шестаков¹, Г.Д. Капанадзе²,
Н.В. Станкова²

¹ – ФГБУ «ННЦ наркологии» Минздрава РФ, Москва

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

В связи с актуальностью проблемы распространённости потребления психоактивных веществ (ПАВ) в России большое значение имеет разработка методов диагностики (как ранней, так и в отдалённые сроки после последнего употребления ПАВ), а также профилактики и лечения зависимости от ПАВ и острых отравлений ПАВ. Во всех перечисленных случаях важную роль могут играть специфические антитела к ПАВ.

Цель работы: изучение возможности получения высокотитражных специфических антител к ПАВ (на примере морфина) на мини-свиньях светлогорской популяции с использованием в качестве антигена суммарного препарата из трех конъюгатов морфина с белком-носителем.

Результаты. Для получения специфических антител мини-свинья была иммунизирована (по 3 инъекции через 14 дней) суммарным препаратом из трех полученных нами ранее конъюгатов реакционных производных морфина (по атомам углерода во 2-ом, 3-ем и 6-ом положениях в фенантроновом кольце молекулы морфина) с белком-носителем – бычьим сывороточным альбумином (БСА). Этими конъюгатами соответственно были: 2(р-карбоксит-фенилазо)морфин–БСА, 3-О-карбоксиметил-морфин–БСА и морфин–6-гемисукцинат–БСА. Контрольная свинья получала инъекции одного конъюгата – 2(р-карбоксит-фенилазо) морфин–БСА в тех же дозировках. В результате проведенного цикла иммунизаций и забора крови из краниальной вены были получены высокотитражные сыворотки к морфину на 14-й и 21-й день после последней инъекции суммарного антигена (титры 1:51200). При использовании в качестве антигена

лишь одного конъюгата титры оказались меньше (1:3200 и 1:6400 соответственно). Титр сыворотки определяли как конечное разведение, при котором значение оптической плотности при 492 нм в ИФА превышало фоновое значение в 2 раза.

Заключение. В литературе последних лет имеются данные о получении кроличьих антител к амфетамину, который также как и морфин является низкомолекулярным соединением (Киселева Р.Ю., 2012). Автором было показано, что полученная в результате работы антисыворотка с титром 1:6400 может успешно применяться для достоверного обнаружения амфетамина в биологических жидкостях человека методом ИФА. В ходе предварительных исследований по получению антител к ПАВ, проводимых в ННЦ наркологии, нами были получены кроличьи антисыворотки к трем ранее синтезированным конъюгатам морфина с БСА. Титр антисывороток варьировал в зависимости от используемого антигена от 1:12800 до 1:25600. В настоящей работе в результате иммунизации мини-свиньи суммарным препаратом трех конъюгатов морфина с БСА был достигнут лучший результат. Титр антител к морфину в антисыворотке свиньи составил 1:51200.

Выводы. Мини-свиньи светлогорской популяции могут быть использованы в качестве продуцентов антител к ПАВ наряду с кроликами. Выделенные из антисывороток антитела к морфину можно использовать в дальнейшем в диагностических целях, а также в экспериментах по пассивной иммунизации (к примеру, для лечения отравлений ПАВ). Иммунные свиньи могут служить биомоделью при изучении эффективности вакцин от наркотиков.

Морфологический анализ нейропротекторной активности ноотропов и их комбинаций с мелаксеном при экспериментальной ишемии головного мозга

Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин

ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, Ростов-на-Дону

Для полноценного анализа патологических изменений в органах и тканях животных, подвергшихся воздействию различных повреждающих факторов, в том числе ишемических, а также в целях объективной оценки нейропротекторной активности лекарственных препаратов (ЛП), обязательным является проведение комплексного структурного и ультраструктурного анализа.

Цель исследования. Изучить посредством световой и электронной микроскопии эффекты пирacetama, винпоцетина, мелатонин-содержащего ЛП – мелаксена и их комбинаций на модели ишемии головного мозга (ИГМ) у крыс.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 21 крысе-самце массой 250–300 г. За 14 дней до моделирования ИГМ животные были разделены на 2 группы контроля (ложнооперированные и подвергшиеся ИГМ (гр. ИШ)), получавшие физиологический раствор в дозе 0,2 мл/сут внутривенно (в/в), и 5 опытных гр., которым производилась ИГМ путем двухсторонней окклюзии общих сонных артерий (ОСА) по окончании 2-х недельного курса введения изучаемых ЛП: мелаксена в дозе 0,25 мг/кг/сут в/б; пирacetama в дозе 300 мг/кг/сут в/б и винпоцетина в дозе 5 мг/кг/сут в/б, а также их комбинаций с мелаксеном. 24 ч спустя после ИГМ выжившие крысы подвергались эвтаназии, и осуществлялся забор материала (образцов лобной коры ГМ и гиппокампа) для морфологического исследования.

Результаты. При изучении микро- и ультраструктуры ГМ крыс, подвергшихся ишемии, было установлено, что степень повреждения клеток была максимальной у животных гр. ИШ. В частности, были отмечены выраженные дистрофические и дегенераторные изменения нервных клеток, а наиболее чувствительными к ишемии оказались пирамидные клетки 3-го слоя коры ГМ и СА1-поля гиппокампа, где регистрировалось не только большее число поврежденных нейронов, но и более глубокая степень их повреждения.

Кроме того, нарушалось и структурно-функциональное состояние гемато-энцефалического барьера. В целом, в сосудах микроциркуляторного русла преобладали признаки замедления и даже полного выключения кровотока.

Применявшиеся в эксперименте ЛП в той или иной мере продемонстрировали свое протекторное действие, что проявилось в уменьшении количества ишемически-гомогенизированных пирамидных нейроцитов в коре и гиппокампе, по сравнению гр. ИШ.

Наименьшая степень повреждения ткани после ИГМ отмечалась у животных гр. винпоцетин+мелаксен. Свидетельством тому была не только сохранность структурных характеристик тканевых элементов нервной системы, но и заметное снижение гетероморфности нейронов (изменение выраженности гиперхроматоза их ядер и цитолиза) с сопутствующей стимуляцией их функциональной активности, увеличением количества и/или объема ядрышек, улучшение кровоснабжения ГМ за счет увеличения количества функционирующих тонкостенных сосудов и улучшения гемореологии. На основании результатов морфометрического анализа в этой гр. можно было достоверно констатировать соответствующее норме соотношение между основными клеточными элементами нервной ткани – нейронами и глиоцитами – ключевого интегративного показателя, характеризующего тип структурно-функциональных взаимоотношений в ЦНС.

Выводы. Результаты комплекса проведенных морфологических методов исследования (светового, ультрамикроскопического, морфометрического анализа) позволяют верифицировать наличие у исследуемых ЛП на модели ИГМ, вызванной необратимой перевязкой ОСА у крыс, различной степени выраженности нейропротекторной активности, наиболее всего проявляющейся у комбинации винпоцетина с мелатонин-содержащим ЛП – мелаксеном.

Динамика физиологических показателей после физической нагрузки у спортсменов в покое и во время электросна

А.А. Емельянов¹, А.Е. Пыкова¹, Е.Б. Шустов², Ю.А. Чудина¹,
Д.Б. Чайванов¹

¹ – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

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

Электросон, согласно классическим представлениям, рассматривается как состояние физиологического сна, искусственно создаваемое с помощью электрического тока. Экспериментально было показано, что динамика показателей, отражающих функционирование и уровень активности организма, соответствует изменениям этих показателей во время сна. На основе результатов наших исследований было продемонстрировано, что физиологические показатели у спортсменов во время электросна соответствуют скорее состоянию активного бодрствования, чем сна.

Эксперимент состоял из трех серий, первая и последняя серии длились по 5 мин, продолжительность второй серии составляла 15 мин. Во время второй серии испытуемые, в качестве которых выступали 5 спортсменов мужского пола, подвергались воздействию электрического тока с помощью бытового прибора «Электросон – ЭГСАФ-01» глазнично-затылочным способом. Первая серия была подготовительной, во время нее испытуемых просили расслабиться и сидеть с закрытыми глазами. Последняя серия состояла в прекращении воздействия электрическим током, что было связано с пробуждением испытуемых. Вторую серию разделили на три этапа и из трех серий получили пять равных по времени этапов.

На протяжении всех трех серий эксперимента у каждого испытуемого фиксировали физиологические показатели дыхательной деятельности с помощью двух дыхательных датчиков верхнего и нижнего дыхания в составе аппаратно-программного комплекса «РЕАКОР». В результате обработки записанных данных были получены следующие показатели: частота (ЧД), условный минутный объем (УМОД), условная амплитуда (УАД) и длительность цикла (ДЦ) для верхнего (дополнительный индекс В) и нижнего дыхания.

Путем сравнительного анализа показателей дыхания на основе критерия Манна-Уитни отобрали схожие по всем испытуемым показатели,

среди которых оказались: ЧДВ, УМОДВ и ДЦВ, которые усреднили.

При рассмотрении динамики частоты верхнего дыхания было показано, что ЧДВ постепенно уменьшается при переходе от одной серии исследования к другой. Динамика ЧДВ между тремя этапами второй серии практически отсутствует. Усредненные значения ЧДВ варьируют в пределах от 44 до 51 удара в минуту, что соответствует активному функциональному состоянию.

УМОДВ при переходе к начальному этапу электросна из состояния покоя несколько снижается, затем на 2 и 3 этапах второй серии увеличивается, а при пробуждении снижается примерно на 10 мм/мин. Изменение УМОДВ в процессе электросна составляет около 3% от максимального значения этого показателя. Продолжительность цикла верхнего дыхания постепенно увеличивается при переходе от спокойного состояния к электросну и на всех этапах электросна, снижается при пробуждении. Значения показателей УМОДВ и ДЦВ, полученные в данном исследовании, соответствуют показателям состояния бодрствования. Значения ДЦВ на последнем этапе электросна достигает почти 1,9 сек и незначительно снижается при пробуждении. Такая динамика указывает на отсутствие удлинения дыхательного цикла, характерное для состояния сна. Изменения всех этих показателей оказались статистически незначимыми (на основе Т-критерия), что указывает скорее на их случайные флуктуации, чем на достоверную динамику, которая может использоваться как признак функционального состояния.

Проведенный эксперимент следует считать пилотным в связи с ограниченностью выборки испытуемых. Применительно к данной группе спортсменов можно сделать вывод, что во время электросна верхнее дыхание не изменяется по сравнению с предыдущим и последующим периодами спокойного бодрствования.

Средства народной медицины Тувы как источник сырья для препаратов актопротекторного действия

С.В. Козин, Н.Р. Чехани, Л.А. Павлова

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, НИИ Фармации, лаборатория биологически активных соединений, Москва

В качестве потенциального источника БАВ для создания эффективных и безопасных фармакологических препаратов рассматривается арсенал средств, издавна используемый в народной медицине. В течение ряда последних лет в сферу научных интересов нашей лаборатории входит изучение средств, применяемых в практике народной медицины Республики Тыва (Тува). В этномедицине Тувы можно выделить три основных направления: лечение растениями у тувинцев (народная медицина), дошедшие до настоящего времени прописи тувино-тибетской медицины и лечение растениями старообрядцев.

Одним из средств, применяемых старообрядцами с целью оздоровления, является растительный сбор, состоящий из равных частей листьев смородины черной, листьев малины обыкновенной, травы Иван-чая, травы лабазника вязолистного. Этот сбор был назван нами СМИЛ. Известно, что сырьё этих растений содержит богатый набор БАВ, например: фенолы, флавоноиды, антоцианы, кверцетин, кемпферол, гиперозид, афцелин, астрагаллин, рамнозидкемпферола, кумарины, тритерпены, дубильные вещества, различные органические кислоты, макро- и микроэлементы и многие другие. Значительное место среди веществ, содержащихся в компонентах сбора, занимают соединения с антиоксидантной активностью. Поэтому при изучении фармакологических свойств СМИЛ, в первую очередь, были исследованы его антиоксидантные свойства. Водные извлечения из травы таволги вязолистной, травы кипрея узколистного, листьев малины обыкновенной и листьев смородины чёрной проявили высокую антиоксидантную активность (АОА) в условиях *in vitro* (метод хемилюминесценции, модельная система АБАП-люминол). Их АОА в «тролоковом эквиваленте» составила соответственно: 1,33; 0,72; 0,62 и 0,36. СМИЛ проявил отчётливые антиоксидантные свойства и *in vivo* на модели острого тетрахлорметанового гепатита у крыс. Профилактическое 2-недельное применение настоя СМИЛ тормозило

развитие оксидативного CCl_4 -индуцированного стресса: полностью предупреждалось снижение АОА печёночной ткани заправленных животных и уменьшалось содержание малонового диальдегида в ней на 12%. Известно, что антиоксиданты способны проявлять актопротекторное действие, которое связывается с торможением ими развития оксидативного стресса, вызываемого физическими нагрузками. В связи с этим, нами было изучено актопротекторное действие 2-х препаратов на основе сбора СМИЛ (настоя из него и сухого экстракта) на модели повторного плавания мышей с грузом в 7% от массы тела.

В ходе эксперимента было обнаружено, что предварительное 3-недельное применение обоих препаратов на основе сбора СМИЛ не влияло на продолжительность первичного плавания мышей по сравнению с контрольной группой. После часового восстановительного периода у контрольных животных не наблюдалось полного восстановления физической работоспособности. Об этом свидетельствует тот факт, что продолжительность их повторного плавания составила 67,5% от продолжительности первичного плавания ($p < 0,05$). В то же время, у животных, получавших настой сбора СМИЛ и сухой экстракт из сбора СМИЛ, при повторном плавании был зарегистрирован практически тот же результат, что и при первичном плавании, и даже некоторая тенденция к его увеличению. Важно, что продолжительность повторного плавания у мышей, получавших настой и экстракт СМИЛ, была выше, чем у мышей контрольной группы, в 1,7 и 1,8 раз соответственно ($p < 0,001$). Таким образом, препарат СМИЛ обнаружил отчётливую способность повышать эффективность восстановительных процессов после физических нагрузок, т.е. актопротекторные свойства. Это проявилось в повышении продолжительности повторного плавания мышей почти в 2 раза по сравнению с контрольными животными. Актопротекторное действие СМИЛ, по-видимому, связано с его высокой антиоксидантной активностью.

Анализ влияния вальдоксана и комбинации флуоксетина с мелаксеном на распределения ЭЭГ-ритмов у крыс с экспериментальной депрессией

О.М. Куделина, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, В.Г. Заика

ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и клинической фармакологии, Ростов-на-Дону

В связи с большой распространенностью депрессий в общемедицинской практике ныне крайне остро стоит проблема объективной оценки эффективности проводимой антидепрессивной терапии. Эта проблема актуализируется появлением на фармацевтическом рынке новых лекарственных препаратов (ЛП) из ряда антидепрессантов, а также возникновением новых тенденций в области фармакотерапии депрессий, в частности, основанных на включении в схему фармакотерапии депрессий ЛП гормона эпифиза мелатонина.

Цель исследования состояла в сравнительном изучении влияния мелатонин-содержащего ЛП мелаксена в комбинации с антидепрессантом из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина – флуоксетином и нового антидепрессанта вальдоксана, являющегося агонистом мелатониновых МТ1 и МТ2, а также антагонистом 5-HT2c-рецепторов, на биоэлектрическую активность головного мозга (ГМ) крыс с экспериментальной депрессией (ЭД).

Материалы и методы. Эксперименты проводились на 90 белых крысах-самцах массой 150-200 г, распределенных на 3 группы по 30 животных в каждой – контрольную (Д) и 2 опытные – группу Ф+М, получавшую флуоксетин (Ф; 0,3 мг/кг/сутки per os) с мелаксеном (М; 0,05 мг/кг/сутки per os) и В, получавшую вальдоксан (В; 0,5 мг/кг/сутки per os). Во всех группах посредством пролонгированного, на протяжении 4-х недель, воздействия стрессорных факторов (иммобилизация, водно-иммерсионный холодовой стресс, световая экспозиция) моделировалась ЭД. Предварительно крысам симметрично в область гиппокампа (ГК) и соматосенсорной коры (ССК) вживлялись микроэлектроды. Регистрацию биоэлектрической активности ГМ крыс производили с помощью энцефалографоанализатора ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» (Россия) 2-хкратно – до и на 14 сутки после начала введения ЛП. Анализировали показатели относительных значений мощности (ОЗМ, %)

для Δ (дельта) - (1-4 Гц), θ (тета) - (5-7 Гц), α (альфа) - (8-12 Гц) и β (бета) - (13-30 Гц) частотных диапазонов.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что по сравнению с нормой, характеризующейся доминированием в ГМ крыс θ -ритма над всеми остальными, при ЭД происходит перераспределение ритмической активности в пользу Δ -ритма, главенствующее положение которого обуславливается, в том числе, достоверным снижением активности θ -ритма. Применение же при ЭД изучаемых ЛП сопровождается тенденцией к нормализации электрической активности ГМ. Так, в группе В ОЗМ Δ -ритма уменьшалось по сравнению с ЭД с $58,99 \pm 0,83\%$ и $52,80 \pm 1,02\%$ до $14,43 \pm 0,57\%$ и $13,90 \pm 0,82\%$ в ГК и ССК соответственно ($p < 0,05$), а θ -ритм, наоборот, возрастал – с $29,27 \pm 0,65\%$ и $35,34 \pm 0,39\%$ до $68,28 \pm 1,65\%$ и $63,46 \pm 0,71\%$ соответственно в ГК и ССК ($p < 0,05$). Изменения 2-х основных ритмов были сопряжены с существенным увеличением ОЗМ β -ритма в области ССК на фоне применения В – до $16,95 \pm 0,67\%$ по сравнению с $6,24 \pm 0,36\%$ в группе Д. В тот же промежуток времени на фоне введения комбинации Ф+М нами отмечалось достоверное снижение Δ -активности: в ГК – в 1,9 раза (до $30,93 \pm 1,01\%$; $p < 0,05$) и в ССК – в 1,8 раза (до $28,14 \pm 1,18\%$; $p < 0,05$). θ -ритм примерно во столько же раз повышался, достигнув $49,07 \pm 0,75\%$ и $47,11 \pm 0,91\%$ ($p < 0,05$) соответственно в ГК и ССК. Параллельно с этим, более чем в 2 раза увеличивалась β -активность как в ГК (с $6,13 \pm 0,92\%$ до $13,13 \pm 0,70\%$), так и в ССК, где она была зарегистрирована на уровне $17,82 \pm 0,86\%$.

Выводы. Полученные в ходе исследования данные позволяют констатировать наличие и у вальдоксана, и у комбинации флуоксетин + мелаксен способности нормализовывать нарушенную при ЭД электрическую активность ГМ, причем, судя по нашим результатам, действие вальдоксана в этом плане выражено в большей степени.

Изучение острой токсичности нового препарата ионизированного серебра

Н.С. Пономарь, Ю.С. Макляков, З.С. Саядова

ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, Ростов-на-Дону

Лидирующие на рынке дезинфицирующих средств композиционные средства на основе хлорсодержащих, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) отличает ограниченный спектр противомикробной активности, наличие «отрицательного» моющего эффекта, быстрое формирование резистентности у микроорганизмов. В связи с этим, актуальным является поиск высокоактивных антимикробных средств, которые бы отличал широкий спектр действия и безопасность. В этом плане с самой выгодной стороны зарекомендовали себя дезинфектанты на основе ионизированного серебра, которые, по сравнению с ЧАС, сохраняют активность в течение гораздо более длительного срока, не оказывают раздражающего действия на кожу и слизистые оболочки, не обладают сенсibiliзирующими и кожно-резорбтивными свойствами, не приводят к развитию устойчивости у микроорганизмов, могут подавлять патогенную микрофлору, резистентную к широко применяемым химиотерапевтическим средствам, и, по предварительным данным, относятся к веществам 4-го класса токсичности.

Цель исследования состояла в экспериментальном анализе острой токсичности нового препарата ионизированного серебра (ПС) производства НИИ «Градиент» (Ростов н/Д).

Материалы и методы. Исследования проводились на 160 белых крысах массой 130–150 г. Оценивалась острая токсичность ПС при 1-кратном и дробном введении животным через короткие интервалы времени (3–6 ч) в течение суток на основе исследования показателей поведенческих, нервно-мышечных и вегетативных реакций. ПС вводили в организм через зонд в желудок (после разведения) и внутрибрюшинно. Для определения острых токсических доз использовался точный раствор ПС с концентрацией ионов серебра 200 мг/л (в 4.000 раз выше ПДК ионов серебра в водопроводной воде). Продолжительность наблюдения за животными составляла 2 недели, в 1-ые сутки после введения наблюдение было непрерывным. Все животные были разделены на 16 контрольных и опытных групп по 10 крыс

(5 самок и 5 самцов) в каждой, в зависимости от вида вводимого раствора – физиологического (контрольные группы) или рабочего раствора ПС (опытные), а также режима дозирования (пути и кратности введения, концентрации ионов серебра и объема раствора). Курсовая доза ионов серебра в исследуемых растворах колебалась от 4 до 32 мг/кг.

Результаты. В процессе наблюдения за животными вне зависимости от пути введения ПС в 1-е сутки эксперимента животные сохраняли повседневную моторную активность, были подвижны, координация движений была сохранена, изменений волосяного покрова не наблюдалось, тонус скелетных мышц нарушен не был, реакция на болевые, звуковые и световые раздражители была сохранена, акты мочеиспускания и дефекации не нарушены, визуальных изменений по сравнению с контрольными группами не отмечалось.

В последующие 2 недели каких-либо четких визуальных отличий от контрольных групп в процессе наблюдения не отмечалось. Двигательная активность, подвижность крыс по сравнению с контрольными группами были неизменны, волосяной покров – гладкий, лоснящийся, выпадения шерсти не наблюдалось. Координация движений была сохранена, реакция на болевые, звуковые и световые раздражители не нарушена, вес животных соответствовал таковому в группах контроля, диурез в пределах нормы.

Ни в одной из контрольных, либо экспериментальных групп ни в 1-ые, ни в последующие сутки наблюдения случаев гибели животных зафиксировано не было.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии какого-либо влияния даже максимально возможных доз исследуемого ПС на поведенческие, нервно-мышечные и вегетативные реакции у крыс, а также летальность животных как при энтеральном, так и парентеральном введении. LD50 ПС в связи с этим установить не представляется возможным, а сам исследуемый ПС следует отнести к категории малотоксичных и безопасных.

Гидробионты – альтернативные биомодели

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

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

² – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

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

За последние десятилетия использование рыб в качестве биомоделей значительно увеличилось. Относительно восприятия болевых импульсов у рыб ведутся дебаты, однако большинство авторов склонны считать, что у рыб понижен болевой порог чувствительности.

Целью настоящих исследований являлось моделирование патологии паренхиматозных органов: поджелудочной железы и печени у рыб и гепатопанкреаса речных раков.

В качестве объекта нами выбраны двухлетки карпа (*Cyprinus carpio* L.), выращенные в аквариальных условиях с фазы сеголеток. А также 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* с новых

образцов, без маркировки. Патология гепатопанкреаса речных раков вызывалась введением 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. Из паренхиматозных органов готовились гистологические срезы окрашивались гематоксилин-эозином. Препараты изучали методом цифровой микроскопии. На всем протяжении эксперимента (53 дня) гибели исследуемых сеголетков карпа (с введенным аллоксаном) не наблюдалось. Гистологические исследования показали разрушение структуры островков Лангерганса.

Выводы

Введение аллоксана вызывает нарушение структуры островков Лангерганса в поджелудочной железе рыб. В печени карпа встречаются участки, обнаруживающие практически полную дегенерацию большей части гепатоцитов.

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* по 15 г/кг 7-кратно в течение 14 дней у молоди карпа вызывает нарушения как на органном, так и на клеточном уровне. Действие препарата усиливается смешиванием с 50% спиртом.

Методика ритмической электростимуляции подкорковых структур головного мозга и измерение физиологических маркеров функционального состояния кролика

А.Е. Пыкова, А.А. Емельянов

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Электросон – метод электротерапии, при котором используются низкочастотные токи прямоугольной формы, малой силы и напряжения. Перед нами стояла задача отработать методику электростимуляции головного мозга кролика и снятия его периферических показателей.

Для этого была проведена серия экспериментов, состоящих из нескольких этапов. На первом этапе снимались фоновые показатели с кроликов в спокойном состоянии, на втором кролику давали нагрузку и переводили в возбужденное состояние, на третьем снимались фоновые показатели с кроликов в возбужденном состоянии, затем проводили электростимуляцию, и в конце снова снимались фоновые показатели. Продолжительность фоновых промежутков составляла 5 мин, электростимуляция длилась 15 мин.

Электростимуляция проводилась при помощи бытового прибора «Электросон – ЭГСАФ-01» на частоте 5 Гц при токе 1-2 мА. Для эффективной электростимуляции нами были изготовлены головная маска с возможностью изменения размера для точечной фиксации электродов; глазные электроды были вырезаны из свинцовых пластин, затылочный был сделан из проводящей

резины; электроды были спаяны вместе для подключения к прибору и закреплены на маске. Для улучшения проводимости затылок кроликов был выбрит, а шерсть и обернутые марлей электроды были обильно смочены 0,9% раствором хлорида натрия.

На протяжении всего эксперимента у кроликов снимались сердечные и дыхательные показатели с помощью датчиков электрокардиограммы, которые крепились на выбритые лапы кролика при помощи самодельных манжетов; фотоплетизмограммы, который крепился на ухо; и дыхательного датчика в составе аппаратно-программного комплекса «РЕАКОР». Исключение составляла стадия электростимуляции, в течение которой не удалось снять данные электрокардиограммы. В остальных стадиях (без стимуляции), несмотря на нестандартный метод снятия показателей, удалось получить качественную картинку электрокардиограммы.

В ходе эксперимента были получены данные, подтверждающие, что во время стимуляции кролик переходил в сонное состояние. Также была отработана методика, с помощью которой будут проводиться дальнейшие эксперименты по изучению головного мозга кролика.

Математическое моделирование сердечно-сосудистой системы для исследования гемодинамики, физико-механики и электрофизики миокарда новой топологии

А.С. Самойлов, Ю.А. Арутюнов

ФГБУЗ ЦСМ ФМБА России, Москва

Недавно в мире двумя независимыми группами ученых были опубликованы результаты исследований, приведших к открытию новой топологии миокарда сердца в виде листа Мебиуса.

В связи с этим, появилась необходимость в новой парадигме в моделировании ССС, основанной на новой топологии миокарда сердца в виде листа Мебиуса и синергетике между биомеханикой сокращений мышц сердца, биохимией и механикой течения крови в эластичных сосудах в тесном взаимодействии с электропроводящими процессами, обеспечивающими регулирование процессов в сердечно-сосудистой системе в целом. Новые представления о строении миокарда ставят вопрос о дальнейшем изучении топологии всей кровеносной системы и ее соединении с сердцем.

Применяемая в настоящее время модель гидродинамики сердечно-сосудистой системы основывается на омической связи потока крови и перепада давления. Такая модель не учитывает возможность разных режимов течения крови. Таким образом, оптимизация режима течения крови в сердечно-сосудистой системе такой моделью описываться не может. Описание оптимизации режима течения крови требует усложнения модели путем учета гидромеханических характеристик сердечно-сосудистой системы.

Методы моделирования сердечно-сосудистой системы, используемые в настоящее время, должны быть критически осмыслены и принципиально пересмотрены в связи с необходимостью включения в моделирование новых топологических особенностей глобальной сердечно-сосудистой системы.

Также необходимо создание модели, описывающей физико-механические и электрофизические процессы, происходящие в сердце, которая включает комплекс аппаратных, программных и информационных средств.

При моделировании мы будем использовать системно-синергетический подход к моделированию сердечно-сосудистой системы, учитывающий синхронизацию между различными процессами, формирующими электробиомеханику ее функционирования и открытие новой топологии миокарда сердца в виде листа Мебиуса, который обеспечит более адекватные локальные и нелокальные характеристики, близкие к результатам физиологических экспериментов и клинических наблюдений.

Исследования проводятся по грантам «РФФИ». Номера проектов по этой теме: №14-07-00466, №14-07-00468, №14-07-00474.

Гармонизация подхода к нормированию остаточных органических растворителей в лекарственных средствах и вспомогательных веществах

О.И. Терёшкина, Т.А. Гуськова, Г.В. Раменская

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава РФ НИИ фармации, Москва

Остаточные органические растворители представляют собой токсикологически значимые примеси лекарственных средств и вспомогательных веществ, которые, не являясь действующим или вспомогательным веществом, являются частью состава лекарственного препарата, применяемого пациентом. Показатель «Остаточные органические растворители» – один из обязательных современных критериев оценки качества лекарственных средств. Органические растворители имеют различные классы токсичности и должны удаляться по возможности полностью в процессе производства, поскольку они не обладают терапевтическим эффектом. Безопасность состава лекарственного препарата зависит от класса токсичности органического растворителя и степени его удаления в процессе производства. Содержание остаточных органических растворителей в лекарственных препаратах не должно превышать норм, установленных данными по безопасности. Нормирование данного вида примесей как значение предела их допустимого содержания включено в общую фармакопейную статью «Определение остаточных органических растворителей» в раздел «Испытание на предельное содержание примесей» действующего издания отечественной фармакопеи. К сожалению, информации, включенной в данную фарма-

копейную статью, не всегда бывает достаточно, чтобы оценить безопасность лекарственного препарата с точки зрения содержания той или иной примеси органических растворителей. Для этой цели при проведении исследований по стандартизации и экспертной оценке лекарственных средств приходится использовать и материалы по нормированию, включенные в Европейскую Фармакопею (EP) и Фармакопею США (USP). С целью разработки гармонизированного документа был проведен сравнительный анализ подходов к нормированию остаточных органических растворителей, включенных в действующее издание отечественной фармакопеи, EP и USP, а также их официальных переводов на русский язык. Как показали результаты анализа, объем информации, включенный в указанные зарубежные фармакопеи, значительно превышает объем информации отечественной фармакопейной статьи и содержит, наряду с директивными указаниями, информацию рекомендательного, разъясняющего и концептуального характера, что является важным при стандартизации лекарственных средств. На основании проведенных исследований предлагается структура нового фармакопейного документа с учетом международного уровня требований к нормированию остаточных органических растворителей.

Микро-РНК как объект фармакологических воздействий

Е.Б. Шустов¹, Д.Ю. Ивкин²

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

² – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» МЗ РФ, Санкт-Петербург

Одним из ярких открытий начала века стало изучение свойств и биологического эффекта нового класса соединений – микроРНК, играющих важную роль в регуляции активности генов и их продуктов на посттранскрипционном уровне. МикроРНК способны связываться с полимеразами НК (как ДНК-зависимыми, так и РНК-зависимыми), останавливая процессы транскрипции, вызывая деградацию мРНК на посттранскрипционном уровне, вызывать угнетение синтеза продуктов гиперэкспрессированных генов (например, онкогенов), в том числе – регуляторов экспрессии генов (регуляторов транскрипции), быть специфическими маркерами активности патологических процессов.

Основными свойствами микроРНК являются: контроль и регуляция развития организма (начиная с эмбриогенеза), процесса дифференциации и роста клеток, процессов образования тканей и отдельных органов; контроль самоидентификации и дифференциации стволовых клеток; регуляция процессов пролиферации и апоптоза, иммуногенеза, ангиогенеза, фиброза; участие в сигнальных системах клетки, в регуляции нервной и эндокринной систем; регуляция метаболизма низкомолекулярных соединений (аминокислот, липидов, глюкозы, фосфатов); регуляция клеточного осмотического давления; процессы взаимодействия белок-белок у человека. Изменения профиля микроРНК выявлены при различных патологических процессах, включая стресс, воспаление, онкогенез.

Перспективы применения микроРНК могут быть связаны с их применением как средств генной терапии при высоком риске наследуемых заболеваний, для онкопрофилактики при

гиперэкспрессии онкогенов, в качестве средств снижения множественной лекарственной устойчивости (например, при терапии цитостатиками). По этим направлениям в настоящее время уже проводятся научные исследования. Потенциально, микроРНК могут обеспечить устранение индуцированных процессов апоптоза при различных патологических процессах, контроль фиброза при циррозе печени, усиление регенерации тканей после оперативного иссечения, усиление кроветворения и регенерации тканей после применения цитостатиков, контроль состояния миокарда при гипертрофиях, дистрофиях, атеросклерозе, постишемическом и постинфарктном кардиосклерозе.

Разработка микроРНК как лекарственных препаратов требует предварительного решения таких проблем как: быстрое разрушение в крови, тканях, клетке, что требует создания стабильных синтетических аналогов, не чувствительных к РНКазам; транспорт в клетки-мишени (необходимость разработки вирусных векторов, плазмидных конструкций, создание холестеринных комплексов микроРНК, липосомных носителей); тканевая избирательность (будет требоваться создание наноструктурных комплексов с тканеспецифическими антителами, магнитоуправляемыми наноструктурами, тканеспецифическими липосомами и иными тканевыми носителями).

Таким образом, недавно открытый класс соединений – микроРНК могут быть перспективными объектами фармакологического воздействия в качестве регуляторов (преимущественно – «выключателей») различных патологических процессов в организме человека и животных.

Исследование способностей управления альфа-ритмом лиц с разным профилем латеральной организации, полученное посредством биоуправляемого альфа-тренинга

М.Ю. Ярец

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Цель исследования: выявить взаимосвязи между уровнем саморегуляции альфа-ритма с помощью метода биологической обратной связи и нейрофизиологическими предпосылками – профилем латеральной организации (ПЛО). Дать предложения по улучшению существующих технологий.

Материалы и методы. Для исследования эффективности саморегуляции альфа-ритма использовали программно-аппаратный комплекс БОС «РЕАКОР». ЭЭГ испытуемых измеряли с помощью 10 электродов (лобных, теменных, височных, затылочных). В ходе анализа ЭЭГ использовали средний индекс мощности альфа-ритма (8-13 Гц) со всех отведений. ПЛО испытуемых определяли при помощи опросника Аннетт, мануальных проб (скрещивание руки, переплетение пальцев кистей, тест на апплодирование, теппинг-тест), дихотонического прослушивания, пробы Розенбаха, теста «карта с дырой». Особенности функционального состояния испытуемых до и после БОС-тренинга оценивали с помощью методики субъективного шкалирования «САН».

Испытуемые: 25 девушек, студенток творческих специальностей от 19 до 23 лет, из них 11 левополушарных, 14 – правополушарных.

Результаты и выводы

Обнаружены различия в саморегуляции альфа-ритма в зависимости от ведущего полушария головного мозга: правополушарные испытуемые демонстрируют более высокий уровень саморегуляции, в отличие от левополушарных респондентов. Это может быть связано с большей мобилизацией ресурсов в ситуации тренинга у правополушарных испытуемых, воспринимающих БОС-тренинг в большей степени как стрессовое событие, что подтверждают более высокие

показатели САН до тренинга у данной группы. Достоверное снижение самочувствия по шкале САН после тренинга (физическое истощение) у правополушарных респондентов может быть связано с истощением ресурсов организма после участия в тренинге.

Левополушарные испытуемые эффективнее выполняют задания на достижение состояния релаксации (увеличения вклада альфа-ритма в регуляцию), а правополушарные – задания на достижение эмоционального напряжения (депрессию альфа-ритма). Такие результаты могут быть связаны с изначальной разницей в показателях САН (шкалы «самочувствие» и «активность»), отражающих состояние большей мобилизации у правополушарных испытуемых, что, вероятно, связано с адаптацией в новых условиях, которая требует у них больше усилий. Левополушарные испытуемые, напротив, в меньшей степени рассматривают ситуацию тренинга как стрессовую, что отражают более низкие показатели САН.

Показано, что лица с разным ПЛО обладают разным уровнем саморегуляции функционального состояния, что можно учитывать при профессиональном отборе лиц по специальностям, для которых саморегуляция имеет особую важность. Люди с доминирующим правым полушарием обладают специфическими особенностями восприятия и обработки информации, которые могут быть очень ценными для определенных видов профессиональной деятельности (например, для операторов сложных технических комплексов). Также стоит учитывать, что правополушарные люди больше подвержены стрессу и быстрее истощаются, хотя обладают достаточно высоким уровнем саморегуляции функционального состояния.

