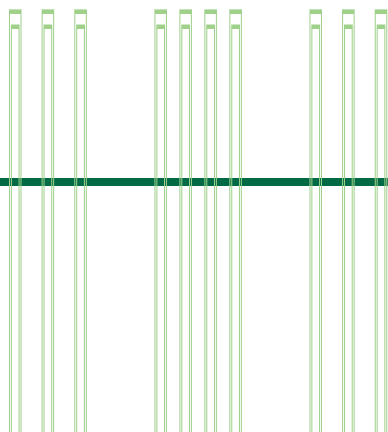
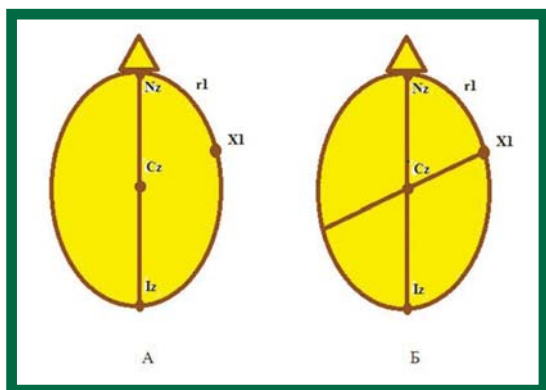


БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

ОЧЕРКИ СПОРТИВНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

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



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

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



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



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



Заявки на книги принимаются по адресу:
scbmt@yandex.ru.

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)

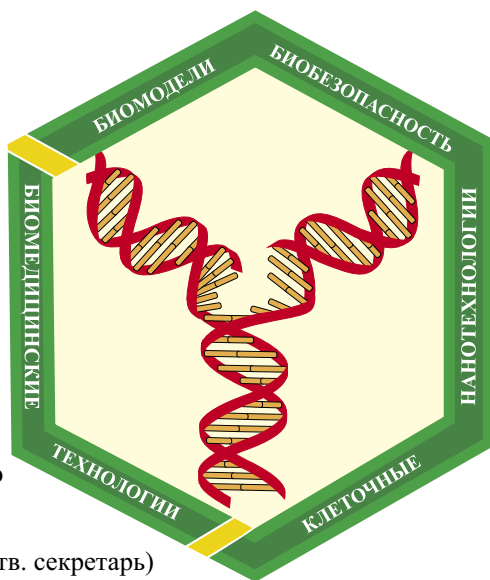
Р.С. Кузденбаева (Казахстан)

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 15.12.2014
Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Станкова, А.О. Ревякин, Е.Л. Матвеевко, А.Е. Ким, Н.С. Шуленин
Гипоксия физической нагрузки у спортсменов и лабораторных животных..... 4

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

А.В. Волков, Е.Н. Антонов, А.В. Васильев, Т.Б. Бухарова, Г.К. Эшмотова, В.К. Попов,
Е.Б. Вихрова, С.А. Минаева, Г.Д. Капанадзе, Н.Л. Фатхудинова, А.О. Ревякин, Д.В. Гольдштейн
Влияние противовоспалительных препаратов на регенерацию костной ткани при трансплантации
мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток 17

Р.А. Клёсов, В.Н. Каркищенко, О.И. Степанова, А.О. Ревякин
Оптимизация биомодели сахарного диабета 1 типа..... 25

Н.П. Здюмаева
Экспериментальное исследование роли антидиуретического гормона в механизме
гемореологических перестроек 31

Ю.М. Мясоедов, В.В. Пузанова
Изучение развития туберкулезного процесса на модели морских свинок, инфицированных
мутантными по RD-1 региону микобактериями 40

СПОРТИВНОЕ ПИТАНИЕ

В.Н. Каркищенко, О.В. Алимкина, Ю.В. Фокин
Влияние рецептуры МиоАктив на гормональный статус лабораторных животных 47

МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина, А.А. Варганов
Методика наведения транскраниальных стимуляторов на заданные мозговые структуры по
проекционным таблицам 54

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Л.А. Болотских
Гнотобиология. Перспективы развития 61

Э.В. Бубунец, А.О. Ревякин, А.В. Лабенец
Инновационная модель комбинированного стимулирования овуляции у осетровых рыб и
цитометрические особенности продуцируемых ооцитов 65

Е.П. Полякова, М.Е. Барбосова, Л.Х. Казакова
Роль эндогенных образований в формировании химуса у рыб и птиц 70

Е.П. Полякова, Т.А. Макашова, Т.В. Метревели, А.О. Ревякин
Активность щелочной фосфатазы в пристеночной и полостной слизи разных отделов кишечника у
мини-свиней светлогорской популяции 80

Г.И. Пронина, А.О. Ревякин, Н.Ю. Корягина, Г.Д. Капанадзе, О.В. Баранова, О.И. Степанова
Патология печени рыб, вызванная Парацетамолом 85

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Е.А. Сокова, В.Г. Кукес
Фармакогенетическое тестирование по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и
полиморфному маркеру *C3435T* гена *MDR1* у беременных с хронической артериальной
гипертензией..... 89

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

E.B. Shustov, G.D. Kapanadze, N.V. Stankova, A.O. Revyakin, E.L. Matveyenko, A.E. Kim, N. S. Shulenin Hypoxia of physical activity at the athletes and laboratory animals	4
---	---

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

A.V. Volkov, E.N. Antonov, A.V. Vasilev, T.B. Bukharova, G.K. Eshmotova, V.K. Popov, E.B. Vikhrova, S.A. Minaeva, G.D. Kapanadze, N.L. Fatkhudinova, A.O. Revyakin, D.V. Goldshteyn Effect of anti-inflammatory drugs on bone regeneration by transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells.....	17
R.A. Klesov, V.N. Karkischenko, O.I. Stepanova, A.O. Revyakin Optimization of biomodel type 1 diabetes.....	25
N.P. Zdyumaeva Experimental research of the role of the antidiuretic hormone in mechanism of hemorheological alterations	31
Y.M. Myasoedov, V.V. Puzanova The study of development of tubercular process on model of guinea pigs infected with mycobacterium with mutated RD-1 region	40

SPORT NUTRITIONS

V.N. Karkischenko, O.V. Alimkina, Yu.V. Fokin Effect of composition MioActive on the hormonal status of laboratory animals.....	47
---	----

BIOMEDICAL METHODS

N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina, A.A. Vartanov Targeting technique of transcranial stimulators on the set brain structures according to projective tables.....	54
---	----

LABORATORY ANIMALS

L.A. Bolotskikh Gnotobiology. Development prospects	61
E.V. Bubunets, A.O. Revyakin, A.V. Labenets Innovative model of combined stimulation of sturgeon ovulation and cytometric features of produced oocytes	65
E.P. Polyakova, M.E. Barbosova, L.Kh. Kazakova The role of endogenous formations in the formation of chyme in fish and birds	70
E.P. Polyakova, T.A. Makashova, T.V. Metreveli, A.O. Revyakin Activity of alkaline phosphatase in parietal and band slime of different intestine departments at Svetlogorsk population of mini-pigs.....	80
G.I. Pronina, A.O. Revyakin, N.Yu. Koryagina, G.D. Kapanadze, O.V. Baranova, O.I. Stepanova The pathology of fish liver caused by Paracetamol	85

CLINICAL RESEARCHES

E.A. Sokova, V.G. Kukes Pharmacogenotyping test of <i>ABCB1</i> gene <i>C3435T</i> and <i>ADRB2</i> gene <i>Arg16Gly</i> polymorphisms in pregnant women with chronic hypertension	89
--	----



Гипоксия физической нагрузки у спортсменов и лабораторных животных

Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Станкова, А.О. Ревякин,
Е.Л. Матвеевко, А.Е. Ким, Н.С. Шуленин

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

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

В исследовании на здоровых спортсменах легкоатлетического профиля показано, что наиболее полно гипоксию физической нагрузки отражает показатель удельного кислородного долга (максимальный кислородный долг, деленный на 1000 Дж выполненной работы). При моделировании гипоксии нагрузки у крупных лабораторных животных (мини-свиней светлогорской популяции) прямая регистрация возникающего кислородного долга технически трудно осуществима, а ее косвенными признаками могут быть избыточная тахикардия и гиперлактатемия посленагрузочного периода.

Ключевые слова: гипоксия физической нагрузки, кислородный долг, спортсмены, крупные лабораторные животные, лактат крови, ЭКГ у лабораторных животных.

Введение

Выполнение практически всех видов спортивных упражнений связано с возникновением гипоксии – как в работающих мышцах и мозге, так и в других органах. Условно все упражнения можно разделить на четыре вида в зависимости от скорости развивающейся тканевой гипоксии: скрытая (латентная), компенсированная, выраженная гипоксия с наступающей декомпенсацией и декомпенсированная тканевая гипоксия. Гипоксическая нагрузка возникает в тех мышцах, которые выполняют большую работу; она и является причиной резкого утомления. Резко выраженная гипок-

сия может быть причиной нарушения энергетического обмена, проницаемости мембран, а также может приводить к другим изменениям в организме спортсменов, что сопровождается снижением работоспособности.

У человека прямым показателем, характеризующим развитие гипоксии нагрузки, является кислородный долг, определяемый как разница между кислородным запросом организма и потребленным в ходе выполнения работы кислородом. Для его определения необходима регистрация респираторных показателей непосредственно в ходе нагрузки. Однако прямое использование

этого показателя у лабораторных животных в ходе доклинических исследований не представляется возможным по техническим причинам (невозможность применения респираторных масок у животных в ходе выполнения ими беговых нагрузок). В связи с этим, было необходимо найти другой информативный показатель, определение которого, с одной стороны, свидетельствовало бы о наступлении и выраженности гипоксических состояний, и, с другой стороны, его определение было бы технически возможно у лабораторных животных, в том числе – в динамике при выполнении физических нагрузок.

Цель работы – обосновать выбор и критерии оценки показателей, характеризующих возникновение и выраженность гипоксии физической нагрузки у крупных лабораторных животных.

Материалы и методы

Исследование выполнено в 2 этапа. В ходе 1 этапа выполнено пилотное исследование на группе из 10 здоровых спортсменов легкоатлетического профиля, у которых в ходе выполнения теста предельной аэробной мощности (бег на тредбане в режиме возрастающей мощности до отказа с динамической регистрацией показателей ЭКГ, легочной вентиляции и газоанализа) определялись показатели, характеризующие гипоксию нагрузки и их связь с другими физиологическими параметрами. Для исследования использована система для эргоспирометрических исследований «T-Ergo PRO».

В ходе 2 этапа была проверена чувствительность отобранных косвенных методов регистрации гипоксии нагрузки в ходе моделирования предельно перено-

симой нагрузки у крупных лабораторных животных (мини-свиней светлогорской популяции). Исследование было проведено в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» в соответствии с нормативной документацией. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией Центра.

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

Гипоксия физической нагрузки создавалась у предварительно отобранных (к бегу на тредбане обычно способны не более 30% популяции молодых животных) и обученных мини-свиней за счет выполнения ими интенсивной физической работы (бег на тредбане со скоростью 7 км/ч) до отказа. Предварительно животных в течение 15 дней до начала исследования обучали бегу на беговой

дорожке. Скорость движения ленты во время обучения – 5 км/ч. Длительность обучения – 30 мин ежедневно. Отбор и обучение бегу на тредбане прошло 14 мини-свиней (из общей группы в 59 особей) [2, 4].

ЭКГ у мини-свиней регистрировалась портативным электрокардиографом «ВНС-Микро» производства компании «Нейрософт» (Россия, Иваново) в отведениях от конечностей, т.к. из-за анатомических особенностей грудной клетки животных зарегистрировать у них ЭКГ в грудных отведениях практически невозможно (крайне низкий вольтаж зубцов).

Для определения уровня глюкозы и лактата в капиллярной крови использовался портативный биохимический анализатор марки Accutrend Plus, производитель – «Roche Diagnostics GmbH». Метод определения показателей – фотометрический, с использованием специализированных фирменных тест-полосок. Диапазон чувствительности для глюкозы – 20-600 мг/дл (или 1,1-33,3 ммоль/л), для лактата – 0,8-21,7 ммоль/л. Погрешность измерения при сравнении с точными аналитическими методами не превышает 5%. Биологический материал (капиллярная кровь) получали проколом ткани уха животного. За результат измерения принимали среднее значение из трех выполненных подряд измерений.

Результаты и их обсуждение

Плотное исследование по выбору информативных показателей гипоксии нагрузки у спортсменов

Результаты определения кислородного долга при выполнении теста беговой нагрузки на тредбане до отказа в динамике представлены на рис. 1.

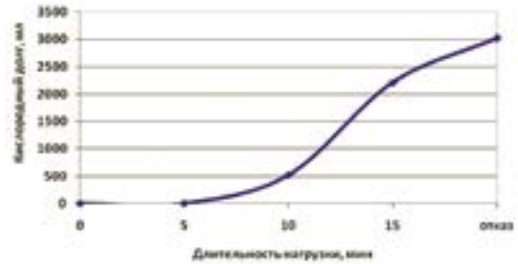


Рис. 1. Динамика показателя кислородного долга во время выполнения физической нагрузки.

Показатель кислородного долга в абсолютных значениях (мл O_2) закономерно нарастает с продолжительностью выполнения нагрузки (объемом выполненной работы). Поэтому для сопоставления различных результатов более целесообразно использовать удельную величину – отношение кислородного долга к объему выполненной работы (мл O_2 /Дж). Мы назвали этот показатель «долговая цена работы» – ДЦР. Его интерпретация, также как и самого кислородного долга, неоднозначна. Высокие значения, отражающие большой кислородный долг при относительно невысоком объеме выполненной работы, характеризуют низкий уровень физической тренированности организма спортсмена. В то же время, высокий уровень кислородного долга при высоком объеме выполненной работы будет характеризовать способность выполнения нагрузок в условиях «гипоксии физической нагрузки», устойчивость к гипоксии, а также достаточную степень мотивации к нагрузкам.

На уровне отказа добровольцев от выполнения нагрузок величины максимального кислородного долга (МКД) и долговой цены работы (ДЦР) имеют следующие статистические характеристики (табл. 1):

Статистические характеристики показателей гипоксии нагрузки в группе спортсменов легкоатлетического профиля в точке отказа от дальнейшего выполнения работы

Статистический параметр	Длительность нагрузки, мин	Работа, Дж	МКД, мл O ₂	ДЦР, мл O ₂ /кДж
Среднее	17,70	21131,57	3049,33	144,74
Стандартная ошибка	0,20	363,10	71,99	4,42
Медиана	17,61	20805,67	3085,13	149,93
Стандартное отклонение	0,64	1148,21	227,65	13,98
Эксцесс	-1,29	-0,65	3,20	-0,73
Асимметричность	0,21	0,61	-1,65	-0,71
Коэффициент вариации	3,64	5,43	7,47	9,66

Сопоставление статистических параметров показателя максимального кислородного долга и долговой цены работы показывает, что частотное распределение ДЦР (рис. 2) ближе к нормальному распределению, чем МКД. Фактически показатель ДЦР представляет собой двугорбую кривую (наложение двух кривых нормального распределения, одну с максимумом в области 125 мл O₂/кДж, вторую – с максимумом в области 155 мл O₂/кДж). Вероятно, такая форма кривой отражает специфику

индивидуальной устойчивости организма спортсменов к гипоксии нагрузки и способности выполнять работу при ее возникновении.

При анализе корреляционных связей анализируемых показателей обращает на себя внимание, что МКД имеет только одну достоверную корреляционную связь – с ДЦР (+0,83), в то время как ДЦР имеет корреляционные связи со многими физиологическими показателями и характеристиками работы спортсменов (табл. 2).

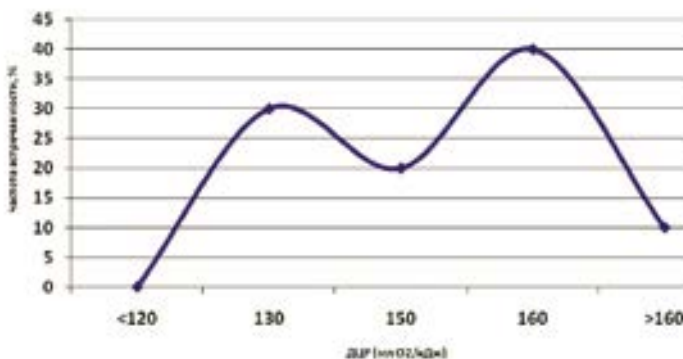


Рис. 2. Частотная кривая распределения значений ДЦР в точке отказа от дальнейшего выполнения работы.

Коэффициенты корреляции ДЦР с другими исследуемыми показателями

Показатель	Коэффициент корреляции
Максимальный кислородный долг	+0,83
Объем выполненной работы	-0,63
Длительность работы до отказа	-0,76
Максимальное потребление кислорода (МПК)	-0,67
Максимальное выделение CO ₂	-0,79
Минутный объем дыхания максимальный	-0,63
Удельный прирост ЧСС на нагрузку	+0,69
Гемоглобин крови	+0,56

Таким образом, ДЦР отражает как показатели собственно работы (ее длительность и суммарный выполненный объем), индивидуальной эффективности утилизации кислорода (МПК, максимальное выделение CO₂), легочной вентиляции (МОД на максимуме нагрузки), реакцию ЧСС на нагрузку, так и кислородную емкость крови (уровень гемоглобина).

Можно предположить, что в организме спортсменов реализуется следующая цепочка событий: в ответ на возрастающую нагрузку происходит закономерная активация дыхательной и сердечнососудистой систем, повышающая эффективный масс-перенос кислорода к мышцам. При низком уровне физической нагрузки возможности повышения масс-переноса кислорода соответствуют кислородному запросу выполняющего физическую нагрузку организма, и гипоксия нагрузки не формируется. Однако при дальнейшем росте нагрузки энергопродуцирующая система окислительного фосфорилирования уже не справляется с обеспечением возросшей потребности мышц в энергии (стрессовая активация прироста ЧСС без усиления масс-переноса кислорода), накапливающиеся

восстановленные эквиваленты (НАДН, НАДФН, ФАДН) повышают активность ферментов анаэробного гликолиза – резервного по отношению к циклической нагрузке механизма энергопродукции. При этом усиливается как образование пирувата для его дальнейшей утилизации, так и его превращение в лактат, выведение которого из работающей мышцы является наиболее быстрым. В организме начинают проявляться метаболические последствия гипоксии нагрузки – лактацидоз, нарушение функции гистогематических барьеров, активация перекисных и свободнорадикальных процессов, активация глюконеогенеза, насыщение эритроцитов продуктами протеолиза. В ответ на это происходит активация транскрипции HIF-1 (гипоксия-индуцируемый фактор транскрипции), запускающего выработку стабилизирующих белков-шаперонов и ферментов резервных путей энергопродукции, одновременно с этим происходит угнетение нефосфорилирующего окисления (например, митохондриального).

Таким образом, для оценки гипоксии нагрузки в процессе ее биологического моделирования на лабораторных живот-

ных в качестве маркеров возникающей гипоксии могут быть рекомендованы:

- избыточный удельный прирост ЧСС, не соответствующий нагрузке;
- избыточная лактацидемия;
- активация транскрипции и накопление в тканях HIF-1 (на следовом этапе, через сутки после нагрузки).

Оценка гипоксии нагрузки на лабораторных животных

Современная экспериментальная фармакология в настоящее время не имеет адекватных биологических моделей деятельности человека в экстремальных (критических) ситуациях, в том числе – во время интенсивных физических нагрузок. В основном, это связано с тем, что сердечная деятельность (регуляция, метаболизм, тканевая гемодинамика) мелких лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки, морские свинки, кролики, кошки) не является адекватной для переноса полученных результатов на человека, а применение крупных животных (свиньи, овцы, лошади, приматы) в экспериментальных фармакологических исследованиях в настоящее время является достаточно проблематичным. Необходимо также учитывать, что регистрация ЭКГ во время нагрузочных проб у мелких лабораторных животных требует предварительной имплантации специализированных датчиковых систем, что уже само по себе вызывает отличия оперированных животных от интактных. Кроме того, даже имплантированные телеметрические системы могут быть использованы только в одной группе нагрузочных тестов – беге животных на тредбане.

Исключительное положение между группами мелких и крупных экспериментальных животных занимают мини-сви-

ньи [1, 5]. Эти животные, с одной стороны, по основным метаболическим процессам и механизмам регуляции физиологических функций достаточно близки к человеку и могут рассматриваться в качестве достаточно адекватной биологической модели основных тканевых процессов человека [3], а с другой стороны, могут легко содержаться в условиях стандартного вивария, и проведение каких-либо манипуляций с ними (включая тесты физических нагрузок) не представляет особо сложную задачу [4].

Результаты исследования гипоксии нагрузки у мини-свиней по данным ЭКГ

В исследовании анализировались особенности ЭКГ 59 мини-свиней, записанных в положении стоя при обычном пребывании в манипуляционном блоке вивария. Для мини-свиней сама процедура перевода в манипуляционный блок и накладывание электродов является стрессом, поэтому записанные ЭКГ не характеризуют состояние покоя у животных и не могут быть прямо экстраполированы на ЭКГ человека в состоянии покоя лежа, обычно используемые в клинической практике. Для человека в обычных условиях жизни и профессиональной деятельности также характерна определенная мобилизация регуляторных систем, в том числе и стресс-реализующих, поэтому фоновые (в обычных условиях) записи ЭКГ мини-свиней вполне могут быть соотнесены с характеристиками ЭКГ человека в процессе активного дневного бодрствования [6].

В ответ на интенсивную физическую нагрузку у мини-свиней, также как и у человека, происходит закономерное укорочение длительности кардиоциклов

(интервал RR), что сопровождается резким повышением (более чем в 1,5 раза) значений ЧСС. Происходит снижение минимальных значений интервалов RR при практически сохраненном диапазоне максимальных значений интервалов RR. Такие изменения характерны для резкой активации на нагрузку симпатрениальной системы.

Важным показателем работы сердца является частота сердечных сокращений. На рис. 3 представлены частотные кривые встречаемости значений ЧСС в фоновых условиях и после завершения физических нагрузок.

Анализ частотных кривых показывает, что в фоновых условиях распределение значений ЧСС у мини-свиней практически подчиняется закону нормального распределения с максимумом в диапазоне 90-100 уд/мин. Имеющийся небольшой «хвост» наблюдений в области более высоких значений может быть объяснен наличием животных с выраженной синусовой тахикардией (вероятно, у этих животных или исходно тонус симпатической регуляции был более высокий, или они проявили

более выраженную стресс-реакцию на перевод в манипуляционное отделение вивария и наклею электродов для регистрации ЭКГ).

В условиях физической нагрузки частотная кривая имеет двугорбый вид. Вероятно, он связан с тем, что длительность выполнения беговой нагрузки у мини-свиней была не стандартизирована по времени, а протекала в режиме «до отказа». Уровень предельно переносимой нагрузки у животных имеет естественную вариативность в 10-15%, в силу чего часть животных отказывалась от нагрузки при меньшей ее выраженности, что и обеспечивало появление малого куполообразного пика в области значений ЧСС около 140 уд/мин. Большая же часть животных смогла выполнить более длительную нагрузку, с чем связано появление главного куполообразного пика в области значений ЧСС около 170 уд/мин.

В ходе экспериментального исследования удельный прирост ЧСС на нагрузку составил 44 ± 5 уд/кДж*мин (коэффициент вариации 50%). Такие высокие значения вариативности признаков свидетельствуют о сложности дальнейшей

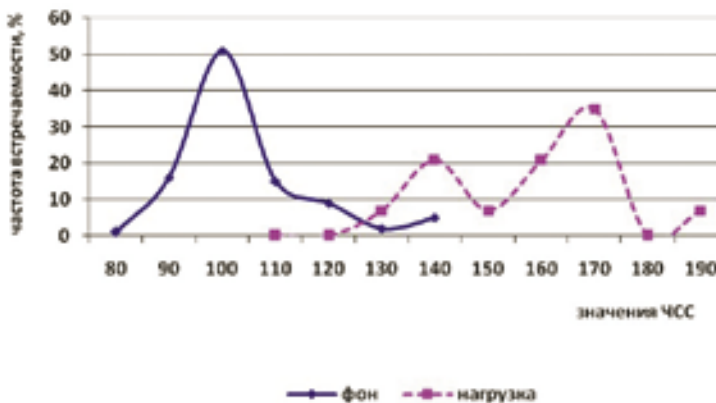


Рис. 3. Кривые частотного распределения встречаемости ЧСС в фоновых условиях и при стресс-индуцированной тахикардии.

стандартизации этого критерия в качестве потенциального маркера гипоксии нагрузки у мини-свиней. Частотный анализ распределения этого показателя представлен на рис. 4.

Анализ рис. 5 показывает, что в группе мини-свиней можно выделить 2 подгруппы животных, границей между которыми выступает 40 уд/мин*кДж. В группе с меньшими значениями этого показателя абсолютные значения прироста ЧСС на нагрузку невысокие, за счет избыточно повышенных фоновых значений ЧСС. Вероятно, для животных с избыточной активацией симпатoadреналовой системы перед нагрузкой удельный прирост ЧСС на нагрузку не может выступать маркером гипоксии нагрузки. У второй группы животных прирост ЧСС оказывается связанным с объемом выполненной работы, и для этой подгруппы удельный прирост ЧСС на нагрузку может рассматриваться как физиологический критерий возникающей при нагрузке гипоксии.

В связи с выявленной нестабильностью ритмограммы мини-свиней в фоновых исследованиях (до нагрузки), не-

обходимо обеспечить более длительную (не менее 1 мин) регистрацию фоновой ЭКГ и определение усредненного за этот период фонового значения ЧСС до нагрузки. Животные, у которых в предстартовый период отмечаются избыточно высокие (110 и более) значения ЧСС, должны исключаться из исследований по оценке гипоксии нагрузки.

Результаты исследования уровня лактата у мини-свиней как маркера гипоксии нагрузки

Организационной особенностью данной серии исследований, вызванной небольшим количеством (14 особей) пригодных для исследования животных, явилось то, что каждое животное тестировалось 5 раз, с недельным интервалом между исследованиями, достаточным для полного восстановления их функционального состояния после предшествующей нагрузки.

Статистические характеристики значений лактата крови животных в условиях относительного покоя и после выполнения предельно переносимой физической нагрузки (бег на тредбане до отказа) представлены в табл. 3.

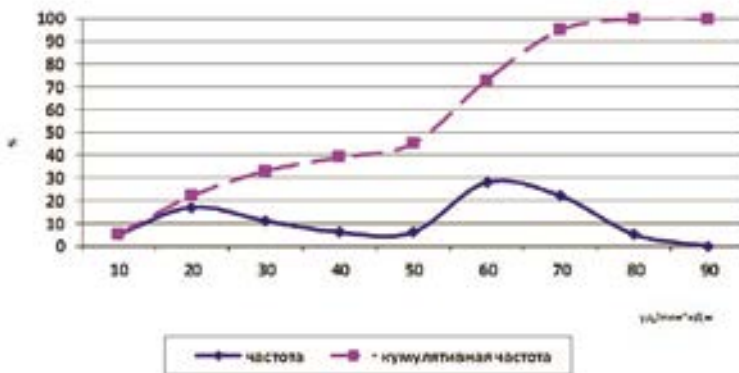


Рис. 4. Частотный анализ распределения значений удельного прироста ЧСС на нагрузку у мини-свиней.

Таблица 3

Статистические характеристики значений содержания лактата в периферической крови мини-свиней до и после предельно переносимой физической нагрузки

Параметр	Лактат до нагрузки, ммоль/л	Лактат после нагрузки, ммоль/л
Среднее	3,28	6,20
Стандартная ошибка	0,10	0,16
Медиана	3,25	6,10
Мода	2,80	5,20
Стандартное отклонение	0,75	1,21
Экссесс	0,03	-0,12
Асимметричность	0,49	0,21
Коэффициент вариации	0,23	0,20

Анализ табл. 3 показывает, что значения лактата как в условиях относительного покоя, так и после предельно переносимой нагрузки в основном соответствуют критериям нормального статистического распределения и могут быть анализированы как методами параметрической, так и непараметрической статистики.

Частотные кривые встречаемости значений лактата до и после физической нагрузки представлены на рис. 5.

Границей, позволяющей дифференцировать постнагрузочный уровень лактата (и, соответственно, гипоксию нагрузки) у мини-свиней, является 5 ммоль/л. Точность дифференцировки состояний по усредненной ошибке составляет не менее 90%.

Дисперсионный анализ показал, что различия между двумя полученными рядами данных являются высоко достоверными ($p=6 \cdot 10^{-31}$), а фактор нагрузки описывает 68% всей вариабельности значений лактата крови мини-свиней.

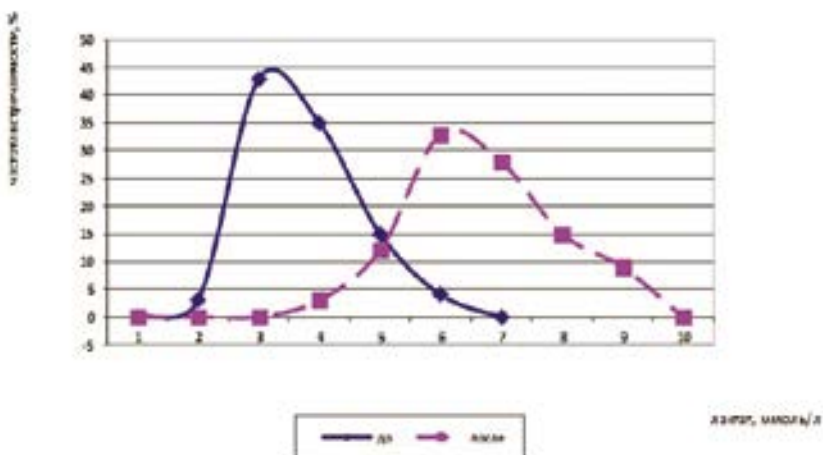


Рис. 5. Частотные кривые распределения значений лактата крови мини-свиней до и после физической нагрузки.

Для оценки значимости возможного влияния таких независимых факторов как масса животных, повторное предъявление нагрузки, продолжительность нагрузки, объем выполненной животными работы, на фоновые особенности метаболизма (уровень глюкозы и лактата в покое) был проведен однофакторный дисперсионный анализ этих показателей на уровень лактата после нагрузок (табл. 4).

Результаты факторного дисперсионного анализа показывают, что содержание лактата после нагрузки на уровне статистических тенденций умеренно связано с объемом выполненной животными физической работы. В большей степени этот показатель связан с уровнем глюкозы после нагрузки и формирующейся в ходе работы гипогликемии. Чем выше степень гипогликемии нагрузки (и, соответственно, ниже уровень глюкозы), тем выше значения лактата крови после нагрузки. Эта закономер-

ность отражает типичный метаболический ответ организма на гипоксию нагрузки – интенсивную утилизацию глюкозы в реакциях как аэробного (с минимальным повышением уровнем лактата), так и анаэробного (с резким повышением уровня лактата крови) гликолиза.

В то же время, факт того, что связь лактата после нагрузки с объемом работы носит не выраженный характер (коэффициент детерминации всего 8%), может свидетельствовать о недостаточной информативности этого показателя для оценки степени формирующейся у животных гипоксии нагрузки. В связи с этим, методом однофакторного дисперсионного анализа были проанализированы и другие, связанные с уровнем лактата после нагрузки показатели, – прирост лактата и лактатная цена работы.

Статистические характеристики прироста лактата на нагрузку и лактатной цены работы представлены в табл. 5.

Таблица 4

Статистическая значимость влияния факторов на уровень лактата крови (ммоль/л) мини-свиней после предельно переносимых нагрузок

Фактор	Центроиды групп по уровням фактора			Степень влияния фактора (D), %	Достоверность (p)
	низкий	средний	высокий		
Масса	5,9	6,2	6,2	0,4	0,88
Повторность нагрузки	6,3	6,3	5,8	2,8	0,44
Длительность нагрузки	6,2	6,0	6,7	5,7	0,19
Объем работы	6,5	5,9	6,7	8,0	0,09
Лактат до нагрузки	5,9	6,5	6,4	5,1	0,22
Глюкоза до нагрузки	5,9	6,1	6,7	7,8	0,10
Глюкоза после нагрузки	7,0	5,9	6,2	11	0,03
Гипогликемия нагрузки	5,8	6,1	6,6	8,1	0,09

Таблица 5

Статистические характеристики прироста лактата на нагрузку и лактатной цены работы

Параметр	Прирост лактата на нагрузку, ммоль/л	Лактатная цена работы, ммоль/л*кДж
Среднее	2,93	0,048
Стандартная ошибка	0,16	0,003
Медиана	2,70	0,045
Мода	2,30	не определена
Стандартное отклонение	1,26	0,023
Экссесс	-0,22	1,79
Асимметричность	0,59	1,18
Коэффициент вариации	0,43	0,48

При анализе табл. 5 обращает на себя внимание, что показатель лактатной цены работы имеет распределение, далекое от нормального, что делает некорректным его анализ параметрическими методами и популяционный перенос полученных результатов.

Показатель прироста лактата на нагрузку характеризуется высокой вариативностью и не оптимальной для дальнейшего анализа частотной кривой распределения значений (рис. 6).

Анализ рис. 6 показывает, что исходя из методологии S-образного шкалирования, границей диапазона высокого прироста лактата является 4 ммоль/л. Именно эта величина может стать дифференцирующим признаком выраженной гипоксии нагрузки у мини-свиней. Нижняя граница дифференциации степени гипоксии нагрузки по показателю прироста лактата не определяется.

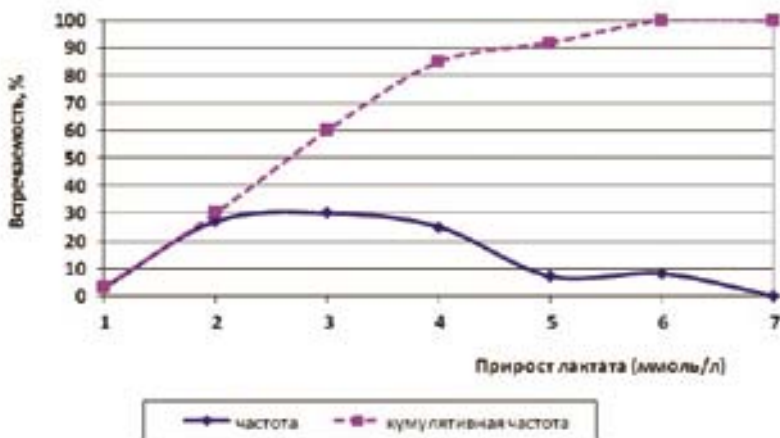


Рис. 6. Частотный анализ распределения значений прироста лактата на нагрузку.

Статистическая значимость влияния факторов на уровень прироста лактата крови (ммоль/л) мини-свиней на предельно переносимую нагрузку

Фактор	Центроиды групп по уровням фактора			Степень влияния фактора (D), %	Достоверность (p)
	низкий	средний	высокий		
Масса	2,0	3,1	2,9	5,2	0,22
Повторность нагрузки	3,3	2,9	2,3	9,2	0,06
Длительность нагрузки	3,0	2,7	3,3	3,0	0,42
Объем работы	3,2	2,7	3,3	5,8	0,18
Лактат до нагрузки	3,3	2,9	2,1	12	0,02
Глюкоза до нагрузки	2,7	2,7	3,5	8,7	0,08
Глюкоза после нагрузки	3,5	2,8	2,7	5,8	0,18
Гипогликемия нагрузки	2,7	2,7	3,3	5,1	0,22

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния контролируемых факторов на прирост лактата после нагрузки представлены в табл. 6.

Анализ табл. 6 показывает, что только исходная гипергликемия покоя на уровне статистических тенденций оказывает умеренное влияние (коэффициент детерминации 8,7%; $p=0,08$) на прирост лактата при нагрузке (у животных с более высоким уровнем глюкозы прирост лактата на 30% выше, чем у животных с низким и средним уровнем значений глюкозы крови до нагрузки). Полученные данные могут отражать потенцирующее влияние исходной стрессовой активации животных (для которой и характерна умеренная гипергликемия) на формирование гипоксии нагрузки.

Обращает на себя внимание, что при повторных тестовых нагрузках прирост лактата на нагрузку снижается, что может быть объяснено как тренирующим эффектом, так и меньшей степенью стрессовой активации животных уже знакомым для них нагрузочным тестированием.

Выводы

Для оценки гипоксии нагрузки у спортсменов высоко информативным показателем является удельный кислородный долг (долговая цена работы), определяемый как отношение максимального кислородного долга к объему выполненной работы.

Моделирование гипоксии нагрузки у лабораторных животных технически выполнимо на мини-свиньях в тесте предельно переносимой нагрузки (бег на тредбане).

Критериями возникновения гипоксии нагрузки у мини-свиней являются достижение ЧСС после нагрузки уровня 140 уд/мин и выше, уровня удельного прироста ЧСС на единицу работы 40 уд/мин*кДж, лактата в капиллярной крови 5 ммоль/л, или его прироста на нагрузку более 4 ммоль/л. Последний показатель отражает достижение высокой степени гипоксии нагрузки.

В связи с выявленной нестабильностью ритмограммы мини-свиней в фоновых исследованиях (до нагрузки), должна быть обеспечена более длитель-

ная (не менее 1 мин) регистрация фоновой ЭКГ и определение усредненного за этот период фонового значения ЧСС до нагрузки. Животные, у которых в предстартовый период отмечаются избыточно высокие (110 и более) значения ЧСС, должны исключаться из исследований по оценке гипоксии нагрузки.

Список литературы

1. *Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.* Светлогорская популяция мини-свиней // Биомедицина. 2007. № 6. С. 71-81.
2. *Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Дензгина С.Е., Станкова Н.В.* Разработка методики оценки физической выносливости лабораторных животных для изучения адаптивной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. № 1. С. 4-23.
3. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. - М.: Межакадемическое издательство ВПК. 2004. 608 с.
4. *Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б.* Очерки спортивной фармакологии. Т.1. Векторы экстраполяции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. -М., СПб: Айсинг. 2013. 288 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
6. *Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Каркищенко В.Н., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Ким А.Е.* Изменение параметров сердечной деятельности по данным ЭКГ у мини-свиней в условиях стресс-индуцированной тахикардии // Биомедицина. 2013. № 4. С. 126-133.

Hypoxia of physical activity at the athletes and laboratory animals

**Е.В. Shustov, G.D. Kapanadze, N.V. Stankova, A.O. Revyakin,
E.L. Matveyenko, A.E. Kim, N.S. Shulenin**

It is shown that most fully the hypoxia of physical activity is reflected by an indicator of a specific oxygen deficit (the maximum oxygen debt divided into 1000 J of the performed work) in research on healthy athletes of a track and field athletics profile. When modeling a hypoxia of loading at large laboratory animals (Svetlogorsk population of mini-pigs) direct registration of the arising oxygen deficit is technically difficult feasible and excess tachycardia and a hyperlactate of the post working period can be its indirect signs.

Key words: a hypoxia of physical activity, an oxygen deficit, athletes, large laboratory animals, a lactate of blood, an electrocardiogram at laboratory animals.



Влияние противовоспалительных препаратов на регенерацию костной ткани при трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

**А.В. Волков^{1,2}, Е.Н. Антонов³, А.В. Васильев^{1,4}, Т.Б. Бухарова⁴,
Г.К. Эшмотова¹, В.К. Попов³, Е.Б. Вихрова⁴, С.А. Минаева³,
Г.Д. Капанадзе⁵, Н.Л. Фатхудинова¹, А.О. Ревякин⁵, Д.В. Гольдштейн⁴**

¹ – ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

² – ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава РФ, Москва

³ – ФГБУН «Институт проблем лазерных и информационных технологий» РАН, Москва

⁴ – ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

⁵ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: к.б.н. Бухарова Татьяна Борисовна, bukharova_rmt@yandex.ru, +7(499)6128604

Разработаны тканеинженерные конструкции для регенерации костной ткани на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани и полилактогликолидных носителей, содержащих противовоспалительный препарат Ибупрофен. Для включения Ибупрофена в состав материала использованы сверхкритические флюидные технологии. При аллогенной трансплантации полученных конструкций в зону дефекта бедренных костей крыс наблюдается снижение иммунного ответа по сравнению с контрольной группой (без Ибупрофена). В опытной группе регенерация костной ткани происходит по пути прямого остеогенеза без промежуточного формирования хряща, что приводит к снижению сроков репарации.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, аллогенная трансплантация, СКФ- инкапсуляция, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, репаративный остеогенез, противовоспалительные препараты.

Введение

Тканевая инженерия – современное направление регенеративной медицины, целью которого является создание живых эквивалентов тканей на основе клеточных культур и матриц-носителей

для обеспечения органотипической регенерации поврежденных тканей. Выбор источника получения клеточных культур обусловлен клинической задачей и предполагает использование как аутологичных, так и донорских клеток.

Преимуществами аллогенных трансплантаций являются отсутствие необходимости длительного процессинга культур, практически неограниченный объем материала, отсутствие риска потери индивидуального трансплантата. Кроме того, на аллогенном материале могут быть реализованы подходы генетической модификации клеток для получения продуцентов белковых молекул с терапевтическим эффектом. Существенным ограничением использования аллогенного клеточного материала является низкая иммунная совместимость донорского трансплантата и организма реципиента. Традиционные способы снижения иммунной реакции, основанные на применении глюкокортикоидов природного или синтетического происхождения, таких как Преднизолон, Дексаметазон, могут приводить к искажению процессов цитодифференцировки клеточной культуры и, как следствие, снижению эффективности клеточной трансплантации [1, 4]. Поиск альтернативных подходов основан на исследовании влияния микроокружения трансплантированных клеток. Было показано, что ключевую роль в иммунном ответе при трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга играют интерферон- γ и фактор некроза опухоли- α , секретируемые Т-хелперными клетками. Синергичное действие этих факторов приводит, во-первых, к переключению сигнальных путей ММСК и блокирует их дифференцировку в остеогенном направлении, а во-вторых, запускает апоптоз [7]. Введение ацетилсалициловой кислоты как специфического блокатора воспалительных реакций приводит к снижению концентрации этих факторов и существенному

усилению регенерации в зоне костного дефекта. Однако известно, что применение ацетилсалициловой кислоты ингибирует пролиферацию ММСК [8], а также может приводить к агранулоцитозу. В настоящей работе в качестве эффективной замены ацетилсалициловой кислоты выбран другой нестероидный противовоспалительный препарат – Ибупрофен, который также снижает иммунный ответ при аллогенной трансплантации, ингибируя синтез простагландинов, но его действие, в отличие от аспирина, является обратимым.

Для обеспечения локального действия Ибупрофена в области трансплантации он был инкапсулирован в пористую матрицу-носитель, изготовленную из полилактогликолида – сополимера молочной и гликолевой кислот, с помощью сверхкритической флюидной (СКФ) технологии [3]. Постепенное диффузионное высвобождение препарата из полимерной матрицы в окружающие ткани по мере ее биорезорбции обеспечивает пролонгированное действие Ибупрофена. Поиск оптимальных режимов инкапсуляции Ибупрофена в полимерные матрицы является весьма актуальной и самостоятельной задачей [6]. При этом *in vivo* исследование эффективности применения тканеинженерных конструкций на основе этих материалов ранее не проводилось.

Целью работы явилось исследование процесса регенерации костной ткани при трансплантации тканеинженерной конструкции на основе аллогенных ММСК жировой ткани, дифференцированных в остеогенном направлении, и пористых матриц-носителей из полилактогликолида, содержащих Ибупрофен, на модели костного дефекта у крыс.

Материалы и методы

Получение культуры остеогенных клеток

Для получения культуры ММСК у крыс забирали фрагмент жировой ткани и дезагрегировали его путем ферментной обработки смесью коллагеназы I типа (0,5 мг/мл) и диспазы (1 мг/мл). Клетки культивировали в ростовой среде DMEM/F12 (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА), 100 мг/л Амикацина (Синтез).

Для остеогенной дифференцировки клетки на 2-3 пассаже наращивали до 70% монослоя и инкубировали в индуктивной среде DMEM (ПанЭко) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл Амикацина, 50 мг/л L-аскорбиновой кислоты (Sigma), 10 мМ/л β -глицерофосфата натрия (Sigma) и 10 нМ 1,25-дигидрокситамина D3 (Roshe).

Для оценки эффективности остеогенной дифференцировки проводили окрашивание очагов минерализации ализариновым красным. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом, pH 7,2-7,4 и окрашивали 2% раствором ализаринового красного, pH 4,1-4,2 («ПанЭко»).

Получение полимерных матриц-носителей с Ибупрофеном

Для изготовления трехмерных пористых матриц использовали биорезорбируемый полилактидогликолид марки Purasorb PDLG 7507 (приведенная вязкость 0,4 дл/г, производство «Purac Biochem», Нидерланды). Инкапсуляцию нестероидного противовоспалительного препарата Ибупрофен («ЗВ Pharmachem International Co.», КНР) в полилактидогликолид и формирование из него биоактивных матричных структур производили в среде сверхкритического CO₂ с помощью установки для СКФ монолитиза-

ции полимерных порошков [3]. Гранулы полилактидогликолида измельчали в ротационной мельнице и с помощью сита отбирали фракцию с дисперсностью 100÷200 мкм. К порошку полимера добавляли порошок Ибупрофена в пропорции 20 масс.%, смесь перемешивали и помещали в ячейки пресс-форм, изготовленные из политетрафторэтилена (Тефлон™). Пресс-формы помещали в камеру высокого давления, которую уплотняли, продували и заполняли диоксидом углерода при комнатной температуре до давления 5 МПа. После этого включали нагреватель, и по мере достижения температуры 40°C давление CO₂ доводили до 10 МПа. Систему выдерживали в этих условиях в течение 1 ч. Затем производили постепенный (в течение 15 мин) сброс давления до атмосферного значения. После последующей выдержки полученного материала в атмосферных условиях в течение 24 ч (необходимой для полного удаления CO₂ из композита и его окончательного отверждения) матрицы извлекали из пресс-формы.

Изготовление тканеинженерных конструкций

Сборку конструкций осуществляли путем размещения клеток на полимерной матрице с помощью фибринового сгустка по методике, разработанной нами ранее [2]. Предварительно у крыс забирали кровь и с помощью центрифугирования получали плазму крови, обогащенную тромбоцитами (PRP - Platelet Rich Plasma). Дифференцированные в остеогенном направлении ММСК снимали с культурального пластика, осаждали и ресуспензировали в PRP. Полученную суспензию наносили на матрицу и добавляли бычий тромбин, растворенный в 10% р-ре хлорида каль-

ция. Полимеризация фибрина происходила в течение 5-7 мин.

Трансплантация ТИК крысам

Исследование выполняли на самцах белых аутбредных крыс начальной массой 300 ± 10 г, с моделью щелевидного дефекта большеберцовых костей. Животным трансплантировали тканеинженерные конструкции, содержащие Ибупрофен (опытная группа) и без Ибупрофена (контрольная группа). Операции проводили под общим наркозом (Zoletil, 0,06 мл/кг). Производили продольный разрез кожи в проекции большеберцовой кости, последовательно тупым и острым путем обнажали большеберцовую кость. Посередине её фронтальной поверхности колесовидным бором с проточным охлаждением физиологическим р-ром формировали отверстие 12×1 мм до костного мозга. В рану вносили заранее подготовленную тканеинженерную конструкцию, заполняя весь объём дефекта кости. Рану послойно ушивали. Животных выводили из эксперимента на 10 и 30 сутки путем передозировки эфирного наркоза. Забирали нужную область большеберцовой кости и помещали в 10% формалин.

Гистологическая обработка

Образцы подвергали декальцинации в смеси 4% р-ров муравьиной и соляной кислот. Гистологическую проводку осуществляли по спиртам восходящей концентрации, ксилолу и заливали в парафин. Из блоков изготавливали полусерийные срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином.

Результаты исследований

Матрицы-носители

Изготовленные с помощью сверхкритического диоксида углерода образцы представляли собой пористые цилиндры диаметром 5 мм и высотой 4 мм, с распределенным внутри их объема Ибупрофеном. Фотографии образцов биоактивных матриц и их микроструктура представлены на рис. 1. Пористость матриц составляла порядка 40% и определялась исходной плотностью заполнения ячеек пресс-формы смесью порошков полимера и Ибупрофена.

Использованный для формирования матриц сополимер молочной и гликолевой кислот PDLG 7507 имеет молекулярную массу в диапазоне 80-100 кДа, время его биорезорбции в тканях, согласно данным производителя, составляет порядка

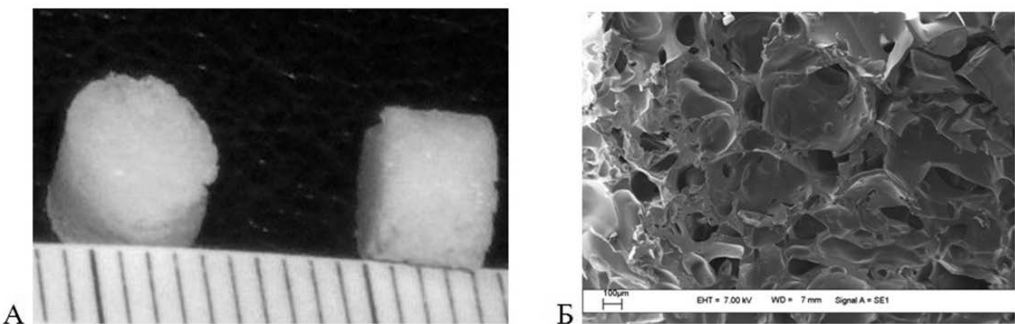


Рис. 1. Образцы биоактивных матриц с Ибупрофеном. А – внешний вид образцов; Б – сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) их поверхности. Деление шкалы – 1 мм (А) и 100 мкм (Б).

5-6 мес., что является достаточным сроком для формирования новой костной ткани в области дефекта. СКФ инкапсуляция Ибупрофена и создание на его основе биорезорбируемого полимерного композита позволяет стабилизировать препарат для длительного хранения лекарственной субстанции и обеспечить контролируемую кинетику его выхода вещества в окружающие ткани.

Гистологическое исследование

Контрольная группа, 10 суток

При гистологическом исследовании образцов контрольной группы (без Ибупрофена) через 10 дней после трансплантации наблюдается аппозиционный рост ретикулофиброзной костной ткани от материнской кости к центру дефекта. В центре костной раны располагается первичная костная мозоль, состоящая преимущественно из соединительной ткани с очагами хондроиды и островками ретикулофиброзной костной ткани. В окружающих тканях умеренно выраженная лимфо- и плазмоцитарная инфильтрация. Наблюдаются очаги грануляционной ткани. Костный мозг реактивно изменен, полнокровен. Субнадкостничный стабилизационный остеогенез преобладает над репаративным. Матрица-носитель в ряде случаев фрагментирована и располагается вне зоны регенерации.

Опытная группа, 10 суток

Спустя 10 суток после трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей Ибупрофен, в области костной раны выявляются, главным образом, формирующиеся балки новообразованной костной ткани, которые проходят сквозь матрицуноситель, оттесняя его в костномозговой канал и кнаружи в мягкие ткани. В порах матрицы-носителя выявляется васкуляризованная соединительная ткань с островками остеогенеза.

Контрольная группа, 30 суток

При гистологическом исследовании образцов контрольной группы спустя 30 суток после трансплантации костный регенерат содержит значительное количество очагов хондроиды и гиалинового хряща (рис. 2). Костные балки не организованы, между ними выявляются прослойки соединительной ткани с грубыми волокнами. В окружающих тканях лимфо- и плазмоцитарная инфильтрация не обнаруживается. Матрица-носитель в ряде случаев фрагментирована и располагается вне зоны регенерации. В некоторых местах матрица-носитель располагается внутрикостно и окружена соединительной тканью с инфильтрацией лимфоцитами.

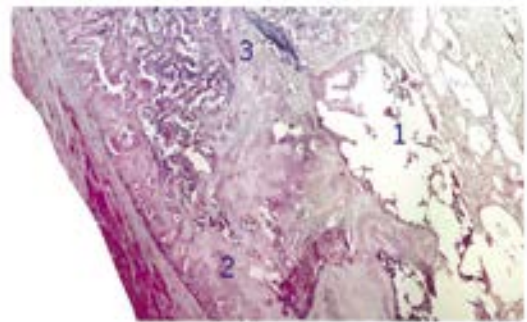


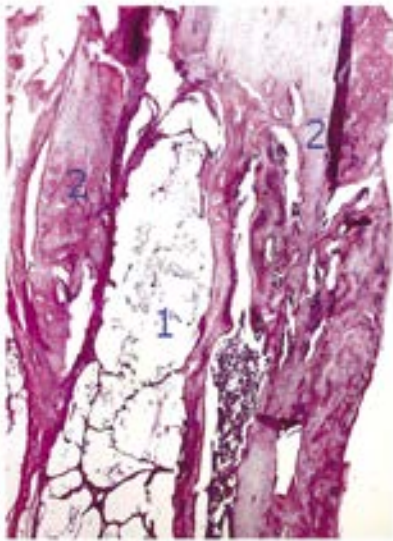
Рис. 2. Гистологическая картина костного регенерата бедренной кости крысы через 30 суток после трансплантации тканеинженерной конструкции без Ибупрофена. Костная рана преимущественно заполнена организующимся созревающим костным матриксом в сочетании с хондроидом, гранулы материала не визуализируются. 1 – материал; 2 – пластинчатая костная ткань диафиза; 3 – хондроид. Окрашивание гематоксилином и эозином, х32.

Таким образом, при внутрикостной трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей аллогенные клетки на матрице-носителе из полилактогликолида, регенерация костной

ткани осуществляется типичным вариантом течения регенераторного процесса – энхондральным остеогенезом, отличительной особенностью которого является наличие лимфоцитарной инфильтрации вокруг ТИК.

Опытная группа, 30 суток

Гистологическая картина через 30 дней после трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей Ибупрофен, соответствовала завершению процессов регенерации с компактизацией костного матрикса кортикального слоя вокруг матрицы носителя, реорганизацией вторичной костной мозоли, начальными признаками восстановления проходимости костномозгового канала



(рис. 3).

Рис. 3. Гистологическая картина костного регенерата бедренной кости крысы через 30 суток после трансплантации тканеинженерной конструкции, в матрицу-носитель которой инкапсулирован Ибупрофен. Костная рана преимущественно заполнена организующимся созревающим костным матриксом, гранулы материала не визуализируются. 1 – материал, 2 – пластинчатая костная ткань диафиза кости. Окрашивание гематоксили-

ном и эозином, х32.

Обсуждение результатов

Формирование однородно наполненных композитных структур из порошковых материалов, содержащих высокомолекулярные вещества, включая биологически активные соединения, является достаточно сложной научнотехнической задачей. Использование механического перемешивания и последующего плавления исходных компонентов для получения таких биоматериалов имеет существенные ограничения, поскольку может приводить к потере их биоактивности и частичной деструкции полимера с образованием токсичных составляющих. Матрицы, изготовленные с использованием органических растворителей, также могут содержать следы токсичных веществ. Используемый нами для формирования пористых полимерных матриц, содержащих Ибупрофен, процесс СКФ монолитизации не имеет указанных недостатков. Процесс может проводиться при температурах 35–40°C и без использования каких-либо токсичных компонентов. Биологическая активность препаратов при этом полностью сохраняется. В настоящее время этот метод является одним из наиболее перспективных способов формирования пористых матриц для тканевой инженерии из полимерных материалов [5].

Экспериментальное исследование трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей аллогенные ММСЖ жировой ткани, дифференцированные в остеогенном направлении и матрицу-носитель, содержащую Ибупрофен в качестве противовоспалительного агента, продемонстрировало особенности течения регенеративного процесса в костной ране большеберцо-

вой кости у крыс. Кардинальная разница в течение процессов регенерации была заметна уже на ранних сроках. Так, на 10 сутки в группе без Ибупрофена костный регенерат представлял собой типичную первичную костную мозоль с характерными признаками энхондрального остеогенеза – недифференцированной соединительной тканью, хондроидом на разных стадиях созревания и ретикулофиброзной костной тканью. Напротив, иная картина развивалась в костной ране, где присутствовал Ибупрофен. Течение репаративного остеогенеза шло по сценарию первичного остеогенеза без формирования недифференцированной соединительной ткани, хондроида. Кроме того, в клетчатке, окружающей регенерат, количество плазмо- и лимфоцитарных клеток было различным. Так, без Ибупрофена отмечалась вполне значимая реакция макроорганизма против аллогенной клеточной культуры, которая выражалась в диффузной инфильтрации малых лимфоцитов и плазматических клеток, тогда как в группе с Ибупрофеном подобных явлений обнаружено не было.

Однако лимфоидной реакции со стороны реципиента на срок 30 дней – как в контрольной, так и опытной группе – обнаружено не было, что согласуется с течением иммунологических реакций на введение антигенов. Наблюдались различия в структуре костных регенератов на этом сроке. В группе сравнения (матрица-носитель без Ибупрофена) процессы формирования и созревания первичной (провизорной) костной мозоли до конца не завершились, что выражалось в сохранении как очагов хондроида, так и бесструктурного костного матрикса. Таким образом, течение про-

цессов регенерации было вполне типичным для указанного срока. Однако в опытной группе (матрица-носитель с Ибупрофеном) фактически обнаруживались признаки реорганизации вторичной (остеоидной) костной мозоли.

Таким образом, нами обнаружена значительная разница течения регенеративного процесса в костной ране при трансплантации тканеинженерной конструкции с включением и без включения в матрицу-носитель противовоспалительного агента – нестероидного противовоспалительно средства Ибупрофен. С нашей точки зрения, налицо непосредственное влияние НПВС на ранние процессы формирования первичной костной мозоли при трансплантации аллогенных клеток-предшественников костной ткани, последующие за альтерацией, что выражается в различных механизмах остеогенеза и явных признаках снижения сроков репарации костной раны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 8309 от 24.08.2012 г.) и Правительства Российской Федерации (контракт № 14.В25.31.0019).

Список литературы

1. *Арутюнян И.В., Ржанинова А.А., Волков А.В., Гольдштейн Д.В.* Влияние дексаметазона на дифференцировку мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 2. С. 67-72.
2. *Бухарова Т.Б., Арутюнян И.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Федюнина И.А., Логовская Л.В., Волков А.В., Ржанинова А.А., Григорьян А.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В.* Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток

- жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 3. С. 167-173.
3. **Попов В.К., Краснов А.П., Воложин А.И., Хоудл С.М.** Новые биоактивные композиты для регенерации костных тканей // Перспективные Материалы. 2004. № 4. С. 49-57.
 4. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль 2С. 2010. С. 88-101.
 5. **Barry J.J.A., Silva M., Popov V.K., Shakesheff K.M., Howdle S.M.** Supercritical carbon dioxide: putting the fizz into biomaterials. *Philosophical Transactions of Royal Society A*. 2006. 364. 249-262.
 6. **Cardea S., Baldino L., Scognamiglio M., Reverchon E.** 3D PLLA/Ibuprofen composite scaffolds obtained by a supercritical fluids assisted process. *J. Mater Sci Mater Med*. 2014 Apr; 25(4): 989-98.
 7. **Liu Y., Wang L., Kikuri T., Akiyama K., Chen C., Xu X., Yang R., Chen W., Wang S., Shi S.** Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat Med*. 2011 Nov 20; 17(12):1594-601.
 8. **Wang Y., Chen X., Zhu W., Zhang H., Hu S., Cong X.** Growth inhibition of mesenchymal stem cells by aspirin: involvement of the WNT/

beta-catenin signal pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2006 Aug; 33(8):696-701.

Effect of anti-inflammatory drugs on bone regeneration by transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells

A.V. Volkov, E.N. Antonov, A.V. Vasilev, T.B. Bukharova, G.K. Eshmotova, V.K. Popov, E.B. Vikhrova, S.A. Minaeva, G.D. Kapanadze, N.L. Fatkhudinova, A.O. Revyakin, D.V. Goldshteyn

Tissue engineering construction (TEC) for regeneration of a bone tissue on basis multipotent mesenchymal stem cells of fatty tissue and polylactic-glycolic carriers containing the anti-inflammatory drug Ibuprofen are developed. For inclusion of the Ibuprofen in composition of material supercritical fluid technologies are used. At allogenny transplantation of the received designs in a zone of defect of femurs of rats decrease in the immune answer in comparison with control group is observed (without Ibuprofen). In experimental group regeneration of a bone tissue happens on the way of direct osteogenesis without intermediate formation of a cartilage that leads to decrease in terms of a reparation process.

Key words: tissue engineering construction, allogeneic transplantation, SKF encapsulation, multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, reparative osteogenesis, anti-inflammatory drugs.

Оптимизация биомодели сахарного диабета 1 типа

Р.А. Клёсов, В.Н. Каркищенко, О.И. Степанова, А.О. Ревякин

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

Контактная информация: Клёсов Роман Алексеевич, klesrom@mail.ru

В работе представлены данные экспериментального моделирования сахарного диабета 1 типа на крысах. Предложены дозы и альтернативный метод введения стрептозотоцина и неполного адьюванта Фрейнда для получения сахарного диабета 1 типа на генетически не предрасположенных к развитию аутоиммунных заболеваний животных.

Ключевые слова: биомодель, сахарный диабет 1 типа, крысы, стрептозотоцин, неполный адьювант Фрейнда.

Введение

Сахарный диабет (СД) 1 типа – острая социальная болезнь XXI века, по-прежнему остаётся одной из наиболее частых причин ранней инвалидизации и гибели больных во всех странах мира. По данным экспертов ВОЗ, СД занимает третье место в структуре смертности населения после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. В 2000 г. количество больных СД составило более 150 млн чел. Прогнозируется, что к 2025 г. их число достигнет 300 млн чел., причем на долю больных СД 1 типа приходится около 10%. Если признать медленно прогрессирующий аутоиммунный СД взрослых вариантом течения СД 1 типа, то процент больных СД 1 типа станет существенно выше [4]. На данный момент известна одна иммуннопатологическая аутоиммунная модель СД 1 типа на генетически здоровых (не предрасположенных) животных, но при

попытке её воссоздания возникла проблема высокой смертности – 65% среди экспериментальных животных от введения активных действующих веществ.

Обычно используемые экспериментальные модели СД 1 типа – аллоксановая и стрептозотоциновая – являются цитотоксическими, избирательно повреждают β -клетки поджелудочной железы и сопровождаются фиброзирующей регенерацией поджелудочной железы без сопутствующего развития в ней аутоиммунного повреждения [5].

В результате было принято решение разработать новые подходы и методы создания биомодели сахарного диабета 1 типа у крыс.

Целью эксперимента являлась оптимизация ныне существующей стрептозотоциновой биомодели СД 1 типа у крыс и разработка новых методов, позволяющих добиться более качественных результатов в эксперименте.

Материалы и методы

Исследования проводились в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России на белых лабораторных крысах-самцах Wistar массой 520-560 г в возрасте 8-10 мес. Лабораторные животные поступили из филиала НЦБМТ ФМБА России «Андреевка». Животные были взяты в эксперимент методом случайной выборки.

Кормление осуществлялось стандартным полнорационнным комбикормом, доступ к воде и корму – свободный. Крысы содержались в вентилируемых клетках системы «RairIsoSystem» при температуре 20-22°C, по 5 особей. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздрава РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животные были поделены на две группы: контрольная группа (n=40) и опытная группа (n=54). Двукратно поочередно в течение 2 недель с интервалом 24 ч вводили в первый день неполный адьювант Фрейнда (А.), во второй день – навеску стрептозотоцина (Stz.), растворённого в 1 мл воды для инъекций. Дозировки и объёмы введения представлены в таблице. Введение осуществляли подкожно, в паховую складку [3].

Стрептозотоцин – противоопухолевое средство алкилирующего действия из группы производных нитрозомочевины, вещество, токсичное для бета-клеток поджелудочной железы. По структуре достаточно напоминает молекулы сахара, чтобы захватываться и транспортироваться внутрь клеток. Ингибирует митоз, преимущественно G2-фазу. Механизм противоопухолевого действия полностью не изучен, но, вероятно, обусловлен образованием метилкарбониевых ионов, которые вызывают алкилирование или связываются с различными внутриклеточными структурами, включая нуклеиновые кислоты. Образует поперечные сшивки между нитями ДНК, что и приводит к ингибированию её синтеза; на синтез РНК и белка влияет в незначительной степени. Оказывает выраженный гипергликемический эффект, вызывая необратимое повреждение β-клеток поджелудочной железы [2].

Неполный адьювант Фрейнда – адьювант, представляющий собой масляную эмульсию, содержащую дериваты ланолина (жирные кислоты). Используется для неспецифической активации иммунной системы [2].

Для достоверного доказательства наличия СД 1 типа у экспериментальных животных были проведены исследования

Таблица

Схема введения препаратов крысам

Группа животных	1-е введение		2-е введение		3-е введение	
	подкожно, раз в 7 дней					
	1-й день	2-й день	1-й день	2-й день	1-й день	2-й день
Контрольная группа	без введения		без введения		без введения	
Опытная группа	1 мл А.	15 мг/кг Stz.	1 мл А.	20 мг/кг Stz.	1 мл А.	25 мг/кг Stz.

ния в динамике. Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяли на приборе Nycocard REDER II (Норвегия), который предназначен для быстрого определения *in vitro* HbA1c. Данный тест основан на методе боратного аффинного анализа. Диапазон измерения – 3-18%.

Помимо этого, велся постоянный контроль быстрого определения *in vitro* HbA1c. Данный тест основан на методе боратного аффинного анализа. Диапазон измерения – 3-18%.

Содержание глюкозы в крови измеряли на приборе Ассу-СНЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови (2-5 мкл) наносили на тест-полоску. Диапазон измерения составлял 0,6-33,3 ммоль/л от массы животных и суточного объёма выпитой воды.

Результаты и их обсуждение

В ходе эксперимента показано, что уже на вторую неделю после введения

препаратов у животных опытной группы отмечалось повышение уровня глюкозы в крови до $10,9 \pm 0,84$ ммоль/л, в то время как уровень HbA1c оставался в пределах нормы – $3,9 \pm 0,22\%$. Далее, на третью неделю после введения препаратов, отмечалось достоверное и значительное повышение уровня глюкозы в крови до $18,4 \pm 0,68$ ммоль/л (рис. 1).

Уровень HbA1c повысился до $9,2 \pm 0,28\%$ на 4-й неделе (рис. 2), и это повышение носит пролонгированный характер. Так, на 9-ю неделю эксперимента средние значения уровня глюкозы у животных опытной группы составляли $31,6 \pm 0,45$ ммоль/л, а HbA1c – $9,7 \pm 0,36\%$.

В течение эксперимента велись наблюдения за изменениями массы животных контрольной и опытной групп. Уже с 3-й недели замечено достоверное изменение массы животных опытной группы ($501 \pm 14,4$ г) по сравнению с контрольной группой ($645 \pm 13,7$) г. Масса животных опытной группы уменьшалась на протяжении всего эксперимента: к 9-й неделе средний показатель



Рис. 1. Динамика уровня гликемии крови лабораторных животных контрольной и опытной групп.



Рис. 2. Динамика HbA1c в крови лабораторных животных контрольной и опытной групп.

массы животного составлял $367 \pm 19,7$ г, в то время как у животных контрольной группы этот показатель составлял $696 \pm 21,6$ г (рис. 3).

Суточный мониторинг объёмов выпитой воды (рис. 4) также показал различия между контрольной и опытной группами. Так, на 2-ю неделю моделирования СД 1 типа у животных опытной группы отмечалось увеличение суточного объёма выпитой воды до $120 \pm 4,44$ мл, в то время как в конт-

рольной группе аналогичный показатель составлял $40 \pm 6,66$ мл. Этот факт обнаруживался на протяжении всего эксперимента: на 9-ю неделю средний суточный объём выпитой воды у животных опытной группы доходил до $365 \pm 25,5$ мл, по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе, составлявшем $40 \pm 3,33$ мл. Данное наблюдение свидетельствует об одном из клинических симптомов СД 1 типа – полидипсии.

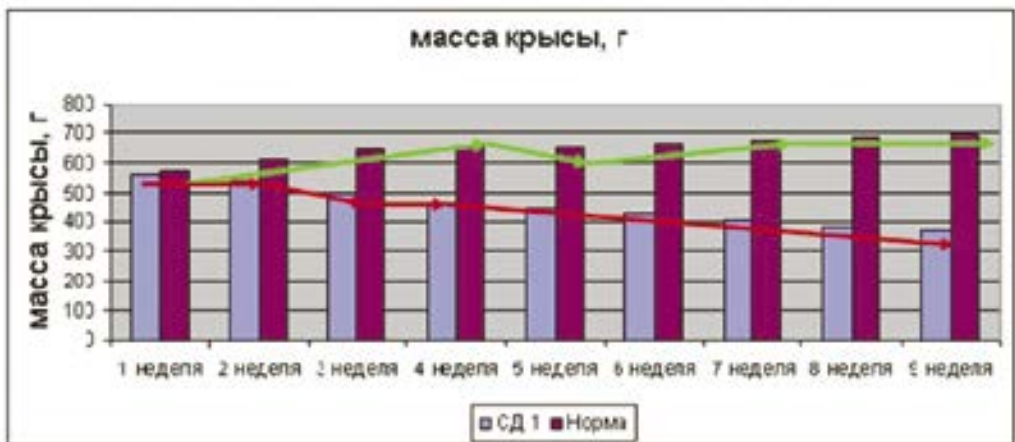


Рис. 3. Динамика массы животных контрольной и опытной групп.



Рис. 4. Суточный объем выпитой воды животными контрольной и опытной групп.

Одним из наиболее интересных результатов исследования явилось появление в опытной группе животных гангренозных повреждений хвостов (рис. 5). Из 54 экспериментальных животных данная патология наблюдалась у 11. Причём первые признаки гангренозных процессов проявились на 52 сутки эксперимента, что соответствует 6 годам течения СД 1 типа у человека, и имели

динамику воспалительного процесса, переходящего в некроз. Подобные изменения наблюдались только у животных опытной группы. Появление гангренозных поражений хвостов лабораторных крыс позволяет говорить о создании аналога синдрома диабетической стопы у человека на экспериментальной биологической модели метаболического синдрома СД 1 типа.



Рис. 5. Гангренозные поражения хвостов животных опытной группы.

Выводы

В результате проведённых исследований предложен альтернативный метод моделирования СД 1 типа у крыс. В отличие от методики [1], внутрибрюшинный метод введения заменён на подкожный, как более безопасный и удобный. Цитратный буфер, ввиду его токсичности, заменён на воду для инъекций. Оптимизирована однородность заболевания по группе. В ходе эксперимента доказана адекватность полученной биомодели наличием соответствующего клинического симптомокомплекса, характерного для сахарного диабета 1 типа (гипергликемия, высокий уровень HbA_{1c}, сильная потеря массы, полидипсия и полиурия). Создана биологическая модель метаболического синдрома СД 1 типа в виде гангренозного поражения хвостов крыс опытной группы, анало-

гичная синдрому диабетической стопы у человека. Работа по данной теме продолжается.

Список литературы

1. *Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А., Клименко Е.Д., Поздняков О.М., Великий Д.А.* Способ моделирования сахарного диабета 1 типа у крыс (Патент № RU 02400822).
2. Первая медицинская помощь. - М.: Большая Российская энциклопедия. 1994.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
4. *Gillespie K.M.* Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. CMAJ. 2006; 175(2).
5. *Nir T., Melton D.A., Dor Y.* Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration // Journal of Clinical Investigation. 2007. 117(9): 2553-2561.
6. *Vavra J.J., Deboer C., Dietz A., Hanka L.J., Sokolski W.T.* Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. 1959. Antibiot. Annu. 7: 230-5.

Optimization of biomodel type 1 diabetes

R.A. Klesov, V.N. Karkischenko, O.I. Stepanova, A.O. Revyakin

The research presents the experimental simulation of type 1 diabetes in rats. The dose and method of introduction streptozotocine, and incomplete Freund's adjuvant for type 1 diabetes were proposed for animals that are not genetically predisposed to the development of autoimmune diseases.

Key words: biomodel, type 1 diabetes, rats, streptozotocine, incomplete Freund's adjuvant.

Экспериментальное исследование роли антидиуретического гормона в механизме гемореологических перестроек

Н.П. Здюмаева

ФГБОУ ВПО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия»,
Костромская область

Контактная информация: Здюмаева Наталья Петровна, ztb_znp@mail.ru

Исследованы реологические свойства крови на экспериментальной модели, воспроизводящей состояние с изменением активности антидиуретического звена регуляции водного баланса посредством длительной водной нагрузки и введения аналога антидиуретического гормона (АДГ) – десмопрессина. Показано, что в условиях значительного функционального напряжения АДГ способствует развитию общей неспецифической стресс-реакции крови, носящей адаптивный характер. Обсуждается возможный механизм гемореологических перестроек с участием АДГ.

Ключевые слова: реологические свойства крови, антидиуретический гормон, водная нагрузка, крысы.

Введение

Значительный объем клинических и экспериментальных данных свидетельствует о важной роли изменения реологических свойств крови, проявляющихся повышением вязкости плазмы и цельной крови, усилением агрегации эритроцитов и снижением деформируемости, как в условиях нормы, так и, особенно, при наличии патологического процесса в организме [8, 12]. Являясь подвижной тканью, кровь отвечает на любой повреждающий фактор как сложная система, в которой изменяются как реологические, так и физиологические процессы, при этом условия потока во многом регулируют взаимодействие клеток крови друг с другом и с сосудистой стенкой [17]. Это дает основание рассматривать гемореологические сдвиги как элемент общей неспецифиче-

ской стресс-реакции организма, имеющей защитный характер, но при чрезмерной длительности или интенсивности повреждающего воздействия способной трансформироваться в механизм патогенеза. С выраженными гемореологическими нарушениями связывают снижение кислород-транспортной функции крови, появление тканевой гипоксии, развитие тромбоза, венозные застои, периферические отеки, что в известной степени определяет прогноз и характер течения основного заболевания [10, 12]. В этой связи, важен вопрос о механизмах регуляции таких реакций, и на сегодняшний день большой интерес в этом плане вызывает роль АДГ. Способность к развитию общих защитных реакций объясняется наличием специфических рецепторов к этому гормону на клетках лимфоцитарного и моноцитарно-

макрофагального ряда, позволяющих им через комплекс цитокинов активно объединять все системы организма [1]. Вместе с тем, любая патология или стрессовая ситуация вызывает целый ряд эндокринных изменений, часто с однотипной реакцией со стороны микроциркуляторной системы, что затрудняет выяснение истинной физиологической роли конкретного гормона.

Целью данной работы было исследование гемореологических перестроек и их функционального значения при экспериментальном изменении активности антидиуретического звена регуляции водного баланса посредством длительной водной нагрузки большого объема и введения аналога АДГ – десмопрессина без воздействия других повреждающих факторов.

Материалы и методы

Исследование проведено на 62 беспородных крысах-самцах массой 360-390 г, содержащихся в стандартных условиях вивария (температура 21-23°C и 12-часовой режим освещения) на сбалансированном рационе питания с соблюдением основных зоогигиенических требований.

Исследование включало несколько серий опытов. В первой экспериментальной серии (ВН) крысам (n=12) без наркоза вводили дистиллированную воду (37°C) в желудок с помощью резинового зонда ежедневно в течение 6 суток в объеме 7 мл/100 г массы тела. Объемная и гипоосмотическая нагрузка субэкстремальной интенсивности позволяла получить значительные отклонения констант осморегуляции и выраженные адаптационные ответы гомеостабилизирующих систем, но, в то же время, не приводила к развитию гипоосмотического шока: признаки патоло-

гического состояния (судороги, диарея, рвота), имеющие место при введении большего объема жидкости, отсутствовали. В плазме также отслеживали отсутствие видимых следов гемолиза. Через 24 ч после очередной водной нагрузки наркотизированных этиамином натрия (2,5 мг/100 г массы, внутривенно) животных забивали путем декапитации и отбирали для исследования образцы крови. В плазме отслеживали отсутствие видимых следов гемолиза.

Во второй серии (ВН+Д) (n=15) вместе с водной нагрузкой дважды в день подкожно вводили по 0,02 мкг/100 г десмопрессина (Адиуретин «Ферринг-Лечива») – синтетического аналога антидиуретического гормона. Данный объем препарата соответствует дозам, рекомендованным для разового введения при его клиническом применении. Использование в работе вместо АДГ его аналога связано с тем, что десмопрессин практически не оказывает влияния на гладкую мускулатуру сосудистой стенки и артериальное давление [4]. Введение же вазопрессина в сочетании с большим объемом жидкости используется в качестве экспериментальной модели инфаркта миокарда, как правило, приводящей к гибели животных [11]. Также как и в первой группе, продолжительность воздействий составила 6 дней, забор крови осуществляли через 24 ч после очередного экспериментального воздействия.

В третьей серии (Д) (n=16) изучали влияние изолированного введения десмопрессина по 0,02 мкг/100 г дважды в сутки, также на протяжении 6 дней. В качестве контрольной группы (n=19) использовались крысы, находившиеся в условиях вивария при стандартном пищевом и водном режиме. Принимая во

внимание рекомендации по проведению функциональных проб для оценки констант организма, касающихся осморегуляции, экспериментальные воздействия и определение исследуемых показателей в группе контроля выполнялись утром натощак, после водной депривации в течение 12 ч [4, 6]. В остальное время на протяжении всего эксперимента животные имели доступ к пище и воде.

В ходе исследования унифицированными методами определяли гематологические показатели и белковый состав плазмы.

Индекс агрегации (ИА) эритроцитов определяли с помощью полуавтоматического агрегометра эритроцитов типа МА 1 («Murepne», ФРГ). Измерение проводили после регулировки прибора (оценка собственного светопропускания блока «вращающийся конус – неподвижная плоскость»). Образец крови (20 мкл) подвергали вращению со скоростью сдвига 600 с^{-1} . После остановки индекс агрегации определялся автоматически для двух интервалов времени – 5 и 10 с (M_5 и M_{10}). Затем ИА определяли при низкой скорости сдвига 3 с^{-1} для тех же интервалов времени ($M1_5$ и $M1_{10}$). Для оценки влияния приложенных сдвиговых усилий на развитие процесса агрегации рассчитывали динамические параметры:

$$D_5 = M1_5 / M_5 \text{ и } D_{10} = M1_{10} / M_{10},$$

равные отношению степеней агрегации в различных режимах вращения для каждого временного интервала.

Для определения содержания кислых гликозаминогликанов (ГАГ) в сыворотке использовали цветную реакцию с карбазолом. Вязкость плазмы (ВП) и крови при напряжении сдвига $3,90 \text{ Н/м}^2$ (BK_1) и $0,39 \text{ Н/м}^2$ (BK_2) измеряли на капиллярном вискозиметре. Регистриро-

вали осмоляльность плазмы (осмометр ОМ 801, Vogel). Подсчет лейкоцитарной формулы производили в окрашенных мазках периферической крови.

Статистическая обработка результатов выполнена с применением пакета программ «Statistica 6.0». Цифровые данные в таблицах при условии, что все величины имеют нормальное распределение, представлены средней арифметической (M) и средним квадратичным отклонением ($\pm\sigma$). При отклонении распределения от нормального использовали формат «медиана» (25:75 процентиля). Для анализа вида распределения полученных величин использован критерий Шапиро-Уилка. Для множественного сравнения использовали тест Крускала-Уолиса. При подтверждении статистической достоверности при множественном сравнении проводили парное сравнение по U-критерию Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием ранговой корреляции Спирмена (r_s).

Результаты и их обсуждение

Анализ белкового состава и осмоляльности плазмы крови животных показал, что избыток деминерализованной воды при длительной регулярной нагрузке не задерживается в организме (табл. 1). Известно, что понижение осмотического давления в тканях в результате водной нагрузки большого объема способствует полному подавлению секреции эндогенного аргинин-вазопрессина, снижению концентрирующей функции почек и профузному выделению большого количества гипотонической мочи [4, 21, 22]. При этом тенденция к повышению осмоляльности плазмы, регистрируемому через сутки после очередной водной нагрузки при свободном доступе живот-

ных к воде, возможно, свидетельствует о повышении осмотического порога секреции эндогенного АДГ. Как известно, осмо- и барорецепторная системы регуляции секреции АДГ тесно связаны. Повышение давления в левом предсердии (вследствие гиперволемии при водной нагрузке) повышает порог возбудимости осморцепторов и уменьшает чувствительность системы осморегуляции секреции эндогенного АДГ [23].

При исследовании образцов крови, взятых через 24 ч после очередной водной нагрузки, применяемой в течение 6 суток, регистрировали некоторое снижение вязкости цельной крови. Вязкость плазмы не отличалась от аналогичного значения группы контроля. Не было выявлено статистически значимых изменений и при анализе макромолекулярного состава плазмы (табл. 1).

Таблица 1

Реологические и биохимические показатели крови крыс

Показатели	Контроль	ВН	ВН+Д	Д
ВП, мПа·с	1,19 (1,18:1,22)	1,18 (1,18:1,20)	1,22 ^a (1,19:1,24)	1,21 ^a (1,20:1,22)
ВК ₁ , мПа·с	3,28 (3,27:3,35)	3,10 ^a (3,01:3,20)	2,99 ^a (2,89:3,08)	3,56 ^a (3,39:3,69)
ВК ₂ , мПа·с	5,55 (5,16:5,68)	3,66 ^a (3,36:3,89)	5,15 ^a (4,57:5,36)	5,68 ^a (5,59:5,98)
Гематокрит, %	42,7 (42,2:43,0)	39,15 ^a (38,0:39,95)	38,2 ^a (37,9:39,0)	41,6 (40,90:42,50)
ИА 600с ⁻¹ (5), отн. ед.	1,0 (0,9:1,2)	2,1 ^a (1,7:2,5)	8,9 ^a (7,4:9,2)	5,7 ^a (3,2:7,0)
ИА 600с ⁻¹ (10), отн. ед.	2,80 (2,6:3,1)	6,5 ^a (5,5:7,6)	25,7 ^a (19,8:26,6)	8,0 ^a (6,1:10,4)
ИА 3с ⁻¹ (5), отн. ед.	4,8 (4,5:5,3)	5,8 (4,7:6,3)	13,8 ^a (10,5:14,7)	16,7 ^a (13,1:18,1)
ИА 3с ⁻¹ (10), отн. ед.	16,0 (14,6:17,0)	15,9 (14,1:16,8)	42,7 ^a (36,4:45,2)	21,0 ^a (17,3:23,4)
D ₅	5,00 (3,20:5,50)	2,39 ^a (2,18:2,42)	1,47 ^a (1,18:1,65)	2,7 ^a (2,0:3,4)
D ₁₀	5,92 (4,71:6,30)	2,27 ^a (2,00:2,34)	1,73 ^a (1,52:1,83)	2,6 ^a (2,0:3,7)
Фибриноген, г/л	1,65 (1,56:1,76)	1,65 (1,57:1,81)	2,52 ^a (2,36:3,1)	1,72 (1,60:1,92)
ГАГ, ед. опт. пл.	0,29 (0,21:0,32)	0,31 (0,24:0,40)	0,87 ^a (0,76:0,91)	0,41 ^a (0,39:0,55)
Общий белок, г/л	66,0 (63,75:66,70)	68,0 (65,3:69,0)	67,0 (66,0:68,0)	65,2 (63,70:66,40)
Осмоляльность плазмы, мосм/кг	297 (295:300)	322 ^a (319:324)	322 ^a (313:325)	297 (295:301)

Примечание: ^a – различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,001).

Во второй экспериментальной серии исследовали изменение реологических свойств крови при состоянии объемного и осмотического сдвига при искусственном поддержании в активности антидиуретического звена регуляции водного баланса, которое моделировали введением десмопрессина в сочетании с водной нагрузкой большого объема. В данном случае гормон через V2-рецепторы увеличивает проницаемость собирательных трубок и осмотически свободная вода реабсорбируется в кровь, а не экскретируется с мочой, что, в свою очередь, создает напряжение системы осморегуляции организма в целом [4]. Именно эта реакция на АДГ лежит в основе гипонатриемии, которая возникает у ряда пациентов и является следствием неадекватной секреции АДГ – например, при декомпенсации сердца (застой крови), имитирующей дефицит крови. Так возникает «ошибка регуляции», которая способствует развитию гиперволемии и отеков [5, 7, 8].

Поскольку при окончании действия десмопрессина период задержки воды сменялся полиурией, причем время ингибирования выведения воды в ходе эксперимента постепенно сокраща-

лось, через 24 ч после очередного экспериментального воздействия признаки гипергидратации организма, как и в первом случае, отсутствовали (табл. 1). Поэтому в данной экспериментальной серии исследовали эффект длительного периодического состояния напряжения осморегулирующей системы организма.

При анализе образцов крови животных было выявлено существенное возрастание агрегационной способности эритроцитов. Увеличение ИА по сравнению с группой контроля (в 7 раз, $p < 0,001$) отмечено как при измерении в стазе после высокосдвиговых вращений, так и в низкосдвиговом режиме (более чем в 2,5 раза, $p < 0,001$). Изменение расчетных динамических параметров D_5 и D_{10} , которые можно рассматривать в качестве индикаторов влияния условий течения на процесс агрегатообразования для нативной крови, свидетельствует о том, что по сравнению с контрольной группой влияние приложенных сдвиговых усилий на процесс объединения эритроцитов в агрегаты ослабевает. Другими словами, снижается значение внешних сил, способствующих взаимодействию клеток, чему в норме отводится определяющая роль в поддержании баланса

Таблица 2

Лейкоформула крыс в контроле и после 6 суток экспериментального воздействия

Показатель	Лейкоциты, $10^9/л$	Палочкояд. нейтр., %	Сегмент. нейтр., %	Эозинофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %
Контроль (n=15)	6,40±0,11	0,79±0,26	16,06±2,03	1,31±0,42	1,81±0,24	79,90±2,23
ВН+Д (n=15)	7,54±0,19*	1,95±0,21*	29,93±1,74*	0,18±0,12*	2,00±0,38	65,73±1,99*

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

динамического процесса «агрегация-деагрегация». При повышении прочности агрегатов и, как следствие, росте предела текучести крови необходимо увеличение сил гидродинамической деагрегации эритроцитов, что приводит к повышению артериального давления и, как следствие, адаптивным перестройкам в стенке сосудов [10]. Известно также, что в микроциркуляторном русле интенсивное агрегатообразование может иметь тяжелые последствия, связанные с закупориванием клеточными конгломератами отдельных сегментов и перфузией других практически обесклеточенной плазмой. И в том, и в другом случае происходят серьезные нарушения транспорта субстратов метаболизма к соответствующим тканевым регионам [13, 16]. Следует также учитывать, что любая стимуляция эритроцитов к агрегации повышает коагуляционный потенциал крови [14, 20], оказывает влияние на маргинализацию и адгезию лейкоцитов [17], меняет интенсивность механического воздействия потока крови на стенку сосудов [12].

При анализе факторов, способных стимулировать агрегатообразование эритроцитов, выявлено, что под влиянием длительного воздействия водной нагрузки в сочетании с десмопрессином в сыворотке значительно повышается концентрация фибриногена и кислых ГАГ ($p < 0,0001$). Прирост концентрации ГАГ составлял 172-210%, что, по-видимому, отражает процессы деградации тканевых протеогликанов. Известно, что в процессе осморегуляции гормон способен активировать ферменты, дезинтегрирующие матрикс и, тем самым, существенно влиять на перераспределение воды между кровью и интерсти-

циальной жидкостью [2, 9, 19]. В свою очередь, попадая через лимфатический дренаж в кровеносное русло, ГАГ проявляют выраженную гемореологическую активность [3]. Так, корреляционная связь между концентрацией ГАГ в крови и степенью агрегации клеток была достаточно тесной. Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,712 при $p < 0,001$.

Другим важным параметром, определяющим гемореологический статус организма, является содержание фибриногена. Очевидно, что гиперфибриногемия увеличивает выраженность реологических нарушений [16]. При этом необходимо отметить, что факт параллельного увеличения концентрации в крови фибриногена и ГАГ имеет место при ряде патологических состояний. Специфическому связыванию этих макромолекул в крови придается большое значение в образовании фибрина и его полимеризации при формировании тромба, в процессе заживления ран, роста опухоли и др. [15]. Выявленные сдвиги в макромолекулярном составе, вероятно, стали причиной повышения вязкости плазмы, о чем свидетельствует тесная корреляционная зависимость между величиной ВП и концентрацией ГАГ ($r_s = 0,767$ при $p < 0,001$) и фибриногена ($r_s = 0,657$ при $p < 0,001$). Важно заметить, что в клинической ситуации гемореологический эффект АДГ может быть усилен его сосудосуживающим действием, отсутствующим у десмопрессина [4].

Таким образом, в целом, характер отмеченных гемореологических перестроек носил черты неспецифической гематологической стресс-реакции, имеющей место при большом числе заболеваний различного генеза, включающих

такие типовые патологические процессы как воспаление, кровопотеря, шок, ДВС-синдром и другие [7, 8, 18]. О ее развитии свидетельствуют и заметные изменения в лейкоцитарной формуле (табл. 2). В крови самцов опытной группы после 6 суток эксперимента отмечали некоторое увеличение количества лейкоцитов ($p < 0,01$), палочкоядерных нейтрофилов ($p < 0,01$), сегментоядерных нейтрофилов ($p < 0,01$). Отмечали достоверное снижение количества лимфоцитов ($p < 0,01$).

Однако, несмотря на резкое увеличение степени агрегации эритроцитов и повышение вязкости плазмы, величина вязкости цельной крови не превышала таковой в группе интактных животных, что связано со значительным снижением гематокритного показателя (17%, $p < 0,001$) (табл. 1). На всех этапах эксперимента отмечали выраженное снижение числа эритроцитов. Факт снижения концентрации эритроцитов на фоне значительных отклонений других реологических показателей (гиперфибриногенемия, повышение вязкости плазмы, усиленное агрегатообразование) отмечен при целом ряде патологических состояний. Усиление элиминации клеток из сосудистого русла имеет место, например, при ревматоидном артрите, ряде онкологических заболеваний, и связано в одних случаях с нарушением метаболизма, вызванного действием продуктов клеточного распада или дефектами капиллярного ложа, в других – с гиперреактивностью ретикулоэндотелиальной системы, и часто трактуется как компенсаторная реакция в ответ на начавшееся увеличение вязкости крови [5]. В данном случае наблюдаемое в эксперименте уменьшение количества

эритроцитов в объеме крови ($p < 0,0001$), по-видимому, явилось следствием элиминации из сосудистого русла преимущественно старых клеток как менее резистентных к длительным периодическим гипоосмотическим воздействиям.

Изолированное введение десмопрессина в третьей экспериментальной серии также не вызывало заметных отклонений водно-электролитного гомеостаза. Величина осмоляльности плазмы и гематологические показатели не отличались от значений группы контроля. Вместе с тем, в плазме отмечено некоторое повышение концентрации кислых ГАГ. Незначительно, но статистически достоверно возросла агрегационная способность эритроцитов (табл. 1).

Выводы

Таким образом, на основании полученных в эксперименте данных можно утверждать, что стимуляция специфических вазопрессиновых рецепторов при введении десмопрессина приводит к усилению агрегатообразования эритроцитов, что при физиологических условиях играет важную роль в поддержании оптимальных гемодинамических условий в микроциркуляторной системе и модуляции физиологических гемостатических процессов. Сохраняющийся в течение суток гемореологический эффект после введения гормона свидетельствует о наличии каскада тесно сопряженных реакций между клетками в сосудистом русле и интерстициальном матриксе, вызванных действием гормона.

Гемореологический эффект длительного периодического состояния напряжения осморегулирующей системы организма, моделируемого введением

десмопрессина в сочетании с водной нагрузкой, приводит к развитию общей неспецифической гематологической стресс-реакции, заключающейся в усилении агрегатообразования эритроцитов, гиперфибриногенемии, повышении вязкости плазмы. Изменения реологических свойств крови при этом сочетались со сдвигами в лейкоцитарной формуле.

Выявленные закономерности могут иметь важное теоретическое и практическое значение, поскольку усиление секреции АДГ имеет место не только под воздействием осмотических стимулов, но и является следствием стресса, гипоксии, гипотонии, и, в целом, это достаточно частое событие при огромном числе патологических процессов, наличие гемореологических нарушений при которых рассматривается в качестве важного фактора патогенеза (кровопотеря, шок, ожоговая травма, острый болевой синдром, воспалительный процесс, сахарный диабет и др.) [10]. Таким образом, проблема изучения влияния АДГ на реологические свойства крови является актуальной, решение ее позволило бы расширить возможности управления микроциркуляцией при гемодинамических и метаболических сдвигах в организме.

Список литературы

1. **Акмаев И.Г., Гриневич В.В.** Нейроиммуно-эндокринология гипоталамуса. - М.: Медицина. 2003. 168 с.
2. **Банин В.В.** Механизмы обмена внутренней среды. - М.: Издательство РГМУ. 2000. 278 с.
3. **Бычков С.М., Кузьмина С.А.** Действие протеогликанов на эритроциты в циркулирующей крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. № 3. С. 240-242.
4. **Григорьев А.И., Ларина И.М., Доброхотов И.В., Буравкова Л.Б.** Роль ренин-альдостероновой системы в реакции осморегуляции здоровых добровольцев на десмопрессин // Физиология человека. 2005. Т. 31. № 5. С. 110-116.
5. **Левтов В.А., Резирер С.А., Шадрин Н.Х.** Реология крови. - М.: Медицина. 1982. 272 с.
6. **Наточин Ю.В., Григорьев А.И., Буравкова Л.Б. и др.** Антидиуретическая реакция почек человека и крысы при пероральном введении аргинин-вазопрессина и десмопрессина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. № 2. С. 184-192.
7. **Практическая трансфузиология / под ред. Г.И. Козинца.** - М.: Изд-во Триада-Х. 1997. 435 с.
8. **Селезнев С.А., Назаренко Г.И., Зайцев В.С.** Клинические аспекты микрогемодинамики. - Л.: Медицина. 1985. 208 с.
9. **Финкинштейн Я.Г.** Роль осморегулирующей системы в патогенезе отеков // Терапевтический архив. 1990. Т. 62. № 12. С. 122-124.
10. **Фирсов Н.Н., Джанашия П.Х.** Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию. - М.: ГОУ ВПО. 2004. 258 с.
11. **Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В.** Микроциркуляция. - М.: Медицина. 1984. 432 с.
12. **Baskurt O.K., Meiselman H.J.** Blood Rheology and Hemodynamics // Semin. Thromb. Hemost. 2003. Vol. 29. P. 435-450.
13. **Baskurt O.K.** Pathophysiological Significance of Blood Rheology // Turk J. Med. Sci. 2003. Vol. 33. P. 347-355.
14. **Hathcock J.J.** Flow Effects on Coagulation and Thrombosis // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2006. Vol. 26. P. 1729-1741.
15. **Le Boeuf R.D., Raja R.H., Fuller G.M., Weigel P.H.** Human Fibrinogen Specifically Binds Hyaluronic Acid // The Journal of Biological Chemistry. 1986. Vol. 261 (27). P. 12586-12592.
16. **Martinse Silva J., Saldanha C.** Factores de Risco Cardiovascular: Componentes Hemorreológicos e Hemostasiológicos // Rev. Port. Cardiol. 2007. Vol. 26 (2). P. 161-182.
17. **Pearson M.J., Lipowsky H.H.** Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2000. Vol. 279. P. H1460-H1471.
18. **Pries A.R., Secomb T.W.** Rheology of the microcirculation // Clinical Hemorheology and Microcirculation. 2003. Vol. 29. P. 143-148.

19. *Reed R.K., Laurent U.B.* Turnover of hyaluronan in the microcirculation // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992. Vol. 146 (5 Pt 2). P. 37-39.
20. *Turitto V.T., Hall C.L.* Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis // *Thrombosis Research.* 1998. Vol. 92 (6). P. 25-31.
21. *Verbalis J. G., Dohanics J.* Vasopressin and oxytocin secretion in chronically hypoosmolar rats // *Amer. J. Physiol.* 1991. Vol. 261. P. R1028-R1038.
22. *Verbalis J.G.* Whole-body volume regulation and escape from antidiuresis // *Am. J. Med.* 2006. Vol. 119(7). P. S21-9.
23. *Weitzman R.E., Reviczky A., Oddie T.H., Fisher D.A.* Effect of osmolality on arginine vasopressin and renin release after hemorrhage // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1980. Vol. 238. P. E62-E68.
24. *Windberger U., Bartholovitsch A., Plasenzotti R., Korak K.J., Heinze G.* Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data // *Exp. Physiol.* 2003. Vol. 88. P. 431-440.

Experimental research of the role of the antidiuretic hormone in mechanism of hemorheological alterations

N.P. Zdyumaeva

Rheological properties of blood were studied at test model reproducing the conditions with changes of antidiuretic component activity, water balance regulation by constant water loading and injection of ADH analogue – desmopressin. It was shown that in conditions of considerable functional tension, ADH promotes the development of general non specific blood stress-reaction of adaptive character. Possible mechanism of hemorheological alterations with ADH participation is discussed.

Key words: rheological properties of blood, antidiuretic hormone (ADH), desmopressin, water loading, rats.

Изучение развития туберкулезного процесса на модели морских свинок, инфицированных мутантными по RD-1 региону микобактериями

Ю.М. Мясоедов¹, В.В. Пузанова²

¹ – ФГУП «Курская биофабрика», Курск

² – ОБУЗ «Областная наркологическая больница», Курск

Контактная информация: Мясоедов Юрий Михайлович, MyasoedovYurij@yandex.ru

В исследовании представлены результаты оценки развития туберкулёзного процесса на модели морских свинок, инфицированных микобактериями, мутантными по RD-1 региону. Установлено, что инфекционный процесс сопровождается частичным угнетением гемопоэтической функции костного мозга (тромбоцитов, лимфоцитов). А при инфицировании *M. avium* – также и лейкоцитов. Постановка туберкулинового теста после инфицирования морских свинок *M. bovis* характеризуется более выраженной эозинофильной реакцией, *M. avium* – ростом нейтрофилов и моноцитов при снижении уровня лимфоцитов.

Ключевые слова: морские свинки, мутантные микобактерии, туберкулиновая проба, гематологический анализ.

Введение

Туберкулёз животных является инфекционным заболеванием, широко распространённым во всём мире, причиняющим значительный экономический ущерб животноводству и представляющим эпидемиологическую опасность для человека. Существующие методы борьбы с инфекцией направлены на предупреждение заноса возбудителя в хозяйства, формирование устойчивого к возбудителю поголовья, выявление инфицированных животных с последующим их уничтожением [11].

При этом меры борьбы с заболеванием базируются на результатах изучения патогенеза инфекционного процесса, в частности – механизмов, сопряженных с иммунными [8, 10]. Так, например, изучение иммунологических механиз-

мов при туберкулёзе привело к разработке аллергического метода диагностики и его вариантов, являющегося первым этапом при проведении скрининга [6]. Изучение патогенеза туберкулёза, в основном, осуществляется при использовании полевых или лабораторных изолятов микобактерий с различными вирулентностью и интенсивностью развития инфекции в период в период до 3 мес. [2], вследствие чего изучение начального этапа инфекционного процесса, имеющего ключевое значение в формировании защитных механизмов и дальнейшего развития заболевания по прогрессивному или регрессивному пути, является затруднительным [9].

Поэтому изучение начального этапа туберкулёзного процесса целесообразнее осуществлять на биомоделях с

низкой интенсивностью течения заболевания. В свою очередь, исследование туберкулезного процесса, характеризующегося низкой интенсивностью, возможно при использовании микобактерий, мутантных по RD-1 региону, например, *M. bovis* штамм BCG и *M. avium* штамм 2282. Принимая во внимание вышеизложенное, **целью** исследования было изучение развития туберкулезного процесса на модели морских свинок, инфицированных мутантными по RD-1 региону микобактериями.

Материалы и методы

В работе были использованы микобактерии бычьего вида: *M. bovis* штамм BCG и микобактерии птичьего вида *M. avium* штамм 2282, мутантные по RD-1 региону [4]. Микобактерии культивировали на картофельной среде Павловского в течение 25 суток при температуре 37°C, после чего приготавливали суспензии на физиологическом растворе, для инфицирования морских свинок, в дозах: *M. bovis* – 0,2 мг/0,1 см³, внутрикожно; *M. avium* – 3 мг/0,5 см³, внутримышечно. Использование данных дозировок и путей введения микобактерий в организм лабораторных животных было отработано ранее, как обеспечивающее низкую интенсивность развития инфекционного процесса. Через 30 дней после инфицирования животных использовали в опытах.

В исследовании были использованы беспородные самки морских свинок массой 500±100 г, одновременно полученные из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, филиал «Андреевка». Животных содержали в вольерах, на стандартном рационе кормления, с использованием гранулированного корма. Перед зара-

жением морских свинок тестировали на туберкулез аллергическим способом с использованием ППД туберкулина в дозе 5 IU [6].

Развитие туберкулезного процесса оценивали по гематологическим показателям с помощью анализатора Abacus Junior B 12, согласно инструкции производителя, по следующим критериям: содержание лейкоцитов, содержание эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, широта распределения эритроцитов, содержание тромбоцитов, тромбоцитрит, средний объем тромбоцитов, широта распределения тромбоцитов [1]. Содержание нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, эозинофилов оценивали методом микроскопии, в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза [3]. Образцы крови для осуществления аппаратного анализа отбирали в пластиковые пробирки Microvette с ЭДТА в количестве 200 мкл из сердца, однократно, для исключения влияния многократного отбора крови на результат экспериментов. Интенсивность развития туберкулезного процесса оценивали аллергической пробой с использованием ППД туберкулина для млекопитающих и ППД для птиц, производства ФГУП «Курская биофабрика».

Аллергены вводили в дозах: ППД для млекопитающих – 25 IU/0,1 см³ и 5 IU/0,1 см³; ППД для птиц – 100 IU/0,1 см³ и 10 IU/0,1 см³. Разведения туберкулинов осуществляли на растворителе микобактериальных аллергенов.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили стандартными методами [5].

Результаты и их обсуждение

Проведение исследования включало два этапа. При реализации первого этапа осуществлялся анализ развития туберкулёзного процесса у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium* по гематологическим показателям и интенсивности аллергической реакции. На втором этапе проводился сравнительный анализ результатов, полученных на морских свинках, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, между собой.

В исследовании всего было использовано 40 морских свинок, распределённых на 5 групп по 8 особей в каждой. Первая группа являлась контрольной, заражение которой не проводилось; вто-

рую и третью группы инфицировали микобактериями бычьего вида; четвёртую и пятую группы инфицировали микобактериями птичьего вида. Результаты изучения гематологических показателей у морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis*, представлены в табл. 1.

Анализ гематологических показателей у морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis*, продемонстрировал, что спустя 1 мес. после заражения количество лимфоцитов не отличается от контрольного значения, в то время как после последующей постановки аллергической пробы происходит достоверное сни-

Таблица 1
Гематологические показатели морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis* штамм ВСГ

Показатель	M±m		
	I группа	II группа	III группа
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	15,90±1,27	14,56±2,00	13,10±0,72*
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,57±0,13	5,91±0,11	5,63±0,25
Концентрация гемоглобина, г/л	143,86±1,43	150,29±2,97	145±5,40
Гематокрит, %	43,04±0,76	46,32±0,93	44,19±1,93
Средний объём эритроцитов, мм ³	77,38±0,78	78,29±0,71	78,5±0,57
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	25,86±0,39	25,41±0,24	25,83±0,30
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	334,63±2,71	324,43±1,15	328,3±3,64
Широта распределения эритроцитов	12,89±0,15	12,99±0,08	13,03±0,18
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	156,0±12,0	125,0±15,0*	85,0±10,0*
Тромбокрит, %	0,81±0,061	0,65±0,03*	0,44±0,03*
Средний объём тромбоцитов, мм ³	5,83±0,08	5,67±0,11	5,71±0,12
Широта распределения тромбоцитов	35,56±0,40	34,64±0,33	35,08±0,49
Нейтрофилы, %	40,88±6,40	52,38±2,25*	40,63±6,48
Моноциты, %	3,13±0,67	5,5±1,41*	4,63±1,34
Лимфоциты, %	54,75±6,67	39,88±2,92*	52,63±6,19
Эозинофилы, %	1,25±0,37	2,25±0,65*	2,13±0,58*

Примечание: I группа – не инфицированные животные; II группа – животные через 30 суток после инфицирования; III группа – инфицированные животные после постановки туберкулинового теста;

* – разница достоверна при $p < 0,05$.

жение числа лейкоцитов. Изучение содержания тромбоцитов как через 30 суток после инфицирования, так и после постановки туберкулинового теста продемонстрировало достоверное снижение. Определение содержания нейтрофилов продемонстрировало их повышение спустя 1 мес. после инфицирования и соответствие контрольному уровню после постановки туберкулинового теста. При исследовании содержания моноцитов было выявлено их увеличение по сравнению с контрольным значением через 30 суток после инфицирования и соответствие контрольному значению после последующей постановки теста ГЗТ. Изучение содержания лимфоци-

тов продемонстрировало снижение их количества через 1 мес. после заражения и соответствие контрольному значению после постановки аллергического теста. Определение содержания эозинофилов показало их повышение после инфицирования на 30 сутки и постановки аллергической пробы.

Изучение остальных гематологических показателей у морских свинок, инфицированных *M. bovis*, не продемонстрировало достоверных изменений как после инфицирования, так и после постановки туберкулиновой пробы.

Результаты изучения гематологических параметров крови морских свинок, инфицированных микобактериями *M. avium*, представлены в табл. 2.

Таблица 2
Гематологические показатели морских свинок, инфицированных микобактериями *M. avium* штамм 2282

Показатель	M±m		
	I группа	IV группа	V группа
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	15,90±1,27	13,09±1,29*	13,55±1,27*
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,57±0,13	5,67±0,11	4,94±0,28
Концентрация гемоглобина, г/литр	143,86±1,43	144,25±1,71	130,86±5,94
Гематокрит, %	43,04±0,76	43,98±0,57	38,85±1,87
Средний объём эритроцитов, мм ³	77,38±0,78	77,75±0,94	79,14±1,45
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	25,86±0,39	25,49±0,35	26,64±0,47
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/литр	334,63±2,71	328,25±1,73	337,29±2,46
Широта распределения эритроцитов	12,89±0,15	12,86±0,12	13,01±0,10
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	156,0±12,0	87,0±10,0*	90,0±12,0*
Тромбокрит, %	0,81±0,061	0,34±0,02*	0,37±0,01*
Средний объём тромбоцитов, мм ³	5,83±0,08	5,54±0,05	5,46±0,10
Широта распределения тромбоцитов	35,56±0,40	34,43±0,32	33,8±0,15
Нейтрофилы, %	40,88±6,40	50,71±6,30*	57,86±5,17*
Моноциты, %	3,13±0,67	5,71±0,84*	5,86±1,10*
Лимфоциты, %	54,75±6,67	41,57±6,89*	43,57±6,20*
Эозинофилы, %	1,25±0,37	2,00±0,62*	1,71±0,36

Примечание: I группа – не инфицированные животные; IV группа – животные через 30 суток после инфицирования; V группа – инфицированные животные после постановки туберкулинового теста;

* – разница достоверна при $p < 0,05$.

Анализ гематологических показателей морских свинок, инфицированных *M. avium*, продемонстрировал, что через 1 мес. после заражения и постановки аллергической пробы происходит достоверное снижение уровня лейкоцитов. Анализ содержания тромбоцитов продемонстрировал их достоверное снижение через 1 мес. после инфицирования и постановки туберкулинового теста. Определение количества нейтрофилов через 30 суток после инфицирования и последующей постановки аллергической пробы выявило их увеличение. Исследование содержания моноцитов после инфицирования животных и постановки туберкулинового теста показало их увеличение. Анализ содержания лимфоцитов показал их снижение как после инфицирования, так и после постановки аллергической пробы. Изучение содержания эозинофилов выявило их повышение через 1 мес. после инфицирования и снижение до контрольного уровня после постановки аллергической пробы.

Изучение остальных гематологических показателей не продемонстрировало достоверных изменений как после инфицирования, так и после постановки туберкулиновой пробы.

Результаты постановки аллергической пробы с ППД туберкулинами в

группах морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, представлены в табл. 3.

Из результатов постановки аллергической пробы, полученных в группах морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, видно, что интенсивность аллергических реакций на используемые дозы ППД туберкулинов превышает 5 мм, что свидетельствует о развитии туберкулёзного процесса [6], в то же время размер реакций соответствовал интервалу 8-25 мм, при наличии достоверного различия между большими и малыми дозировками, что является показателем развития заболевания без прогрессирования [1].

Анализ развития туберкулёзного процесса у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, продемонстрировал как сходства, так и различия по гематологическим критериям. Так, в опытах на морских свинках, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, выявлено достоверное снижение количества лейкоцитов в крови после постановки аллергической пробы, в то время как снижение числа лейкоцитов после инфицирования на 30 сутки было выявлено только у морских свинок, заражённых *M. avium*. Определение содержания тромбоцитов показало их снижение на

Таблица 3

Результаты аллергической пробы с использованием ППД туберкулинов на морских свинках, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*

Показатель	Животные инфицированные			
	<i>M. bovis</i>		<i>M. avium</i>	
Аллерген	ППД для млекопитающих		ППД для птиц	
Дозы туберкулина, IU	25	5	100	10
M±m	18,75±0,76	16,13±0,68*	16,64±0,62	10,36±1,80*

Примечание: * – разница достоверна при $p < 0,05$.

30 день после инфицирования и постановки аллергической пробы у морских свинок, инфицированных как *M. bovis*, так и *M. avium*. Исследование содержания нейтрофилов у животных, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, показало достоверное их увеличение через 30 суток после инфицирования, при этом увеличение числа нейтрофилов у морских свинок, инфицированных *M. avium*, также выявлено и после постановки туберкулинового теста.

Анализ содержания моноцитов продемонстрировал их увеличение через 1 мес. после инфицирования у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, в то время как после постановки аллергической пробы увеличение было зарегистрировано лишь в группе морских свинок, инфицированных *M. avium*. Сопоставление содержания лимфоцитов у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, на 30 день после инфицирования выявило их снижение, при этом достоверно низкий уровень также был выявлен после постановки туберкулинового теста в группе морских свинок, инфицированных *M. avium*.

Исследование содержания эозинофилов показало их достоверное увеличение через 1 мес. после инфицирования в обеих экспериментальных группах (как *M. bovis*, так и *M. avium*), в то время как после постановки туберкулинового теста увеличение числа эозинофилов было выявлено только у морских свинок, инфицированных *M. bovis*.

На основании полученных данных можно судить как о сходстве, так и о различиях гематологических характеристик морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium* через 30 суток после инфицирования и последующей

постановки аллергической пробы, что обусловлено использованием разных видов мутантных микобактерий. Так, известно, что морские свинки чувствительны к полевым изолятам микобактерий *M. bovis*, не содержащих мутацию в регионе RD-1 и вызывающих патологический процесс с системным поражением организма, но относительно устойчивы к микобактериям *M. avium*, что, вероятно, обусловлено молекулярными рецепторными механизмами, обуславливающими взаимодействие макрофагов и поступивших микобактерий [4]. Вместе с тем, независимо от степени патогенности микобактерий, в организме лабораторных животных развивается воспалительный процесс, сопровождающийся формированием классического иммунного ответа IV типа, что, в свою очередь, возможно, обусловлено наличием общих родовых антигенов у микобактерий *M. avium* [7].

Выводы

Инфицирование морских свинок микобактериями *M. bovis* и *M. avium*, мутантными по RD-1 региону, сопровождается развитием инфекционного процесса и состояния гиперчувствительности замедленного типа с различными гематологическими изменениями. Через 1 мес. после заражения животных микобактериями *M. bovis* и *M. avium* происходит достоверное увеличение числа нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов. При этом у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, выявлено достоверное снижение тромбоцитов, лимфоцитов, а у морских свинок, зараженных *M. avium*, – лейкоцитов. После постановки туберкулинового теста в группе морских свинок, инфицированных *M. bovis*,

достоверно увеличивается количество эозинофилов; в группе морских свинок, инфицированных *M. avium*, – нейтрофилов и моноцитов. У морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis* и *M. avium*, после постановки туберкулинового теста достоверно уменьшается число лейкоцитов и тромбоцитов, а у животных, заражённых *M. avium*, понижается число лимфоцитов.

Список литературы

1. Гематологический анализатор Abacus Junior B12. Руководство пользователя. Версия 1.1. 60 с.
2. Гращенкова О.В., Зыков М.П. Оценка вирулентности микобактерий туберкулёза с помощью внутримозгового заражения морских свинок // Проблемы туберкулёза. 1985. № 8. С. 56-59.
3. Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И. и др. // Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. - М.: Колос. 2004. С. 52-55.
4. Литвинов В.И. Латентная туберкулёзная инфекция – миф или реальность? // Туберкулёз и болезни лёгких. 2011. № 6. С. 3-9.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа. 1990. С. 50-51.
6. Наставление по диагностике туберкулёза животных. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 18 ноября 2002 г. - М. 2002. 63 с.
7. Фрадкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены. - М.: Медицина. 1990. С. 52-53.
8. Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Ант А.С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулёза на экспериментальных моделях // Туберкулез и болезни лёгких. 2012. № 7. С. 3-11.
9. Frank J.T. Griffin, Colin G. Mackintosh, Glenn S. Buchan. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines // Trends in Microbiology. Vol. 3. N 11. November 1995.
10. John B. Kaneene, Charlos O. Thoen. Tuberculosis // Vet. Med. Today: Zoonosis Update. JAVMA. Vol. 224. N 5. March 1. 2004. P. 685-691.
11. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. - Paris. 2010.

The study of development of tubercular process on model of guinea pigs infected with mycobacterium with mutated RD-1 region

Y.M. Myasoedov, V.V. Puzanova

The results of this study are shown an estimation of the development of tubercular process on the model of guinea pigs infected mycobacterium submitted to mutations on the RD-1 region. It was established, that the infectious process, based on the hematological parameters, differs from animals infected with *M. bovis* to animals infected with *M. avium*.

Key words: guinea pigs, mutant mycobacterium, tuberculin test, hematological analysis.



Влияние рецептуры МиоАктив на гормональный статус лабораторных животных

В.Н. Каркищенко, О.В. Алимкина, Ю.В. Фокин

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

Контактная информация: д.м.н., проф. Каркищенко Владислав Николаевич, scbmt@yandex.ru

Исследовано влияние рецептуры МиоАктив на гормональный статус лабораторных крыс линии WAG/GY и мини-свиней светлогорской популяции. У всех животных отмечается возрастание уровня инсулина, тенденция к повышению уровня кортизола и серотонина, а также тестостерона в крови самцов мини-свиней. У самок крыс содержание последнего гормона остается постоянным на протяжении эксперимента. Данные гормональные изменения свидетельствуют об улучшении энергообеспечения мышечной деятельности и повышении работоспособности и выносливости организма в условиях высоких физических нагрузок. МиоАктив не оказывает влияния на секрецию эстрадиола, нормальное протекание полового цикла и на половые железы животных. Указанные эффекты сохраняются, как минимум, в течение 7 дней после окончания курса потребления рецептуры.

Ключевые слова: МиоАктив, гормоны, инсулин, кортизол, серотонин, тестостерон, эстрадиол, лабораторные животные, крысы, мини-свиньи.

Введение

Под влиянием интенсивных физических и психоэмоциональных нагрузок у спортсменов происходит повышенное расходование энергетических и пластических ресурсов, минералов, витаминов и других жизненно важных веществ. По этой причине в организме замедляются восстановительные и адаптационные реакции, что может привести к снижению работоспособности, ускоренному износу всех систем организма, а в итоге – к утрате спортивных результатов и серьезным нарушениям здоровья. Полно-

ценное сбалансированное питание является одним из важнейших компонентов медико-биологического обеспечения тренировочного процесса и соревновательной деятельности. В настоящее время специальное и спортивное питание является базовой основой и первой фазой фармакологического обеспечения спортсмена.

МиоАктив – это специально разработанный комплексный высокобелковый полностью растворимый продукт, предназначенный для профессиональных спортсменов. Он представляет собой

концентрированный комплекс основных жизненно необходимых пищевых и биологически активных веществ, улучшающих способность человека переносить физические и психоэмоциональные нагрузки. Белковые, полипептидные и аминокислотные компоненты имеют животное происхождение и получают путем ферментации и гидролиза белков сыворотки молока, мяса крупного рогатого скота и птицы.

За счет современных технологий производства аминокислотный, витаминный, макро- и микроэлементный состав МиоАктива оптимизирован с учетом метаболизма человека, подверженного высоким физическим нагрузкам.

Компоненты продукта подобраны таким образом, что при его употреблении в организме человека, подверженного повышенным нагрузкам, проявляются как быстрые, так и пролонгированные положительные физиологические и биохимические эффекты, что сказывается не только на повышении выносливости и работоспособности, но и на скорости восстановления после перенесенных нагрузок.

В состав МиоАктива входят хелатные соединения. Большинство неорганических соединений микроэлементов нестабильны [15, 16]. Хелатные соединения легко усваиваются, и организм при необходимости может без вреда для себя переносить большие дозы микроэлементов, которые при потреблении в виде неорганических солей являются токсичными [16]. Механизм положительного влияния микроэлементов в хелатной форме связан с тем, что они имеют меньшую реакционную способность по сравнению с ионами металлов, что исключает образование неусваиваемых

или мало усваиваемых соединений и обеспечивает более активное включение в соответствующие биологические циклы и большие сроки сохранности обогащенных ими продуктов. Хелатные комплексы способны не только активизировать в организме важнейшие ферментные системы, но и оказывают стимулирующее действие на синтез белка, обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами, способствуют уменьшению интоксикации организма тяжелыми металлами [10].

Целью настоящей работы была оценка влияния рецептуры МиоАктив на гормональный статус мелких (крыс) и крупных (мини-свиней) лабораторных животных.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Тестировались самки крыс линии WAG/GY в возрасте 3 мес., по 10 особей в контрольной и 20 особей в опытной группах, а также 6 самцов мини-свиней светлогорской популяции в возрасте 8-14 мес. (только опытная группа).

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 N 61 – ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for

Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [3, 13]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией НЦБМТ ФМБА России.

Карантин. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина [1].

Кормление и содержание. Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». Крысы содержались в вентилируемых клетках «RairIsoSystem», группами по 5 особей, мини-свиньи – в индивидуальных станках [9]. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных живот-

ных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания поддерживался 12-часовой цикл освещения [5].

Тестируемые вещества и временные интервалы исследования. Рецептура МиоАктив. Путь введения – потребление с кормом, в течение 21 суток.

Исследования проводили по окончании курса потребления рецептуры (на 21-й день эксперимента), а также спустя неделю (28-й день эксперимента), для выяснения следовых эффектов.

Взятие крови и получение сыворотки. По причине невозможности прижизненного взятия у крыс крови в необходимых объемах, в качестве объекта сравнения была сформирована контрольная группа животных. Часть животных (10 особей) была подвергнута эвтаназии на 21-й день, остальные – на 28-й день, с целью выявления остаточного эффекта рецептуры. Объектом сравнения результатов мини-свиней были собственные фоновые показатели.

Эвтаназию крыс осуществляли передозировкой эфирного наркоза, затем с помощью перерезания сонной артерии проводили забор крови. Кровь у мини-свиней брали из передней полой вены [2].

Сыворотку получали путем отстаивания цельной крови в течение 20 мин и центрифугированием при 3500 об./мин в течение 15 мин [4, 6, 8].

Методика анализа. Гормональные исследования проводили на автоматическом анализаторе фирмы «Chemwell», с помощью готовых наборов фирмы «DRG», по заданной программе, согласно прилагаемой инструкции.

Оценивали содержание в крови животных следующих гормонов: инсулин, кортизол, серотонин, тестостерон, эстрадиол.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования сыворотки крови крыс на содержание инсулина, кортизола, тестостерона, эстрадиола и серотонина представлены в табл. 1.

По данным табл. 1 можно заключить, что исследуемая рецептура способствует повышению уровня *инсулина* в крови животных. Так как инсулин является основным гормоном энергообмена, увеличение его количества напрямую связано с повышением работоспособности и выносливости организма в условиях высоких физических нагрузок.

По окончании курса потребления рецептуры МиоАктив содержание в крови *кортизола* выше по сравнению с таковым контрольной группы. Наибольшее количество этого гормона наблюдается на 21-й день эксперимента. К 28-му дню уровень кортизола незначительно сни-

жается, что говорит о накопительном эффекте рецептуры.

Основной функцией кортизола является повышение уровня глюкозы в крови, в том числе за счет ее синтеза из белковых предшественников, что позволяет существенно улучшить энергообеспечение мышечной деятельности.

Предполагают, что физическая активность увеличивает уровень *серотонина* в крови при умеренных физических нагрузках. Однако при чрезмерных нагрузках наступает утомление и, как следствие, истощение. Наблюдаемое повышение серотонина косвенно свидетельствует об отсутствии негативных последствий повышенной мышечной деятельности.

Исследование половых гормонов (*тестостерона и эстрадиола*) показало, что уровень тестостерона остается неизменным в обеих группах, что является нормой для самок. Снижение эстрадиола на 21-й день эксперимента связано с изменениями содержания этого гормона в зависимости от стадии полового цикла животных. Таким образом, рецептура МиоАктив не оказывает негативного влияния на половой цикл самок.

Результаты исследования сыворотки крови мини-свиней представлены в табл. 2.

Таблица 1
Содержание некоторых гормонов в крови крыс (в среднем по группе, $M \pm m$)

	Контроль	21-й день эксперимента	28-й день эксперимента
Инсулин, мкМЕ/мл	13,1±2,53	16,3±1,28	16,7±1,31
Кортизол, нг/мл	165,6±15,5	222,4±24,1	170,8±14,7
Серотонин, нг/мл	1290,7±93,2	1416,8±114,9	1338,3±115,8
Тестостерон, нг/мл	0,7±0,05	0,7±0,05	0,8±0,05
Эстрадиол, пг/мл	29,3±3,86	19,6±4,12	28,6±4,89

**Содержание некоторых гормонов в крови мини-свиней
(в среднем по группе, M±m)**

	Фоновые данные	21-й день	28-й день
Инсулин, мкМЕ/мл	14,3±1,65	15,4±0,63	15,0±0,59
Кортизол, нг/мл	60,4±5,20	71,4±3,80	68,8±0,70
Серотонин, нг/мл	1007,2±91,90	1209,9±15,50	1278,2±8,60
Тестостерон, нг/мл	1,9±0,50	2,8±0,57	2,6±0,36
Эстрадиол, пг/мл	134,6±7,39	136,9±12,47	129,7±1,58

По результатам, представленным в табл. 2, имеется незначительное повышение уровня инсулина на фоне применения данной рецептуры, что может свидетельствовать об увеличении выносливости животных, испытывающих высокие физические нагрузки.

Также наблюдается увеличение количества кортизола в крови к 21-му дню эксперимента, а к 28-му дню уровень этого гормона незначительно снижается, что может говорить о повышении работоспособности организма, так как кортизол увеличивает уровень глюкозы в крови.

Уровень серотонина в крови мини-свиней после окончания курса потребления исследуемой рецептуры также незначительно возрастает, этот эффект наблюдается и спустя неделю после окончания потребления, на 28-й день эксперимента, что указывает на отсутствие негативных последствий от чрезмерной мышечной деятельности.

После курсового потребления рецептуры МиоАктив отмечается увеличение количества тестостерона в крови животных, что свидетельствует о повышении работоспособности и выносливости, так как тестостерон противодействует отрицательному влиянию кортизола на белковый обмен. Основная его роль

заключается в индукции синтеза сократительных белков в мышцах, подвергающихся физической нагрузке. Спустя неделю происходит небольшое снижение данного показателя, однако содержание тестостерона в данный период по-прежнему выше, чем в фоновых измерениях.

Уровень эстрадиола незначительно колеблется в ходе эксперимента, но резких скачков не отмечается, что говорит о нормальном функционировании половых желез самцов.

Ранее в исследованиях, проводимых в нашем Центре, было обнаружено значительное возрастание физической выносливости [7-9, 14], повышение уровня глюкозы при одновременном снижении содержания молочной кислоты [12] в крови мелких и крупных лабораторных животных (крыс и мини-свиней) на фоне потребления рецептуры МиоАктив, что также является подтверждением позитивного действия данного продукта на организм животных.

Выводы

1. При потреблении рецептуры МиоАктив наблюдается возрастание уровня инсулина как у мелких (крыс), так и у крупных лабораторных животных (мини-свиней), что свидетельствует о по-

вышении работоспособности и выносливости организма в условиях высоких физических нагрузок.

2. При потреблении исследуемой рецептуры отмечается некоторое увеличение количества кортизола в крови мелких и крупных лабораторных животных, что является показателем улучшения энергообеспечения мышечной деятельности.

3. Повышение уровня серотонина в крови мелких и крупных лабораторных животных, наблюдаемое после курсового потребления тестируемого вещества, косвенно свидетельствует об отсутствии утомляемости как негативного последствия высоких физических нагрузок.

4. Уровень тестостерона у самок крыс в период исследования остается неизменным, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния рецептуры на функционирование желез внутренней секреции, а в крови самцов мини-свиней содержание этого гормона увеличивается, что говорит о повышении выносливости и работоспособности животных, получавших МиоАктив.

5. Изменение уровня эстрадиола у самок крыс в ходе эксперимента связано с нормальным протеканием полового цикла. МиоАктив не оказывает негативного влияния на половые железы животных. У самцов мини-свиней содержание эстрадиола незначительно колеблется, что также указывает на отсутствие какого-либо влияния исследуемой рецептуры на секрецию этого гормона.

6. Наблюдаемые положительные эффекты, связанные с выносливостью и работоспособностью организма, сохраняются, как минимум, в течение 7 дней после окончания курса потребления рецептуры.

7. Отсутствие достоверных различий между интактными животными и животными, получавшими рецептуру МиоАктив, свидетельствуют о нормальном функционировании эндокринной системы.

Список литературы

1. *Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л.* Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М. 2005. С. 41-54.
2. *Бабаян Э.А., Лепяхин В.К. и др.* Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств. Издание официальное. Часть 6. - М. 1986. С. 51-56.
3. *Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф.* Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. - М.: Наука. 1983. 190 с.
4. *Гацура В.В.* Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. - М.: Медицина. 1974. 143 с.
5. ГОСТ 12.1.005-88. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
6. *Камышников В.С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В-2х т. Т.1. - Мн.: Беларусь. 2000. 495 с.
7. *Капаназе Г.Д., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Станкова Н.В., Ревякин А.О., Степанова О.И., Вихрова Н.Я.* Экспериментальная оценка эффективности рецептуры «МиоАктив Форсаж» в условиях высоких физических нагрузок в тесте принудительного бега крупных лабораторных животных // Биомедицина. 2013. № 4. С. 60-65.
8. *Каркищенко В.Н., Берзин И.А., Касинская Н.В., Деньгина С.Е., Степанова О.И., Фокин Ю.В., Ревякин А.О., Капаназе Г.Д., Матвеев Е.Л.* Оценка физической выносливости мелких лабораторных животных на фоне применения спортивного питания «МиоАктив Форсаж» // Биомедицина. 2013. № 4. С. 66-69.

9. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Касинская Н.В., Степанова О.И., Деньгина С.Е., Капанадзе Г.Д., Фокин Ю.В., Берзин И.А., Ревякин А.О., Матвеев Е.Л. Экспериментальная оценка адаптогенной активности препарата «МيوАктив Форсаж» в тесте принудительного плавания // Биомедицина. 2013. № 4. С. 70-76.
10. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Люблинский С.Л., Капанадзе Г.Д., Шустов Е.Б., Ревякин А.О., Болотских Л.А., Касинская Н.В., Станкова Н.В. Роль микроэлементов в спортивном питании и безопасность металлохелатов // Биомедицина. 2013. № 3. С. 12-41.
11. Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина. 1987. С. 106-138.
12. Ревякин А.О., Алимкина О.В., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Киселёв А.Г., Казакова Л.Х., Степанова О.И., Касинская Н.В., Деньгина С.Е., Люблинский С.Л., Колышев И.Ю., Берзин И.А. Влияние рецептуры «МيوАктив-Спорт» на биохимические и гематологические показатели лабораторных крыс // Биомедицина. 2012. № 4. С. 59-66.
13. Руководство по лабораторным животными альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
14. Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Берзин И.А., Степанова О.И., Матвеев Е.Л., Касинская Н.В., Деньгина С.Е. Исследование влияния специализированного продукта спортивного питания «МيوАктив Форсаж» на устойчивость крыс линии WAG/GY к острой гипобарической гипоксии // Биомедицина. 2013. № 4. С. 77-83.
15. Скальный А.В. Физиологические аспекты применения макро- и микроэлементов в спорте. - Оренбург: РИК ОГУ. 2005. 206 с.
16. Элементный статус населения России. Ч. 1. Общие вопросы и современные методические подходы к оценке элементного статуса индивидуума и популяции / под ред. А.В. Скального, М.Ф. Киселева. - СПб.: Медкнига «Элби-СПб». 2010. 416 с.

Effect of composition MioActive on the hormonal status of laboratory animals

V.N. Karkischenko, O.V. Alimkina, Yu.V. Fokin

The influence of MioActive on hormonal status of rats WAG/GY line and mini-pigs svetlogorskaya population was studied. All animals had elevated levels of insulin, a tendency to increase the level of cortisol and serotonin, and testosterone in blood of male mini-pigs. In female rats the content of the latter hormone remains constant throughout the experiment. These hormonal changes indicate an improvement in muscle energy and the increase of efficiency and endurance of estradiol, the normal flow of the sexual cycle and gonads in animals. These effects remain, at least for 7 days after the end of consumption of the composition.

Key words: MioActive, hormones, insulin, cortisol, serotonin, testosterone, estradiol, laboratory animals, rats, mini-pigs.



Методика наведения транскраниальных стимуляторов на заданные мозговые структуры по проекционным таблицам

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

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

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

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

В статье описаны современные методики постановки стимулирующих электродов, дано их краткое описание и анализ. Приведена методика постановки стимулирующих электродов, разработанная на базе лаборатории нейростимуляции НИЦ «Курчатовский институт».

Ключевые слова: наведение стимулирующих электродов, стереотаксис, система «10-20», алгоритмы расчета проекций зон мозга на поверхность головы.

Известные системы наведения стимуляторов и их недостатки

В настоящее время все больший интерес вызывают методы электромагнитного воздействия на мозг и нервную систему, применяющиеся, в основном, для лечения физических и психических патологий [1, 2, 3, 9]. Область применения этих методов расширяется и включает способы оптимизации и увеличения эффективности физической и психической деятельности человека, в том числе, с учетом ее профессиональной специфики.

Различают инвазивные и неинвазивные методы стимуляции, отличающиеся

рядом особенностей: степенью нарушения целостности мозга, целевыми областями применения, ограничениями и т.п. Инвазивные методы связаны с электрической стимуляцией поверхностных и глубоких структур мозга через вживленные электроды, а неинвазивные основаны на процедурах электромагнитного воздействия без повреждения черепной коробки и обозначаются как транскраниальные. Неинвазивные методы отличаются большим разнообразием и включают ультразвуковую стимуляцию, магнитную стимуляцию, электрическую стимуляцию и микропо-

ляризацию. Ключевой проблемой для всех методов стимуляции вне зависимости от их особенностей и применения является наведение стимулирующих электродов, обеспечивающее необходимую и достаточную точность воздействия на определенные структуры мозга.

Стереотаксис. В практике применения интрацеребральной электростимуляции для оживления электродов используют специально разработанную стереотаксическую систему, которая представляет собой сложный многокомпонентный гибкий методический комплекс устройств, инструментов, методических приемов и вычислительных способов [1]. Стереотаксис является медицинской технологией, обеспечивающей доступ к глубоким структурам головного мозга, получение от них информации и осуществление локального воздействия на эти зоны. В рамках физиологической школы акад. Н.П. Бехтерева выделилось направление, названное «компьютерный стереотаксис», который представлял собой методику стереотаксической имплантации в мозг человека многоконтактных долгосрочных электродов. Для компьютерного стереотаксиса характерным являются следующие методические приемы: 1) преобразование стереотаксических координат в произвольно расположенных в пространстве координатных системах, что требует компьютеризации расчетов; 2) использование дополнительной, вспомогательной системы координат, которая вводится путем маркировки головы пациента [1].

Стереотаксическая система наведения может реализовываться на основе непосредственной и опосредованной локализации. Непосредственная локали-

зация имеет высокую точность и заключается в измерении координат целевой точки на основе данных МРТ-обследования каждого пациента. Опосредованная локализация предполагает определение внутримозговых ориентиров, которые служат для построения системы координат мозга, которая позволяет сравнить внутримозговое пространство пациента со стереотаксическим атласом. Опосредованная локализация применяется в том случае, если искомая структура не видна при рентгеновском интроскопическом обследовании.

В целом, стереотаксис является довольно точным методом локализации структур мозга, но для его реализации требуется использование сложного и дорогостоящего оборудования. Так, для функционального стереотаксиса с имплантацией в ядра и проводящие пути головного мозга необходимо использовать предоперационное МРТ-обследование, для нефункционального стереотаксиса с воздействием на опухоли головного мозга, кисты, абсцессы, гематомы – РКТ-обследование, производимое перед операцией [2]. Недостатком РКТ-обследования является сложность идентификации структур мозга на полученном изображении, недостатком МРТ – большая величина ошибки по одной из 3-х координат изображения, которая может достигать 5-6 мм. Процедуры стереотаксического наведения являются довольно точными: общая погрешность стереотаксических процедур невысока и составляет 1-3 мм [2], но требуют продолжительной и трудоемкой подготовки, что оправдывается при внутримозговых вмешательствах.

Наведение по системе «10-20». Задачи транскраниальной нейростиму-

ляции можно решать более экономичными, но и менее точными методами, в силу достаточно большого размера стимулируемой области мозга относительно возможной ошибки определения местоположения этой области. Радиус области воздействия при магнитной стимуляции составляет примерно 16 мм, при микрополяризации область затекания тока не меньше размера используемых электродов и составляет 5-15 мм, при ультразвуковой стимуляции область воздействия также достаточно велика и составляет 5-10 мм [8]. В этой связи, допустимым является использование более простых и менее точных способов наведения стимулирующих электродов.

Среди современных способов наведения стимулирующих электродов, используемых в практике транскраниальных воздействий, применяют схему Кронлейна-Брюсовой и схему расположения электродов по системе «10-20», разработанную для электроэнцефалографических обследований.

Анатомо-топографическая схема Кронлейна-Брюсовой позволяет ориентироваться относительно основных борозд головного мозга. Согласно этой схеме, на черепе проводится ряд параллельных линий: от надпереносья до выступа затылочной кости, по нижнему краю глазницы и верхней части наружного слухового прохода, по верхнему краю глазницы. Далее, к этим линиям проводятся три перпендикуляра через середину скуловой дуги, суставной отросток нижней челюсти и задний край сосцевидного отростка. При соединении точки пересечения верхней горизонтальной и передней вертикальной линий с точкой пересечения саггитальной и задней вертикальной линией эта линия

будет проходить по проекции центральной борозды. Впереди нее лежит лобная доля, а сзади – теменная и т.п. [9]. Схема Кронлейна-Брюсовой дает приблизительное представление о локализации основных корковых структур и может применяться для стимуляции довольно крупных мозговых областей, например, при магнитной стимуляции.

Схема постановки «10-20» является более точным способом определения локализации частей коры [5]. Эта схема разработана с учетом рентгенологических и патологоанатомических данных и пригодна для стимуляции структур мозга пациентов с разными размерами и формой черепа. В основе схемы «10-20» лежит измерение расстояния для определения места постановки электродов в процентах от основных размеров черепа, к которым относятся расстояния: 1 – между переносицей (nasion) и затылочным бугром (inion) в саггитальной плоскости и 2 – между наружными слуховыми проходами во фронтальной плоскости. Эти расстояния принимают за 100%. В саггитальной плоскости на расстоянии 10% выше затылочного бугра располагается линия затылочных электродов, впереди от которой на расстоянии 20% находится линия теменных электродов, далее через 20% – центральных электродов, еще через 20% – лобных электродов. Лобный полюсный электрод отстоит на 10% от переносицы и на 20% – от линии лобных электродов. Во фронтальной плоскости соблюдение процентных соотношений сохраняется. В 10% от наружных слуховых проходов с каждой стороны расположены височные электроды, в 20% от них в местах пересечения с линиями затылочных, теменных, центральных и лобных

электродов располагаются соответствующие электроды в каждом полушарии. По средней линии устанавливаются саггитальные электроды, обозначенные по названию соответствующей доли. Экспериментально было показано, что зоны мозга, выделенные с помощью схемы «10-20», соответствуют полям на гистологической карте Бродмана [11, 12]. Основным недостатком этой системы является сложность расположения стимулирующих электродов именно над теми мозговыми структурами, над которыми не предусмотрено расположение электродов, устанавливаемых системой. Иначе говоря, система «10-20» предполагает расположение электродов над центрами проекций на поверхность головы полей Бродмана, но не предусматривает способа расчета и постановки их над более локальными или протяженными областями мозга, к которым, например, относятся извилины.

В связи с этим, нами была разработана методика более точной и избирательной постановки стимулирующих электродов на поверхности головы.

Новая методика наведения стимуляторов на поверхность скальпа

На базе лаборатории нейростимуляции НИЦ «Курчатовский институт» была разработана методика наведения, которая может быть использована для более точной и избирательной постановки транскраниальных стимулирующих электродов, реализованная в виде специализированных компьютерных программ. Эта методика включает три алгоритма: 1) локализации полей по Бродману [7]; 2) построения проекций средних линий извилин головного мозга

человека [6] и 3) алгоритм преобразования координат проекционных таблиц.

Алгоритм локализации полей по Бродману основан на использовании угловых криволинейных координат на поверхности головы, что позволяет учесть вариативность размеров и формы черепа различных испытуемых. Компьютерная программа, реализующая этот алгоритм, позволяет находить расчетное местоположение проекций областей мозга по Бродману на поверхности головы [4, 7]. Она использует данные электронной версии атласа Тайлераха [10] и позволяет рассчитать угловые координаты для мозга данного размера.

Более подробное описание данного алгоритма описано в работе [7], в которой также представлены расчетные значения угловых координат центров проекций полей по Бродману относительно зон из атласа Тайлераха, отдельно для правого и левого полушарий.

Алгоритм локализации извилин головного мозга человека на поверхность головы предполагает расчет проекции средней линии извилины мозга на поверхность скальпа по данным атласа Тайлераха и определение ширины извилины в каждой точке ее средней линии. Данный алгоритм позволяет рассчитать координаты проекции по всей длине извилины с учетом ее неровностей и разветвлений.

Результатом реализации этого алгоритма является средняя линия внутри извилины, описанная множеством индексов, соответствующих точкам на ней. Средняя линия характеризует геометрический «скелет» извилины как тела в пространстве. Для обеспечения достаточной степени инвариантности к размерам головы рассчитанных резуль-

татов, описанных в работе [6], в качестве системы координат использовали угловые криволинейные координаты.

Алгоритм преобразования координат проекционных таблиц рассчитывает расстояние на фронтальной и горизонтальной дугах в зависимости от угловых координат точки и в зависимости от размеров головы человека, выражаемое длиной окружности головы. Алгоритм работает в приближении, что голова в общем случае является поверхностью, получающейся из сферы аффинным преобразованием. Далее вычисляется длина дуг с учетом среднестатистического смещения начала координат и среднестатистического отношения коэффициентов растяжения по осям. То есть, по сути, решается простая геометрическая задача нахождения длины заданной дуги на поверхности сферы, подвергнутой аффинному преобразованию. Это делается в два этапа: сначала находят точки дуги, соответствующей угловым координатам на сфере, путем пересечения плоскости, проходящей через дугу, со сферой. На втором этапе к этим точкам применяется аффинное преобразование и вычисляется длина полученной ломанной. При достаточном количестве точек мы получаем длину дуги с высокой точностью. Нами была написана компьютерная программа, реализующая данный алгоритм.

Результаты всех трех описанных алгоритмов можно использовать для построения новой, более гибкой технологии наведения стимулирующих электродов, которая также учитывает преимущества методики постановки ЭЭГ электродов по системе «10-20».

Предложенная нами методика постановки электродов включает следующую последовательность этапов:

1. **Определение положения центральной точки C_z** на поверхности головы. Для этого необходимо измерить расстояние между переносицей (N_z) и затылочным бугром (I_z) в саггитальной (медиальной) плоскости, а затем отложить от точки N_z половину полученной длины. Найденная точка и будет соответствовать центральной точке C_z (рис. 1).

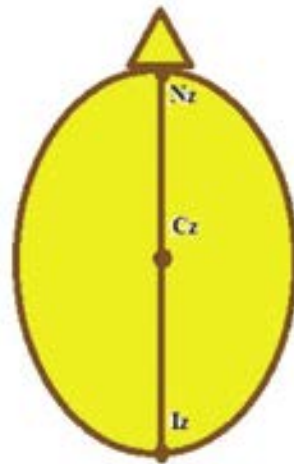


Рис. 1. Определение положения центральной точки и нахождение длины горизонтальной дуги.

2. **Нахождение длины горизонтальной дуги.** Горизонтальная дуга – это дуга, проходящая через точки N_z и I_z в горизонтальной плоскости. Нужно измерить длину окружности головы по этой дуге.

3. **Вычисление расстояния на горизонтальной дуге,** соответствующее искомой структуре мозга, которое рассчитывается с помощью компьютерной программы, реализующей алгоритм преобразования координат. На входе программа получает длину окружности

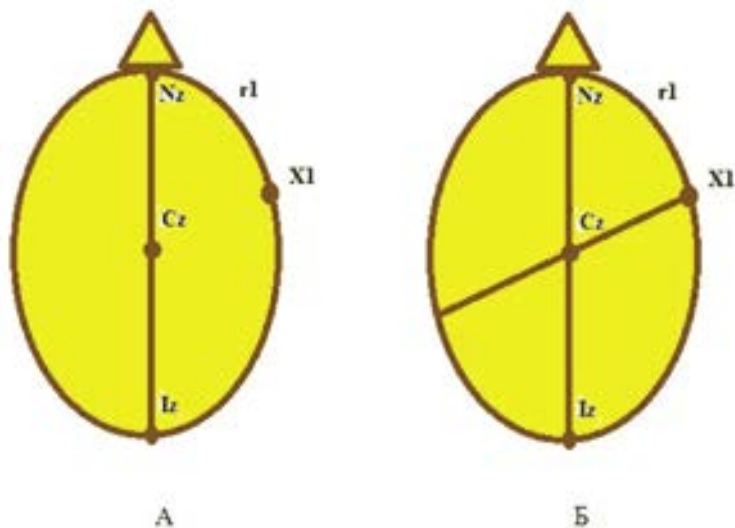


Рис. 2. Определение положения первой угловой координаты (А) и нахождения длины горизонтальной дуги (Б).

головы и угловые координаты точки. Обозначим это расстояние как « r_1 ».

4. **Определение положения первой угловой координаты** на поверхности головы. Для этого найденное расстояние r_1 откладываем от точки Nz или Cz в зависимости от расположения искомой структуры и обозначаем полученную точку X_1 (рис. 2А).

5. **Нахождение длины дуги во фронтальной плоскости.** Для этого необходимо провести дугу через точки Cz и X_1 в плоскости, перпендикулярной горизонтальной плоскости, и измерить длину полученной дуги. Обозначим длину дуги во фронтальной плоскости R_2 (рис. 2Б).

6. **Вычисление расстояния на фронтальной дуге,** соответствующее искомой структуре мозга, рассчитывается с помощью компьютерной программы, также как и расстояние по фронтальной дуге. Обозначим это расстояние как « r_2 ».

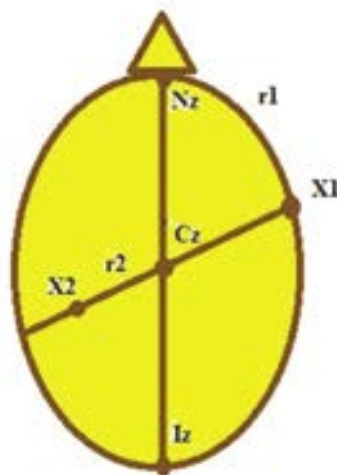


Рис. 3. Определение положения искомой структуры мозга.

7. **Определение положения искомой структуры мозга** на поверхности головы осуществляется путем отложения расстояния r_2 по найденной фронтальной дуге, образованной точками Cz и X_1 , от точки Cz , которую обозначим X_2 (рис. 3).

Данная методика позволяет определить положение на поверхности головы структуры любой формы и протяженности. Для постановки стимулирующих электродов по данной методике можно использовать расчетные угловые координаты не только для полей Бродмана, приведенные в работе [7], но также координаты средней линии определенной извилины, приведенные в работе [6].

Список литературы

1. *Аничков А.Д., Полонский Ю.З., Низковолос В.Б.* Стереотаксические системы. - СПб.: Наука. 2006. 142 с.
2. *Бехтерева Н.П., Аничков А.Д., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А., Илюхина В.А. и др.* Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека / под ред. Н.П. Бехтеревой. - М.: АСТ; СПб.: Сова. Владимир: ВКТ. 2008. 464 с.
3. *Вальтер Х.* Функциональная визуализация в психиатрии и психотерапии - М.: АСТ. Астрель. Полиграфиздат. 2004 г.
4. *Вартанов А.А., Чайванов Д.Б., Вартанов А.В.* Локализация на скальпе проекций поверхностных структур мозга по атласу Тайлераха. - М.: Припринт НИЦ «Курчатовский институт». ИАЭ-6687/14. 2011.
5. *Гнездицкий В.В.* Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография. - М.: «МЕДпресс-информ». 2004. 624 с.
6. *Каркищенко Н.Н., Вартанов А.А., Чайванов Д.Б.* Алгоритм построения проекций средних линий извилин головного мозга человека на поверхность скальпа // Биомедицина. 2012. № 2. С. 105-108.
7. *Каркищенко Н.Н., Вартанов А.А., Вартанов А.В., Чайванов Д.Б.* Локализация проекций полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа // Биомедицина. 2011. № 3. С. 40-45.
8. *Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Вартанов А.А.* Выбор оптимальной технологии локализации транскраниальных нейростимуляторов на скальпе человека // Биомедицина. 2012. № 1. С. 6-9.
9. *Пинчук Д.Ю.* Транскраниальные микрополяризации головного мозга: клиника, физиология. - СПб: Человек. 2007. 496 с.
10. *Чайванов Д.Б., Вартанов А.А.* Результаты расчета проекций средних линий извилин головного мозга человека на поверхность скальпа // Вестник психофизиологии. 2012. № 4.
11. *Taillerah J., Tournoux P.* Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain, George Thieme Verlag Stuttgart. - New York. Thieme Medical Publishers. Inc. New York. 1988.
12. *Towle V.L., Bolaños J., Suarez D., Tan K., Grzeszczuk R., Levin D.N., Cakmur R., Frank S.A., Spire J.P.* The spatial location of EEG electrodes: locating the best-fitting sphere relative to cortical anatomy / EEG and Clin. Neuropsychol. 1993. V. 86. P. 1-6.
13. *Homan R.W., Herman J., Stewart C., Purdy P.* Cerebral location of international «10-20» system electrodes placement / EEG and Clin. Neuropsychol. 1987. V. 66. P. 377-382.

Targeting technique of transcranial stimulators on the set brain structures according to projective tables

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

The article describes modern methods of production stimulating electrodes, here is given its description and analysis. The method of production stimulating electrodes is shown here. This method is developed on the basis of laboratory RSC "Kurchatov Institute".

Key words: guidance stimulating electrodes, stereotaxy, the system "10-20", projection algorithms for areas of the brain to the surface of the head.



Гнотобиология. Перспективы развития

Л.А. Болотских

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

Контактная информация: к.с.-х.н. Болотских Любовь Александровна, тел.: 8(495)5615257

Разработка гнотобиологических методов и моделей гнотобиотов для медико-биологических исследований.

Ключевые слова: гнотобиотические животные, СПФ-животные, гнотобиологический изолятор, изоляторная система, гнотобиологические методы.

Введение

Для современной экспериментальной и клинической медицины всё большую актуальность приобретает строгий контроль воздействия факторов окружающей среды на организм человека. Одним из таких факторов, обладающих способностью активно влиять на жизнедеятельность организма, является микрофлора. Медицинская наука накопила много данных, показывающих важную роль микробной флоры в физиологических и патологических процессах, что подчеркивает необходимость учета этого фактора в медико-биологических исследованиях. Вместе с тем, методы биологической изоляции и контроля микробного воздействия в эксперименте и клинике до последнего времени остаются недостаточно совершенными. В области экспериментальной медицины это в первую очередь относится к объекту исследования и моделирования – лабораторным животным [1].

Неконтролируемая микробная флора обычных лабораторных животных является серьёзным препятствием для правильной оценки результатов эксперимента. Известно, что при воздействии различных стрессовых факторов в той или мере происходит снижение резистентности организма, что, в свою очередь, предопределяет активацию микробной аутофлоры и развитие аутоинфекции. От того, какая флора в данный момент будет превалировать, в значительной степени зависит исход эксперимента.

Важность учета переменного микробного фактора при оценке ответной реакции у лабораторных животных на экспериментальное воздействие имеет значение в экспериментальной патологии, физиологии, иммунологии, фармакологии, токсикологии, биохимии, радиобиологии и других областях медико-биологических исследований. Так, при испытании новых лекарственных

препаратов, проводимых на лабораторных животных, следует учитывать, что многие препараты могут влиять на сложившиеся экологические отношения в микрофлоре животных. Это может вызвать иммунобиологические сдвиги, а также развитие патологических изменений, обусловленных не только прямым действием препарата на макроорганизм, но и опосредованным влиянием через аутофлору. Кроме того, может иметь место и изменение свойств изучаемого препарата в результате взаимодействия с микрофлорой и продуктами её метаболизма. Это может завуалировать истинные токсические свойства тестируемого препарата. Понятно поэтому, что при использовании обычных лабораторных животных с неконтролируемой микрофлорой трудно составить точное представление о токсичности и других фармакологических свойствах многих лекарственных препаратов [10].

Современный уровень исследований предъявляет всё более высокие требования к объекту медико-биологического моделирования – лабораторному животному. Этот объект должен отвечать требованиям определённых стандартов. Уже решены вопросы стандартизации лабораторных животных по генетическому фактору. Условиями содержания животных легко управлять. Остаётся один неконтролируемый, переменный фактор – микрофлора, в значительной степени определяющая внутривидовые вариации при экспериментах на животных [11].

Новый методический подход для осуществления контроля и стандартизации лабораторных животных по микробному фактору возник с развитием гнотобиологии. Термин «гнотобиология», предложенный Luckey (1963), образован от

двух корней: «gnoto» – известный и «biota» – флора и фауна. Гнотобиология представляет область медико-биологических исследований, изучающую особенности гнотобиотических животных и влияние известной микробной флоры на физиологические и патологические процессы в организме [7].

Таким образом, разработка гнотобиологических методов и моделей гнотобиотот является актуальной **целью** медико-биологических исследований.

Материалы и методы

В работе использовалось зарубежное и отечественное оборудование – гнотобиологические изоляторы, изоляторные системы, ламинары, стерилизаторы воздушные, паровые стерилизаторы и др. Для получения и содержания гнотобиотических, в т.ч. безмикробных животных приобретали гнотобиологические изоляторы (рис. 1).



Рис. 1. Гнотобиотические изоляторы.

Работа с изоляторами проводилась согласно существующим правилам [8].

Гнотобиотических животных получали, в основном, операционным методом гистерэктомии. При гистерэктомии у беременной самки в стерильных

условиях проводится срединная лапаротомия, после чего шейка матки перевязывается и производится ампутация матки. Ампутированную беременную матку проводят через антисептический гидрошлюз. Затем плоды извлекаются и обрабатываются (производится освобождение от плодовых оболочек, перевязка и отсечение пуповины, осушивание).

Для создания СПФ-животных были закуплены изоляторные системы «RairIsoSystem» (рис. 2).



Рис. 2. Изоляторные системы «RairIsoSystem».

Работа с изоляторными системами проводилась согласно разработанной технологии содержания СПФ-животных. Очистка конвенциональных животных от патогенной микрофлоры и перевод их в СПФ-статус проводилась усовершенствованным методом гистерэктомии [2].

Животные получали стерильный гранулированный корм и белково-витаминную добавку [3].

Результаты и их обсуждение

В лаборатории гнотобиологии ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» разработана технология получения и выра-

щивания различных видов и категорий гнотобиотических животных: крысы, мыши, морские свинки, кролики, цыплята, поросята [9]. На этих животных были проведены эксперименты по иммунологии, токсикологии, онкологии, геронтологии, инфекционной патологии, экспериментальной хирургии и т.д.

Получены новые категории гнотобиотов, контролируемые не только по микробному, но и по антигенному воздействию (безантигенные животные) [4]. Отсутствие контакта с чужеродными антигенами делает таких животных ценной моделью для дифференцированного изучения роли экзогенных и аутоантигенов в иммунных и аллергических процессах.

В НЦБМТ ФМБА России отработана и внедрена технология получения и выращивания СПФ-животных в изоляторной системе [5]. От патогенной микрофлоры освобождены гнотобиологическими методами 15 основных линий мышей коллекционного фонда и переведены в СПФ-статус [6]. Отработанная технология содержания СПФ лабораторных животных в изоляторной системе может быть рекомендована для питомников и экспериментально-биологических клиник. В настоящее время в нашем Центре созданы все условия для проведения экспериментов на гнотобиотических, в т.ч. СПФ-животных, в самых различных областях медико-биологических исследований, несмотря на существующие трудности и затраты. Однако игнорирование роли микробного фактора в конечном итоге будет обходиться значительно дороже, чем затраты на организацию гнотобиологических исследований.

С внедрением гнотобиологических методов для создания беспатогенных, или СПФ-животных в корне меняется пред-

ставление о лабораторном животном как объекте исследования. Если раньше роль фактора микрофлоры у лабораторных животных попросту игнорировалась, то теперь необходимость её учета стала очевидной. Повышенные требования микробиологического контроля лабораторных животных изменили отношение и к условиям их содержания. Биологическая стандартизация лабораторных животных, т.е. создание СПФ-животных, наряду с их генетической однородностью, и обеспечивает высококачественные модели, что, в свою очередь, значительно повышает уровень медико-биологических исследований.

Гнотобиология имеет свои специальные методы, объединяемые понятием «гнотобиологическая технология». Совершенствование их будет идти и дальше в направлении повышения надежности, доступности и стандартизации.

Общебиологическое значение и перспективы развития гнотобиологии определяются многообразием и изменчивостью мира микроорганизмов, их ролью в жизнедеятельности человека и животных. По этим соображениям принципы подразделения микробиологии на общую, медицинскую, ветеринарную, сельскохозяйственную, промышленную, санитарную и др. полностью применимы и к гнотобиологии. Эта дифференциация подтверждается все более крепнущими связями гнотобиологии и перечисленными областями науки и производства. Таким образом,

гнотобиология будет играть важную роль в системе биологических, медицинских, ветеринарных, сельскохозяйственных и др. наук и отраслей хозяйства [10].

Список литературы

1. *Абрашитова Э.Х., Зайцев Т.И. и др.* Стандартизация лабораторных животных по состоянию здоровья // Ланималогия. 1993. 7 с.
2. *Болотских Л.А., Лушникова З.С.* Усовершенствованный способ получения гнотобиотических животных // Биомедицина. 2005. № 1. С. 114-117.
3. *Болотских Л.А.* Способы стерилизации гранулированного корма для гнотобиотических животных // Биомедицина. 2007. № 6. С. 164-166.
4. *Болотских Л.А., Подопризора Г.И.* Безантигенные поросята – новая категория гнотобиотов для медико-биологических исследований / Мат-лы Всесоюзной конференции «Биологическая характеристика лабораторных животных». 1980.
5. *Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Егорова И.Ю., Галахова Т.В., Бескова Т.Б., Касинская Н.В.* Изоляторные системы – новый методический подход в медико-биологических исследованиях // Биомедицина. 2011. № 1. С. 90-95.
6. *Болотских Л.А., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Касинская Н.В., Капаназе Г.Д., Реякин А.О., Матвиенко Е.Л.* Создание лабораторных животных СПФ-статуса как основа экспериментальной медицины // Биомедицина. 2013. № 4. С. 158-163.
7. *Душкин В.А., Интизаров М.М., Петрачев Д.А., Подопризора Г.И., Попов В.И., Сорокин В.В., Шишков В.П.* Теоретические и практические основы гнотобиологии. - М.: Колос. 1983.
8. *Подопризора Г.И.* Правила работы с гнотобиологическими изоляторами. - М. 1977.
9. *Подопризора Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А.* Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс, морских свинок // Вестник АМН. 1981. № 2. С. 54-58.
10. *Подопризора Г.И.* Гнотобиология на пути двух столетий // Вестник АМН. 1996. № 14. С. 239-251.
11. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева.* - М.: Профиль 2С. 2010. С. 88-101.

Gnotobiology. Development prospects

L.A. Bolotskikh

Development of gnotobiological methods and models of gnotobiot for medicobiological researches.

Key words: gnotobiot animals, SPF-animals, gnotobiological insulator, insulator system, gnotobiological methods.

Инновационная модель комбинированного стимулирования овуляции у осетровых рыб и цитометрические особенности продуцируемых ооцитов

Э.В. Бубунец¹, А.О. Ревякин², А.В. Лабенец³

¹ – ФГБУ «Центральное управление по рыбохозяйственной экспертизе и нормативам по сохранению, воспроизводству водных биологических ресурсов и акклиматизации», Москва

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

³ – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

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

Рассматриваются результаты практического использования защищенной патентом РФ модели стимулирования овуляции. Показано, что овулировавшие в результате комбинированного воздействия суспензии гипофиза карпа и синтетического препарата «Сурфагон» ооциты осетровых физиологически полноценны. Несмотря на несколько меньшие размеры, они могут успешно использоваться как для репродукции, так и для производства пищевой черной икры.

Ключевые слова: стимулирование овуляции, гипофиз, «Сурфагон» ($C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$), осетровые рыбы, ооциты.

Введение

Расширение масштабов искусственного воспроизводства осетровых, как для коммерческого культивирования, так и для пополнения остающихся природных популяций, обусловило насущную необходимость поиска реальной альтернативы утраченным источникам природного сырья для гонадотропных препаратов.

Известны попытки применения с этой целью суспензии гипофизов филогенетически отдаленных видов рыб (преимущественно, карповых), а также ряда промышленно выпускаемых синтетических аналогов. Нами в республике Корея также относительно успешно применялись при воспроизводстве осетро-

вых препараты LH-RH - «CONTROL» и GnRHа «GONADON» местного производства [4]. На практике, однако, получило массовое распространение только применение синтетического олигопептида «Сурфагон», как самостоятельно, так и в различных комбинациях с рядом других препаратов [3, 11]. Последнее направление является наиболее перспективным, однако до настоящего времени далеко от совершенства. Исходя из этих предпосылок, нами была разработана модель гормонального стимулирования овуляции у осетровых, ориентированная на применение в рыбоводных предприятиях, осуществляющих их полноценное культивирование [9, 10].

Целью работы являлся анализ результатов практической реализации инновационной модели комбинированного стимулирования овуляции у самок культивируемых видов анадромных осетровых.

Материалы и методы

Использованные при проведении работы самки осетровых находились в IV завершенной стадии зрелости гонад. Овуляция стимулировалась комбинированно (согласно схеме, представленной на рисунке) – с использованием суспензии гипофизов карповых рыб [5] для предварительной инъекции в дозировке 0,4-0,8 мг/кг живой массы, т.к. предварительные исследования показали ее оптимальность для рыб рассматриваемых видов [3], и синтетического препарата «Сурфагон» (1,5-2,5 мкг/кг) для разрешающей инъекции. Интервал между введением препаратов составлял 12 ч.

Пробы для изучения цитометрических характеристик ооцитов получались при биопсийных исследованиях гонад, а также отбирались из получаемой витально овулировавшей икры [8]. При оценке качества икры и молоди осетровых на ранних этапах онтогенеза применялись соответствующие руководства [1].

Результаты и их обсуждение

Практическое применение предложенной модели стимулирования овуляции в ряде рыбоводных хозяйств показало, что ее реализация обеспечивает большую стабильность результатов (100% созревание самок) при пониженных температурах воды по сравнению с использованием только «Сурфагона». Овуляция икры у самок происходит наиболее полно, первая партия сжеженной икры составляет 85-90% при более высоком её качестве. Выживаемость самок

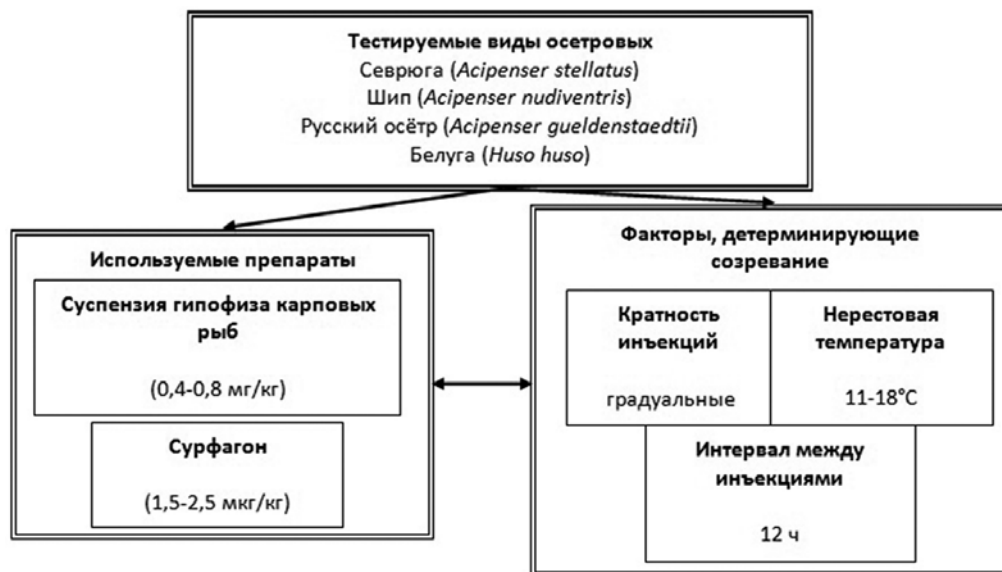


Рис. Схема комбинированного стимулирования овуляции.

после витального получения икры составила 100%.

Овулировавшие под влиянием комбинированной стимуляции ооциты осетровых характеризуются весьма высокой однородностью и незначительным количеством нарушений в строении [6]. Единственным достоверным отличием от икринок рыб соответствующих видов, обитающих в состоянии естественной свободы, являются их несколько меньшие размеры (табл. 1). Последнее, однако, является общей тенденцией для осетровых в условиях культивирования [2, 6, 12] и практически не сказывается на рыболовных и технологических качествах икры.

Морфология осетровых на ранних этапах онтогенеза рассматривается как один из критериев оценки эффективности искусственного воспроизводства. Как показали детальные исследования, выполненные А.В. Новосадовой [7], у развивающихся эмбрионов и молоди осетровых рыб, получаемых при воспроизводстве с использованием пред-

ложенной модели гормонального стимулирования, частота встречаемости практически всех известных видов морфологических аномалий существенно меньше, чем в потомстве производителей, изымаемых из естественной среды [1]. В целом, качество икры анадромных осетровых, выращенных в условиях культивирования, позволяет осуществлять их воспроизводство без изъятия особей из природных популяций для реакклиматизации и восстановления нативных видов. Получаемые в результате применения предложенной модели овулировавшие ооциты по всем показателям соответствуют требованиям, предъявляемым к сырью для производства пищевой черной икры.

Производственные результаты проводившихся в дальнейшем оплодотворения, инкубации икры в аппаратах Вейса, выдерживания свободных эмбрионов и выращивания личинок и молоди соответствовали нормативным показателям или отличались в лучшую сторону.

Таблица 1

Цитометрические показатели овулировавших ооцитов

Показатели		Шип	Севрюга	Русский осётр	Белуга
Диаметр (D), мм	Lim: (min-max)	2,6-3,6	1,97-2,81	2,6-3,5	2,88-3,94
	M±m	2,91±0,01	2,42±0,01	2,98±0,01	3,31±0,01
	Cv±m _{Cv}	5,35±0,30	6,36±0,32	5,28±0,24	5,19±0,25
Масса, мг	Lim: (min-max)	9,50-18,00	7,00-11,00	9,85-15,00	12,00-20,00
	M±m	13,55±0,11	9,21±0,05	12,14±0,06	16,97±0,09
	Cv±m _{Cv}	10,39±0,59	7,37±0,37	7,85±0,35	7,91±0,38
Плотность, мг/мм ³	Lim: (min-max)	0,942-1,995	0,92-2,46	0,74-1,27	0,74-2,12
	M±m	1,18±0,010	1,52±0,02	1,01±0,01	1,14±0,01
	Cv±m _{Cv}	11,00±0,62	17,21±0,86	8,32±0,37	17,08±0,82

Опыт использования предложенной модели позволяет утверждать, что на продолжительность эмбрионального развития (а, следовательно, инкубации икры) рассматриваемых видов осетровых влияет не только регламент гормональной стимуляции, но и температурные условия зимнего содержания производителей. В частности, отмечено, что при использовании комбинированных инъекций для впервые нерестующих самок шипа, севрюги, белуги, русского осетра происходит увеличение продолжительности инкубации до 30 ч. Однозначно установлено, что чем ниже температура воды во время зимовки производителей, тем позднее созревают впервые нерестующие самки после разрешающей инъекции.

Для повышения эффективности стимуляции созревания самок осетровых и получения стабильных результатов рекомендуется использовать комбинированную модель гормонального стимулирования, адаптированную к условиям конкретных предприятий и учитывающую биологические особенности каждого вида (табл. 2).

Данные табл. 2 обобщают большой массив эмпирических фактов, полученных в течение длительного времени в рыбоводных предприятиях различных типов, и могут быть полезными при практической реализации рассмотренной модели.

Выводы

1. Практические результаты использования предложенной модели комбинированного стимулирования овуляции показали ее пригодность для производства. Продуцируемые ооциты по цитометрическим и функциональным характеристикам (за исключением несколько меньшего диаметра) не отличаются от зрелых икринок рыб соответствующих видов, обитающих в состоянии естественной свободы.

2. Применение новой модели стимулирования овуляции обеспечивает стабильные результаты искусственного воспроизводства осетровых. Получаемое при этом потомство характеризуется морфологической и физиологической полноценностью и соответствует отраслевым технологическим нормативам

Таблица 2
Условия и результаты применения разработанной модели стимулирования овуляции

Вид осетровых	Температура воды, °С	Препараты и дозировки инъекций		Время созревания, ч	
		Предварительная (суспензия гипофиза карпа)	Разрешающая («Сурфагон»)	Начало	Окончание
Севрюга	16-18	0,4-0,5 мг/кг	1,5 мкг/кг	21	27
Шип	15-16	0,4-0,5 мг/кг	1,5-2,0 мкг/кг	21	35
Русский осётр	13-15	0,5-0,6 мг/кг	2 мкг/кг	28	36
Белуга	11-13	0,5-0,8 мг/кг	2-2,5 мкг/кг	27	41

Список литературы

1. Атлас нарушений в гаметогенезе и строении молоди осетровых / Акимов Н.В., Горюнова В.Б., Микодина Е.В., Никольская М.П., Рубан Г.И., Соколова С.А., Шагаева В.Г., Шатуновский М.И. - М.: Изд-во ВНИРО. 2004. 120 с.
2. **Бубунец Э.В.** Биометрические критерии качества овулировавших ооцитов впервые нерестующих анадромных осетровых в условиях культивирования // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 2014. № 4. С. 48-50.
3. **Бубунец Э.В., Лабенец А.В.** Применение градуальных инъекций сурфагона в нетрадиционные сроки при воспроизводстве осетровых // Аграрная наука. 2012. № 2. С. 26-28.
4. **Бубунец Э.В., Новосадов А.Г.** Использование гормональных препаратов LH-RH - «CONTROL» и GnRHа «GONADON» (зарубежных аналогов сурфагона) при получении икры от различных видов осетровых в нетрадиционные рыбоводные сроки // Рациональное использование пресноводных экосистем - перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК». - М.: Россельхозакадемия. 2007. С. 241-246.
5. Инструкция по использованию гипофизарных инъекций в рыбоводстве // Сборник нормативно-технологической документации по товарному рыбоводству. Т.1. - М.: Агропромиздат. 1986. С. 109-119.
6. **Лабенец А.В., Новосадова А.В.** Морфометрические и некоторые ультраструктурные особенности икры русского осетра, продуцируемой при полноциклическом выращивании // Актуальные проблемы современной науки и образования. Биологические науки: Мат-лы Всеросс. научно-практ. конференции с международным участием. Т. II. - Уфа: РИЦ БашГУ. 2010. С. 368-372.
7. **Новосадова А.В.** Морфологические нарушения в раннем онтогенезе осетровых рыб у потомства культивируемых производителей / Автореф. дисс. ... канд. биол. наук 03.02.06-ихтиология. - М.: ВНИРО. 2013. 24 с.
8. **Подушка С.Б.** Получение икры у осетровых с сохранением жизни производителей // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. - СПб. 1999. № 2. С. 4-9.
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль 2С. 2010. С. 88-101.
10. Способ воспроизводства осетровых рыб / Бубунец Э.В., Лабенец А.В., Жигин А.В. Патент РФ № 2500101. Опубликовано: 10.12.2013. Бюлл. № 34. 7 с.
11. **Чебанов М.С., Галич Е.В.** Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб. Технические доклады ФАО по рыбному хозяйству и аквакультуре. № 558. Анкара: ФАО. 2013. 297 с.
12. **Chebanov M.S.** Conservation culture of sturgeons in the Asov Sea Basin // BIORESTURGEONS 2005. 1st International workshop on the biology, conservation and sustainable development of sturgeons in southern Europe (Granada, November 28-30, 2005). Abstracts. Granada. 2005. P. 69-74.

Innovative model of combined stimulation of sturgeon ovulation and cytometric features of produced oocytes

E.V. Bubunets, A.O. Revyakin, A.V. Labenets

The results of practice using of ovulation stimulation model, saved by the patent of Russian Federation, are analyzed. It is showed, that ovulated oocytes of sturgeon in result of combined action of carp hypophysis suspension and syntetical preparation «Surfagon» are physiological full. In spite of smaller measurement they can successfully be used as for reproduction or for production of food black caviar.

Key words: ovulation stimulation, hypophysis, «Surfagon» ($C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$), sturgeons, oocytes.

Роль эндогенных образований в формировании химуса у рыб и птиц

Е.П. Полякова, М.Е. Барбосова, Л.Х. Казакова

ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Казакова Лейли Хыдыркулыевна, scolt@mail.ru

В опытах на разных классах позвоночных (цыплятах-бройлерах и рыбах) изучали структуру химуса желудочно-кишечного тракта и механизмы его формирования. Авторы разработали методику разделения химуса на эндогенные и экзогенные образования, с помощью которой определили соотношение этих образований химуса в разных отделах ЖКТ указанных животных. Установили, что по весу химус на 85-99% состоит из гидратированной полостной слизи сложного состава, которой дали название «плотная эндогенная фракция химуса» (ПЭФ), и на 1-16% из пищевых частиц. Авторы выдвигают гипотезу, что ПЭФ играет важную роль в формировании структуры химуса и является основным эндогенным образованием, организующим полостной гидролиз и обеспечивающим направленное движение нутриентов к апикальной поверхности энтероцитов.

Ключевые слова: энтеральное пищеварение, структура химуса, полостная слизь, цыплята-бройлеры, рыбы.

Введение

Механизм усвоения организмом питательных веществ из пищи интересовал исследователей во все времена. Первые экспериментальные данные в этом направлении были получены в балансовых опытах. Фистульные методы, предложенные академиком И.П. Павловым, позволили изучить химический состав содержимого желудочно-кишечного тракта. Следующим этапом изучения механизма усвоения питательных веществ организмом стала предложенная А.М. Уголевым теория пристеночного (мембранного) пищеварения, в которой основную функцию финального гидролиза приписывают уникальному строению слизистой оболочки с её энтероцитами,

щёточной каймой и гликокаликсом. Однако в этой схеме не учитывается слой слизи, покрывающий слизистую оболочку по всей длине кишечника, который был назван слизистыми наложениями, и который продукты полостного гидролиза должны преодолеть на пути к апикальной поверхности слизистой оболочки. Изучением свойств этого слоя в 1980-х гг. занималась группа учёных (И.А. Морозов, Ю.А. Лысиков, Б.В. Питран и др.).

Однако представления о полостном пищеварении и о химусе как таковом полностью не сформировались. Определение химусу, данное еще Е.С. Лондоном в 1924 г. как «смеси пищевых частиц и пищеварительных соков», до сих пор является господствующим.

В теории пристеночного пищеварения А.М. Уголева [11] химус рассматривается так: «...ферменты растворены в жидкой фазе, и их перемещение определяется законами теплового движения. В связи с этим, возможна любая ориентация активных центров ферментов относительно субстратов, причём структурная организация ферментных систем ограничена или невозможна», то есть химус рассматривается как механическая смесь ПЧ с ферментами, в которой господствует броуновское движение.

Однако исследования последних десятилетий [1, 3, 4, 5, 10, 13] показали, что полостное пищеварение как первый этап обмена веществ и энергии животного организма представляется сложным многоступенчатым процессом. В 1950-х гг. А.Д. Синещёков экспериментально показал, что химус всех отделов кишечника гомеостазирован независимо от принятого корма [10]. Это явление не имело объяснения, пока Гальперин, рассматривая химус под микроскопом, не обнаружил, что пищевые частицы составляют не более 30% от объёма плотной фазы химуса, а основная её часть состоит из рыхлых эндогенных структур, в состав которых входят десквамированные энтероциты, слизистые наложения, секреты бокаловидных клеток, секреты пищеварительных желез и т.д. [3]. В настоящее время содержимое желудочно-кишечного тракта животных и человека рассматривается как гомеостазированная среда, состав которой мало зависит от химического состава рациона и достаточно близок к составу плазмы крови. Однако вопросы о том, каковы механизмы энтерального гомеостаза и насколько универсально это явление, остаются за пределами понимания ученых.

В лаборатории минерального обмена на кафедре физиологии, морфологии и

биохимии животных РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева эта среда получила название «плотная эндогенная фракция химуса», здесь же была разработана методика разделения (фракционирования) химуса на эндогенные и экзогенные составляющие и экспериментально определено их объёмное соотношение. Эти опыты были проведены на курах, кроликах, овцах, козах и крупном рогатом скоте [5, 7, 8, 12], авторы показали, что на долю эндогенных образований приходится от 70 до 90% объёма нативного химуса.

Цель наших исследований – изучить структуры химуса позвоночных животных, находящихся на разных ступенях эволюционного развития, с разным типом питания.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись цыплята-бройлеры и рыбы.

Первый опыт проводился на цыплятах-бройлерах отечественного кросса «Смена-7». Цыплята получали полноценный сбалансированный комбикорм по схеме с трехразовой сменой рациона: стартовый комбикорм (ПК 5-1) использовался до 14-суток; ростовой (ПК 5-2) – с 15 до 28 суток; и финишный (ПК 5-3) – с 29 до 42 суток. Кормление осуществлялось два раза в день, утром и вечером. Убой подопытной птицы производили в возрасте 42 дней через 2 ч после кормления методом обескровливания в соответствии с рекомендациями FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Во время каждого убоя производилось вскрытие цыплят и отбор образцов химуса из пяти отделов желудочно-кишечного тракта: зоба, мускульного желудка, двенадцатиперстной, тощей и прямой кишок. Из

каждого отдела отбирали 2 образца химуса: первый – для исследования цельного химуса, а второй образец химуса желудочно-кишечного тракта по разработанной на кафедре методике разделяли на отдельные фракции: очищенные от эндогенных примесей непереваренные пищевые частицы (ПЧ), растворимая фракция (РФ) и плотная эндогенная фракция химуса (ПЭФ). После высушивания всех исследуемых биологических проб в сушильном шкафу при температуре 105°C определяли содержание сухого вещества и рассчитывали относительное содержание каждой фракции в цельном химусе.

Объектом исследований во втором опыте были рыбы: ленский осётр (*Acipenser baeri*), ручьевая форель (*Parasalmo mykiss*) и клариевый сом (*Clarias gariepinus*). Рыб брали из промышленных условий, где они содержались по

технологии, рекомендованной для каждого вида. В лабораторных условиях рыб содержали в аквариумах с водопроводной дехлорированной водой объёмом 400 л при температуре 27°C, ежедневно производили подмену 1/3 объёма воды. Рыбы получали комбикорм «AQUAVALENT» FM 44/18 EX по поедаемости. Таким образом, рыб содержали 3 мес., после чего убивали через 1 ч после кормления, извлекали желудочно-кишечный тракт и разделяли его на отделы (желудок, проксимальный и дистальный отделы кишечника), из которых извлекали химус, и далее каждый образец химуса исследовали также как в первом опыте.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 показан процент сухого вещества в содержимом зоба, мускульного желудка и в химусе двенадцатиперстной, тощей и прямой кишки

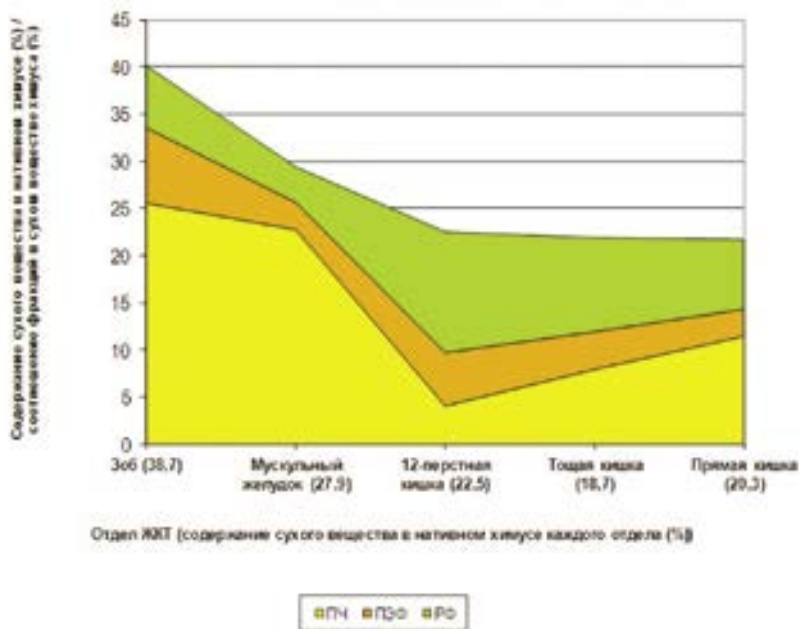


Рис. 1. Содержание сухого вещества в нативном химусе разных отделов желудочно-кишечного тракта и соотношение фракций в сухом веществе химуса цыплят-бройлеров.

ров. Максимальная концентрация сухого вещества отмечена в содержимом зоба (38,5%), далее этот показатель достоверно снижается в мускульном желудке (27,9%) из-за выделения секрета из самого зоба и железистого желудка. В кишечнике (двенадцатиперстной, тощей, прямой) масса сухого вещества практически не меняется и составляет 19-22%.

На том же рис. представлено соотношение фракций в сухом веществе содержимого всех отделов ЖКТ. Содержимое зоба и желудка ещё не является химусом, и, как видно из рис. 1, максимальная доля ПЧ в содержимом зоба и желудка составляет соответственно 66,0% и 81,5%. В сухом химусе двенадцатиперстной кишки на долю ПЧ приходится только 18%, после чего содержание ПЧ закономерно увеличивается до 36,3% в химусе тощей и до 53,4% в прямой кишках.

В противоположность этому, доля РФ в сухом веществе химуса закономерно увеличивается, достигая максимума (56,8%) в двенадцатиперстной кишке, после чего закономерно снижается до 34,4% в прямой. Содержание ПЭФ в хи-

мусе желудочно-кишечного тракта изменяется в меньшей степени и находится во всех отделах примерно на одном уровне.

В нативном же химусе растворимая фракция и плотная эндогенная фракция образуют единую функциональную систему. Влага, составляющая в химусе 80-85%, удерживается мукополисахаридами ПЭФ, и вместе с ней образует гидратированную ПЭФ, которая и составляет энтеральную среду, в которой распределены ПЧ. На рис. 2 нами показано количественное соотношение ПЧ и гидратированной ПЭФ в нативном химусе.

Из рис. 2 видно, что на долю пищевых частиц в содержимом желудка приходится 27,24%, в двенадцатиперстной кишке – только 4,80%, в тощей – 9,48%, в прямой – 13,68%. Весь остальной объем химуса занимает гидратированная слизь.

У рыб с разным типом питания содержание сухого вещества в цельном химусе изменяется несколько иначе, чем у цыплят-бройлеров. Так, у клариевого сома, всеядного животного, в рационе которого в нашем опыте преобладали растительные корма, процент сухого ве-

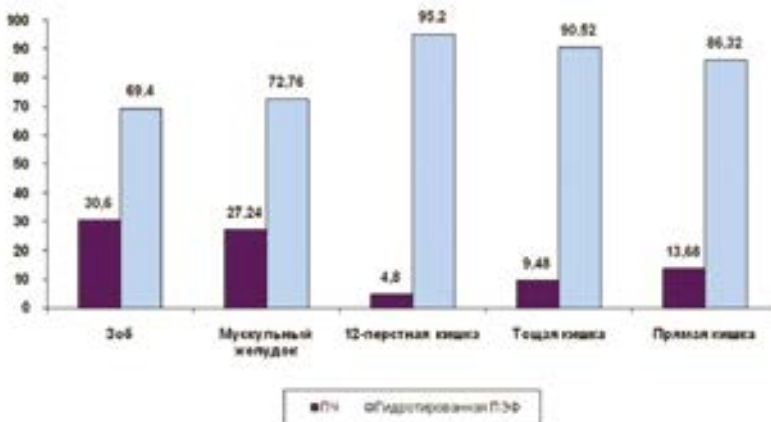


Рис. 2. Соотношение пищевых частиц и энтеральной среды в нативном химусе цыплят-бройлеров, %.

щества в химусе разных отделов кишечника изменялся незначительно: от 18% в желудке до 11% в проксимальном отделе кишечника и до 15% в дистальном отделе (рис. 3). У ручьевой форели, которая, как хищник, питалась мясными продуктами, процент сухого вещества в цельном химусе закономерно снижался с 35% в желудке до 14% в дистальном отделе кишечника (рис. 4). У бентософага осетра сухая масса цельного химуса изменялась от 23% в содержимом желудка до 16% в дистальном отделе кишечника (рис. 5). Это говорит о том, что тип питания влияет на динамику содержания сухой массы цельного химуса. Однако при разложении сухого химуса этих рыб на фракции (рис. 3-5) нами показано, что соотношение фракций в сухом химусе у этих рыб и цыплят-бройлеров примерно одинаково, при наличии некоторых различий. Так, у всех трёх рыб доля сухой

массы ПЧ относительно сухого химуса существенно ниже с идентичной динамикой по мере эвакуации химуса.

Доля сухой массы РФ в химусе рыб существенно выше, чем у цыплят-бройлеров, и по мере эвакуации химуса в нижележащие отделы у сома возрастает, а у форели и осетра снижается в меньшей степени, чем у цыплят-бройлеров. Это связано с тем, что у наземных животных более высокая абсорбция воды из химуса толстого кишечника.

Доля сухой массы ПЭФ у всех трех видов рыб составляет 23-30% и менее всего изменяется по мере эвакуации его в нижележащие отделы ЖКТ. Однако в нативном химусе кишечника рыб на долю ПЧ, как это видно из рис. 6-8, приходится от 1 до 4%, остальной объем занимает гидратированная ПЭФ. В содержимом желудка гидатированная ПЭФ занимает от 84 до 98% объёма.

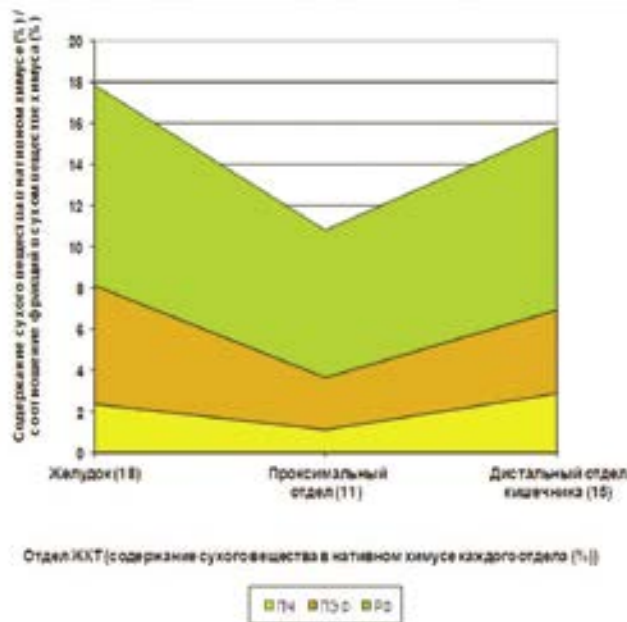


Рис. 3. Содержание сухого вещества в нативном химусе разных отделов желудочно-кишечного тракта и соотношение фракций в сухом веществе химуса клариевого сома (*Clarias gariepinus*).

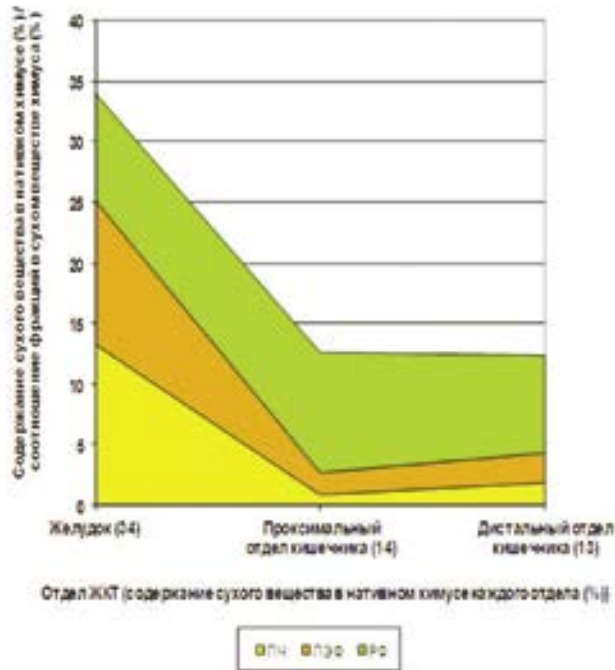


Рис. 4. Содержание сухого вещества в нативном химусе разных отделов желудочно-кишечного тракта и соотношение фракций в сухом веществе химуса ручьевой форели (*Parasalmo mykiss*).

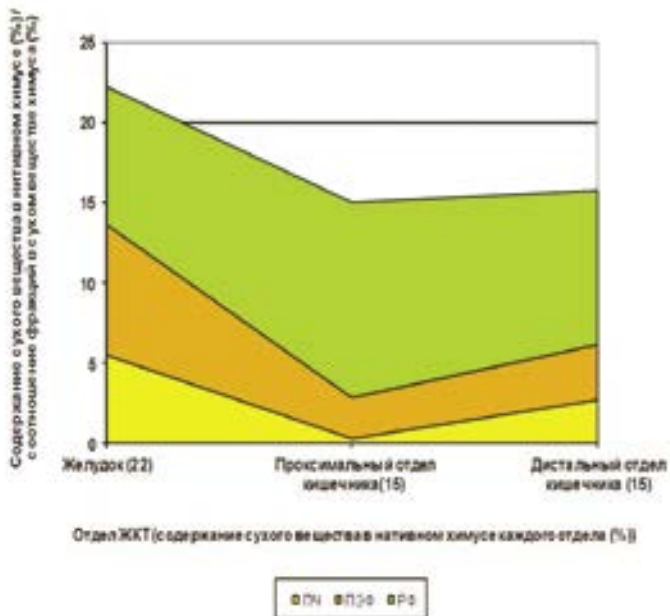


Рис. 5. Содержание сухого вещества в нативном химусе разных отделов желудочно-кишечного тракта и соотношение фракций в сухом веществе химуса ленского осетра (*Acipenser baeri*).

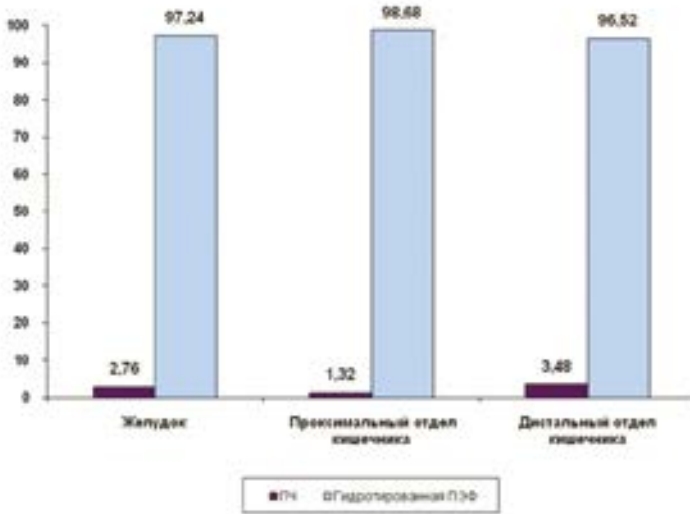


Рис. 6. Соотношение пищевых частиц и энтеральной среды в нативном химусе клариевого сома (*Clarias gariepinus*), %.

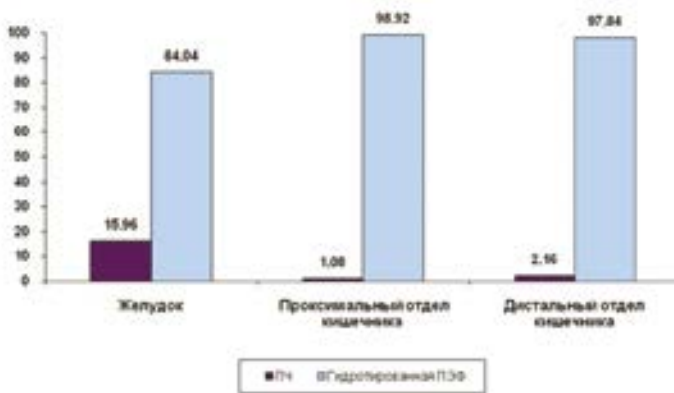


Рис. 7. Соотношение пищевых частиц и энтеральной среды в нативном химусе ручьевой форели (*Parasilmo mykiss*), %.

Таким образом, мы показали, что наши данные о структуре химуса цыплят-бройлеров и рыб с разным типом питания идентичны структуре химуса других видов животных [5, 7, 8, 12]. Это подтверждает гипотезу о том, что основная масса нативного химуса (до 90%) – это гидратированная плотная эндогенная фракция (слизь), которая силь-

но разбавляет поступающую из желудка пищу большим количеством эндогенных образований (секреты застенных и кишечных желёз, бокаловидных клеток, отторгающиеся энтероциты). Давно известно, что слизи в кишечнике много, но мы впервые разработали методику разделения эндогенных и экзогенных образований и определили их количе-

ственные соотношения. Мы показали, что у разных видов животных с разным типом питания в химусе одинаковое соотношение экзогенных и эндогенных образований.

Такая масса слизи не может выполнять только защитную функцию, как это принято считать. По-видимому, слизь в таком количестве физиологически необходима и в процессах пищеварения выполняет собственную специфическую функцию. Вероятно, она же (гидратированная слизь) обеспечивает и гомеостатичность химуса в целом. Ранее методом малоугловой рентгеновской дифракции нами было показано, что рентгенограммы от различных ПЭФ ЖКТ очень похожи [13, 14].

Согласно литературным данным, слизь представляет собой мукополисахаридные образования, взаимодействие которых друг с другом через катионные мостики определяет физико-химическое состояние формируемой ими среды – гель или золь [3, 6, 14]. В основе плотной эндогенной фракции – полостная слизь. Поэтому структура плотной эндогенной фракции аналогична структу-

ре слизистых образований разного происхождения (кожная слизь рыб, слизь верхних дыхательных путей, слюны и т.п.). Рентгеноструктурный анализ ПЭФ разных отделов ЖКТ кролика, проведенный нами совместно с учеными-биофизиками, показал структурированность слизистых образований данной составляющей химуса. Наиболее упорядоченный характер мицелл мукополисахаридов ПЭФ характерен для химуса двенадцатиперстной кишки [2, 9].

Выводы

Данные, полученные нами ранее [5, 7, 8, 12], и результаты этих опытов дают право пересмотреть традиционный взгляд о защитной роли полостной слизи: по-видимому, она выполняет и важные физиологические функции.

Во-первых, плотная эндогенная фракция, составляя большую часть химуса кишечника, определяет гомеостазирование химуса в целом каждого отдела ЖКТ путем эндогенного регулирования.

Во-вторых, она обеспечивает контакт экзогенного субстрата с гидролитиче-

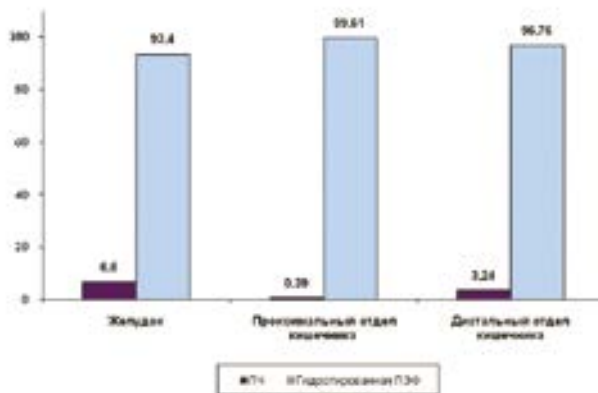


Рис. 8. Соотношение пищевых частиц и энтеральной среды в нативном химусе ленского осетра (*Acipenser baeri*), %.

скими ферментами поджелудочного и кишечного соков в полости кишки путём обволакивания каждой пищевой частицы слоем слизи с фиксированными на ней гидролитическими ферментами.

В-третьих, в желудке каждая пищевая частица прошла подготовительную обработку под действием соляной кислоты, которая её разрыхлила и привела к образованию в пищевой частице микропор. Мы предполагаем, что эти микропористые пространства в проксимальной части кишечника заполняются слизистыми компонентами с фиксированными на них гидролитическими ферментами. Таким образом, полостное пищеварение в нашей схеме не является низкоэффективным, поскольку контакт пищевой частицы с полостным ферментом не имеет вид случайного события. По нашим представлениям, пищевая частица в полости кишки подвергается гидролизу не только снаружи, но и изнутри.

В-четвертых, ПЭФ, составляя большую часть химуса, неминуемо вступает в контакт со слизистыми наложениями. При этом образуется структурируемая система транспорта между полостью кишки и щеточной каймой слизистой оболочки, обеспечивающая направленное и регулируемое движение нутриента к энтероцитам через систему гликокаликса.

Список литературы

1. *Алиев А.А.* Обмен веществ у жвачных животных. - М. НИЦ «Инженер». 1997.
2. *Вазина А.А., Симонова Н.Б., Герасимов В.С., Полякова Е.П.* Изучение слизей разных отделов ЖКТ млекопитающих методом малоугловой рентгеновской дифракции. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Прил. 17. Т. XII. № 5 (Мат-лы 8 Российской гастроэнтерологической недели). - М. 2002.

3. *Гальперин Ю.М., Лазарев П.И.* Пищеварение и гомеостаз. - М.: Наука. 1986. 304 с.
4. *Георгиевский В.И., Полякова Е.П.* Кишечный химус и процессы всасывания: новые аспекты // Актуальные проблемы биологии в животноводстве. - Боровск. 1997. 128 с.
5. *Георгиевский В.И., Полякова Е.П., Шевелёв Н.С.* Динамика формирования химуса в желудочно-кишечном тракте жвачных // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. Прилож. 11. Т. X. № 5. (Мат-лы 6 гастроэнтерологической недели). - М. 2000. С. 50.
6. *Железная А.Н.* Муцины – новый подкласс гликопротеидов // Успехи биологии. 1997. Т. 37. С. 115-146.
7. *Полякова Е.П., Ксенофонтов Д.А., Барбосова М.Е.* Абсорбция аминокислот, кальция и марганца в разных отделах желудочно-кишечного тракта кур в зависимости от уровня марганца в рационе // Проблемы биологии продуктивных животных. 2013. № 1. С. 75-84.
8. *Ревякин А.О.* Энтеральный обмен и абсорбция минеральных элементов у коз при различном содержании цинка в рационе: дисс... канд. биол. наук - 03.00.13. - М. 2006. 120 с.
9. *Симонова Н.Б., Полякова Е.П.* Рентгенодифракционное и рентгенофлуоресцентное исследование слизей разных отделов желудочно-кишечного тракта кролика (Мат-лы национальной конференции по применению рентгеновского, синхротронного излучения нейтронов и электронов для исследования материалов). - М. 2003. 163 с.
10. *Синецёков А.Д.* Биология питания сельскохозяйственных животных. - М.: Колос. 1965. 145 с.
11. *Уголев А.М.* Мембранное пищеварение. - Л.: Наука. 1972. 358 с.
12. *Шевелёв Н.С., Полякова Е.П., Лабунская Н.А.* Слизистые образования и их роль в обмене минеральных элементов у валухов // Доклады ТСХА. – М.: Изд. МСХА. 2002. Вып. 274. С. 205-210.
13. *Шлыгин Г.К.* Межорганный обмен нутриентами и пищеварительная система. - М.: Изд-во МГУ. 1997. 136 с.
14. *Allen A., Carroll N.J.H., Hirst V.H., Kaura R.* High viscosity mucus glycoproteins aggregate in cat gastric juice following secretion // J. Physiol. 1984. Vol. 349. P. 111-116.

The role of endogenous formations in the formation of chyme in fish and birds

E.P. Polyakova, M.E. Barbosova, L.Kh. Kazakova

The structure of the chyme of the gastrointestinal tract and the mechanisms of its formation were studied in experiments on different classes of vertebrates. The authors have developed a technique of separation the chyme to endogenous and exogenous formations to determine the ratio of these chyme formations in different parts of the gastrointestinal tract of said animal. Found that chyme weight at 85-99% consists of hydrated cavitary mucus complex composition, which was named “a dense endogenous fraction” (DEF), and 1-16% of the food particles. The authors hypothesize that DEF plays an important role in texturing the structure of the chyme and is the main endogenous formation of organizing luminal hydrolysis and provide directional movement of nutrients to the apical surface of enterocytes.

Key words: enteric digestion, chyme structure, cavernous mucus, fish, chicken broiler.

Активность щелочной фосфатазы в пристеночной и полостной слизи разных отделов кишечника у мини-свиней светлогорской популяции

Е.П. Полякова¹, Т.А. Макашова¹, Т.В. Метревели¹, А.О. Ревякин²

¹ – ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А.Тимирязева, Москва

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

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

В опытах на мини-свиньях исследована динамика активности щелочной фосфатазы в стенке кишечника и химусе всех отделов кишечника. В результате исследований обнаружена активность фермента в химусе и стенке кишки всех отделов кишечника. При этом в стенке кишки более высокая активность фермента была отмечена в слизистых наложениях тонкого отдела кишечника. По фракциям химуса активность фермента была распределена неравномерно. Большая активность отмечалась в плотной эндогенной фракции.

Ключевые слова: мини-свиньи, химус, щелочная фосфатаза, плотная эндогенная фракция, стенка кишки, полостная слизь.

Введение

В процессах пищеварения принимают участие множество ферментов, одним из которых является щелочная фосфатаза (ЩФ). Фермент локализуется, прежде всего, в костной ткани, паренхиме и стенках желчных протоков печени, проксимальных отделах извитых канальцев почек, предстательной железе, лактирующей молочной железе, клетках слизистой оболочки кишечника, плаценте, и особенно его много в растущих костях. Локализуясь в клеточной мембране, ЩФ участвует в транспорте биологических соединений. Она присутствует в каждом органе: наиболее высокая активность обнаружена в эпителии слизистой оболочки кишечника, эпителии канальцев почек, остеобластах, гепатоцитах и плаценте, но, несмо-

тря на это, основным местом выработки ЩФ являются энтероциты слизистой оболочки кишечника [11]. ЩФ гидролизует глюкофосфаты, фосфолипиды, фосфонуклеотиды. Доказано участие этого фермента в процессах всасывания углеводов, аминокислот, их транспорте через клеточную мембрану, фосфорилировании, синтезе гликогена и других процессах [9].

Однако исследования активности ЩФ в полости кишки не проводились, поскольку в настоящее время энтеральная среда (химус) рассматривается как бесформенная масса, в которой механически перемешаны пищевые частицы и пищеварительные соки, и где встреча субстрата и фермента носит случайный характер, а финальный гидролиз происходит на апикальной поверхности

слизистой оболочки в области гликокаликса. При этом слой слизи, покрывающий слизистую оболочку по всей длине кишечника, не учитывается [12, 13]. Вместе с тем, в последнее время в литературе появились сведения о том, что химус – сложное эндогенное образование, основу которого составляет полостная слизь [1, 2, 3], которой дали название «плотная эндогенная фракция» (ПЭФ) [4, 5]. Оказалось, что ПЭФ – сложное эндогенное структурное образование, основу которого составляет десквамированная слизистая оболочка, слизистые наложения, секрет бокаловидных клеток пищеварительные ферменты и другие вещества. Показано, что в цельном химусе минеральные элементы, такие как Ca, Mn, Zn, адсорбируются ПЭФ, а K, Na – остаются в растворимой фракции. P и Mg обнаруживаются в ПЭФ и РФ, определено упорядоченное распределение их вдоль кишечника [6].

В опытах *in vitro* Ю. Гальперин показал, что в секрете поджелудочной железы ферменты связаны с гликопротеинами. Имеются данные об активности ЩФ в слизистой оболочке [12, 14, 15] и в слизистых наложениях [2, 7, 8, 10], но при этом отсутствуют сведения о динамике активности этого фермента в полости кишки по длине кишечника и их локализации во фракциях химуса.

В связи с этим, нами было поставлена **цель** – изучение активности ЩФ в полости кишечника.

Благодаря разработанной на кафедре физиологии и биохимии ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева методике разделения химуса на экзогенные и эндогенные составляющие, мы смогли определить динамику актив-

ности ЩФ в цельном химусе, его фракциях (ПЭФ и РФ), а также в слизистой оболочке и слизистых наложениях.

Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории кафедры физиологии, этологии и биохимии животных ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Объектом исследования являлись мини-свиньи светлогорской популяции в возрасте 6 лет. Кормление животных осуществлялось согласно принятой схеме, стандартным комбикормом. Животные содержались в групповых клетках.

Для исследования животных через 3 ч после кормления умерщвляли, извлекали кишечник. Из всех отделов кишечника для определения активности ЩФ отбирали образцы цельного химуса, часть которого подвергали разделению на следующие фракции: плотная эндогенная фракция, растворимая фракция и пищевые частицы. Из стенки кишечника выделяли слизистую оболочку и слизистые наложения, в которых также определяли динамику активности фермента.

Активность ЩФ в образцах определяли с использованием стандартных наборов «Витал-Диагностикс».

Результаты и их обсуждение

В нашем эксперименте было обнаружено, что активность ЩФ была достаточно низкой в слизистой оболочке тонкого отдела кишечника (12-перстная и тощая кишки), однако в подвздошной кишке отмечалось существенное увеличение активности (рис. 1). В слепой кишке наблюдалось резкое снижение активности ЩФ, которое сохранялось в ободочной и прямой кишках.

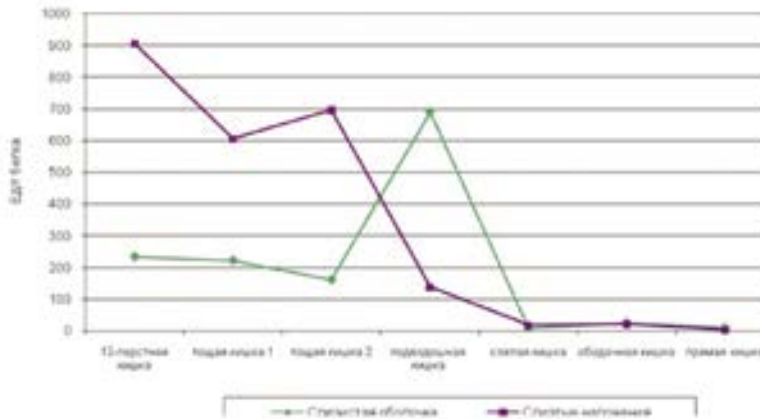


Рис. 1. Активность ЩФ в слизистой оболочке и слизистых наложениях.

В слизистых наложениях наблюдалась иная картина. Максимальная активность была обнаружена в 12-перстной кишке, которая оставалась на достаточно высоком уровне в тощей кишке. В подвздошной кишке наблюдалось снижение активности фермента, она несколько уменьшилась в слепой кишке и оставалась на этом уровне в ободочной и прямой кишках.

Полученные нами результаты в целом совпадают с имеющимися литературными данными [9, 7].

Активность фермента в полости кишки мало изучена. Наши исследования показывают, что активность фермента по длине кишечника имеет выраженную динамику.

Активность ЩФ в цельном химусе достаточно высокая (на уровне активности в слизистых наложениях) до подвздошной кишки. А в слепой кишке отмечалось резкое снижение активности ЩФ, которая не менялась в ободочной и прямой кишках.

Методика разделения химуса, разработанная на кафедре физиологии, этоло-

гии и биохимии животных ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА, позволила нам изучить динамику активности ЩФ в ПЭФ и РФ. В результате чего было обнаружено, что активность фермента неравномерно распределена во фракциях. Активность ЩФ более высокая в ПЭФ, чем в РФ. Динамика активности в обеих фракциях идентична, но сильно колеблется по отделам кишечника (рис. 2).

Высокая активность наблюдалась в 12-перстной кишке, после чего отмечалось снижение в 2-3 раза в тощей кишке и последующее увеличение в подвздошной кишке. В слепой кишке активность фермента резко снизилась и оставалась на низком уровне в ободочной и прямой кишках.

Заключение

Таким образом, результаты наших исследований позволяют сделать заключение, что ЩФ проявляет свою активность как в слизистой оболочке, так и в полости кишки. При этом в слизистой оболочке большая её активность обнаруживается в слизистых наложениях

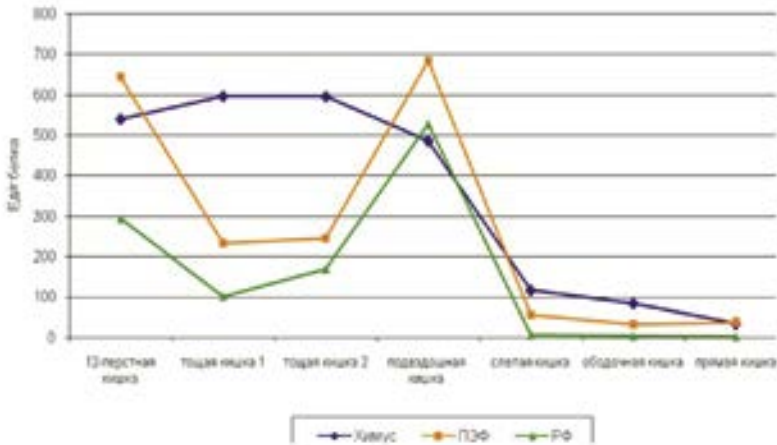


Рис. 2. Активность ЩФ в цельном химусе и его фракциях.

тонкого отдела. Это, по-видимому, связано с функцией Бруннеровых и Либеркюновых желёз, в секрете которых и содержится данный фермент.

В полости кишки при этом активность фермента объясняется поступлением секрета поджелудочной железы и желчи, а также содержанием ЩФ в десквамированных в полость кишки слизистых наложениях. Как известно, функция ЩФ и механизм её действия заключается в отщеплении остатка фосфорной кислоты от активных метаболитов. В результате расщепления фосфоэфирной связи образуются продукты, которые доступны для последующего гидролиза другими ферментами или могут быть эвакуированы в нижележащие отделы.

Обнаруженное увеличение активности фермента в слизистой оболочке, ПЭФ и РФ, в подвздошной кишке и ранее показанное увеличение концентрации кальция и фосфора в ПЭФ и РФ в этом отделе кишечника могут свидетельствовать о связи фермента с абсорбцией этих элементов.

В литературе имеются данные, что кишечные ферменты и щелочная фосфатаза, в частности, после выполнения своей физиологической роли, переходя с химусом в толстый отдел кишечника, разрушается в его дистальном отделе. Однако наши исследования показывают, что происходит резкое снижение активности фермента в толстом кишечнике.

Список литературы

1. Гальперин Ю.М., Костюченко Л.Н., Железная Л.А., Денисова Е.А. Роль гликопротеинов в образовании флокулярных гелевых структур естественного пищеварения // Физиол. журнал СССР. 1990. № 8. С. 1068-1071.
2. Гальперин Ю.М., Лазарев П.И. Структура пищеварительно-транспортных процессов в тонкой кишке // Журн. общ. биологии. 1985. № 1. С. 108-113.
3. Гальперин Ю.М., Лазарев П.И. Пищеварение и гомеостаз. - М.: Наука. 1986. 304 с.
4. Георгиевский В.И., Полякова Е.П. Кишечный химус и процессы всасывания: новые аспекты (Мат-лы Второй международной конференции). - Боровск. 1995. С. 128-134.
5. Георгиевский В.И., Шевелёв Н.С., Полякова Е.П. Роль эндогенных структур химуса в поддержании кишечного гомеостаза // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии (Мат-лы Чет-

- вёртой Российской гастроэнтерологической недели). – М. 1998. Т. 8. № 5. Прил. 11. С. 267-268.
6. **Иванов А.А., Полякова Е.П., Ксенофонтов Д.А.** Общебиологический феномен депонирования катионов структурами химуса и его значение для создания смесей энтерального питания // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012. № 2. С. 71-75.
 7. **Морозов И.А.** Структура и функции слизистого слоя тонкой кишки // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2002. № 6. С. 88-92.
 8. **Морозов И.А., Ишакова В.Ю., Лысков Ю.А.** О пищеварительной функции надэпителиального слизистого слоя тонкой кишки // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1990. Т. 76. № 4. С. 515-522.
 9. **Морозов И.А., Лысков Ю.А., Питран Б.В., Хвьяля С.И.** Всасывание и секреция в тонкой кишке (субмикроскопические аспекты). - М.: Медицина. 1988. 224 с.
 10. **Питран Б.В., Алтавин А.Б., Ансима М.П.** Использование гелевых реплик для изучения субстрат-связывающих компонентов надмембранной зоны энтероцитов // Ассимиляция питательных веществ в организме животных. - Рига: Зинатне. 1986. С.138-149.
 11. **Самсонович В.А.** Активность щелочной фосфатазы содержимого и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у свиней // Вести национальной академии наук Беларуси. 2013. № 1. С.84-87.
 12. **Уголев А.М.** Контактное (пристеночное) пищеварение. - М. 1963. 170 с.
 13. **Уголев А.М.** Мембранное пищеварение. - Л.: Наука. 1972. 358 с.
 14. **Allen A.** Mucus as protective secretion of complexity // TIBS. 1983. № 5. P. 169-174.
 15. **Allen A., Cunliffe W.J., Pearson J.P., et al.** Studies on gastrointestinal mucus // Scand. J. Gastroenterol. 1984. Vol. 19. P. 101-113.

Activity of alkaline phosphatase in parietal and band slime of different intestine departments at Svetlogorsk population of mini-pigs

E.P. Polyakova, T.A. Makashova, T.V. Metreveli, A.O. Revyakin

The dynamics of the activity of alkaline phosphatase in the intestinal wall and the chyme all intestines was investigated in experiments on mini pigs. Research discovered the enzyme activity in the chyme and the wall of the intestine of all departments of the intestine. In the wall of the intestine higher enzyme activity was observed in mucous overlays a thin intestine. Alkaline phosphatase activity was detected in the chyme of all intestines. Fractions chyme enzyme activity was not evenly distributed. Most activity was observed in the dense endogenous fraction.

Key words: mini-pigs, chyme, alkaline phosphatase, dense endogenous fraction, intestinal wall, cavity mucus.

Патология печени рыб, вызванная Парацетамолом

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

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

² – ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства, Московская область

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

Модельный эксперимент показал, что введение молоди карпа парацетамола per os в дозе 15 г/кг вызывает патологию печени. Смесь парацетамола с 50% спиртом вызвала повышение активности АСТ примерно в 3 раза. У опытных рыб нарушается морфологическая структура печени.

Ключевые слова: карп (*Ciprinus carpio L.*), печень, парацетамол, биохимические исследования, активность ферментов, гистология паренхиматозных органов.

Введение

Модельные эксперименты в медицине применяются для изучения действия препаратов на животных и последующей экстраполяции результатов на человека [1, 2, 3]. В последнее время в качестве альтернативных биомоделей начинают использовать рыб: они достаточно доступны для исследования и у них легче вызвать патологию, т.к. данные организмы являются пойкилотермными гидробионтами. Использование рыб объясняется и этическими соображениями: они находятся на более низкой ступени эволюционного древа, чем млекопитающие [9, 10, 12, 13]. Относительно восприятия болевых импульсов у рыб ведутся дебаты, однако большинство авторов склонны считать, что у рыб понижен болевой порог чувствительности [7, 11, 15].

В данной работе проведено моделирование патологии печени у рыб с помощью Парацетамола. Препарат выбран

из-за его доступности, относительно низкой стоимости и быстрого токсического эффекта, усиливающегося при добавлении спирта.

Парацетамол (международное название – Paracetamol; ацетаминофен; парацетаминофенол; N-(4-гидроксифенил)-ацетамид; 4-гидроксиацетанилид) применяется как жаропонижающее и анальгезирующее средство. Однако препарат обладает гепатотоксическим и нефротоксическим действием. Он блокирует обе формы фермента циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), ингибируя синтез простагландинов (Pg). В периферических тканях клеточные пероксидазы нейтрализуют влияние Парацетамола на ЦОГ. Метаболизация Парацетамола в печени происходит, в основном, путём конъюгации с глюкуроновой и серной кислотами с образованием нетоксичных метаболитов глюкорангида и сульфата Парацетамола. В меньшем количестве

под влиянием Цитохрома Р450 образуются ещё два метаболита, которые обладают токсическим действием: парааминофенол и N-ацетилбензохинон. Под влиянием парааминофенола образуется метгемоглобин; в результате происходит кислородное голодание тканей. N-ацетилбензохинон обладает повреждающим действием по отношению к клеткам печени, вызывая их некроз. При применении Парацетамола в терапевтических дозах N-ацетилбензохинон обезвреживается глутатионом и после конъюгации с цистеином и меркаптуровой кислотой выделяется почками. При приёме Парацетамола в высоких дозах (выше 150 мг/кг) возникает дефицит глутатиона и повышается уровень N-ацетилбензохинона, что может привести к некрозу ткани печени. Выводится Парацетамол из организма с мочой, в основном – в виде метаболитов, глюкуроновых конъюгатов (60-80%) и сульфоконъюгатов (20-30%) и незначительно (3-5%) в неизменном виде [6, 8].

Целью настоящей работы являлось моделирование патологии печени рыб.

Материалы и методы

Объектами эксперимента являлись сеголетки карпа (*Cyprinus carpio L.*) чешуйчатой и зеркальной групп. Патология печени рыб была смоделирована Парацетамолом. Препарат вводился *per os* в дозе 15 г/кг с 1 мл дистиллированной

воды 7-кратно в течение 14 дней по схеме (табл. 1). В качестве контроля были взяты рыбы, которым препарат не вводился. Количество рыб в эксперименте – 39 особей.

В процессе эксперимента у рыб прижизненно из хвостовой вены отбирались пробы крови для биохимических исследований, которые осуществлялись на анализаторе «Reflotron».

Вскрытие опытных объектов производилось на 7, 14 и 21 день после курса введения Парацетамола. Внутренние органы фиксировались в 10% растворе формалина. Затем после обезвоживания и заливки в парафин готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином. Гистологические исследования проводились с помощью цифровой микроскопии.

Результаты и их обсуждение

Гибели рыб контрольной группы не отмечалось. Во второй группе (Парацетамол+вода) на 9 сутки от начала эксперимента погибла одна рыба. В группе 3 (Парацетамол+спирт) наблюдалась гибель шести рыб на 5, 9, 21 сутки от начала эксперимента. Одна рыба была забита на 32 сутки.

У рыб 2-й группы произошло снижение активности АСТ, в группе 3 – усиление (табл. 2).

Таблица 1

Схема введения препаратов молоди карпа

Группа 1	Группа 2	Группа 3
	<i>per os</i> через день 7 раз	
Контроль без введения препаратов	Парацетамол 15 г/кг + 1 мл дистиллированной воды	Парацетамол 15 г/кг + 1 мл 50% спирта

Активность АСТ в крови экспериментальных карпов, ед/л

Контроль	Группа 2 парацетамол + вода	t_2	Группа 3 парацетамол + спирт	t_3
74,9±16,1	20,0±6,2	3,2	287,0±8,9	11,5

Примечание: t – доверительный коэффициент (по сравнению с контролем).

АСТ (аспартатаминотрансфераза) – индикатор поражения клеток печени. При повреждении клетки фермент довольно быстро обнаруживается в крови. Факт увеличения уровня АСТ в 3-й опытной группе свидетельствует об усилении токсичности Парацетамола спиртом. Известно, что возрастание активности происходит и при болезнях печени различной этиологии.

В нашем эксперименте это подтверждается гистологическими исследованиями.

У рыб контрольной группы патологических изменений структуры печени и гепатоцитов не обнаружено (рис. 1).

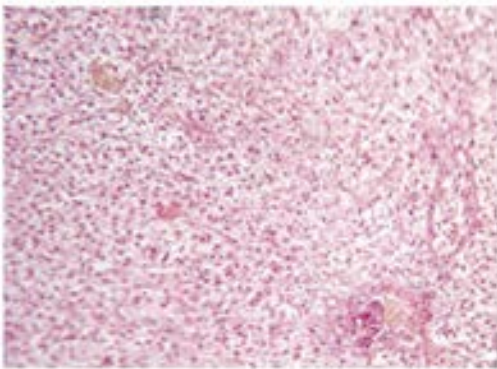


Рис. 1. Нормальная картина печени. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

В микроскопическом исследовании погибшей рыбы из второй группы (Парацетамол+вода) отмечались очаги жировой дистрофии гепатоцитов, неко-

торые клетки – безъядерные. Умеренно выраженное серозное воспаление в стенке прилежащего крупного желчного протока с вакуольной дистрофией его эпителиальной выстилки. У остальных рыб, забитых на 18 и 32 сутки от начала эксперимента, наблюдались очаги зернистой белковой дистрофии гепатоцитов с неравномерным окрашиванием их цитоплазмы (что может свидетельствовать о снижении содержания гликогена), единичные жировые вакуоли в печеночных клетках, незначительная или умеренная круглоклеточная инфильтрация портальных трактов. На 37 сутки обнаруживается жировая дистрофия (от очаговой до субтотальной) печеночных клеток (рис. 2).

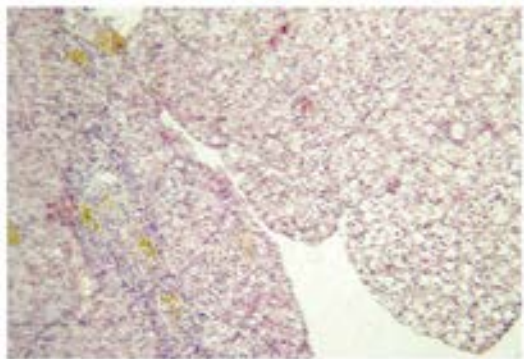


Рис. 2. Очаги жировой дистрофии гепатоцитов. Инфильтрация портального тракта клетками белой крови с переходом на паренхиму. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

В печени рыб 3-й группы имелись лейкоциты в просвете некоторых сосудов, цитоплазма гепатоцитов неравномерно окрашена, выраженные дистрофические изменения клеток вплоть до некроза, местами небольшое количество клеток белой крови в синусоидах, гиперплазия прилежащей лимфоидной ткани, неравномерно выраженный склероз портальных трактов с круглоклеточной инфильтрацией и примесью единичных макрофагов. Подобные патологические изменения характерны для жировой дистрофии печени (ЖДП) алкогольного генеза [4, 5, 14]. Можно предположить, что наблюдаемые нами нарушения печени связаны с добавлением к Парацетамолу спирта.

Выводы

Таким образом, показано, что при введении Парацетамола per os в дозе 15 г/кг семикратно в течение 14 дней у молодого карпа отмечались нарушения на органном и клеточном уровнях. Действие препарата усиливается смешиванием с 50% спиртом. Степень выраженности патологических процессов зависит от длительности введения Парацетамола и спирта. Это подтверждено биохимическими и гистологическими исследованиями.

Список литературы

1. *Адо А.Д.* Патологическая физиология. - М.: Три-ада-Х. 2000. 574 с.

2. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. - М.: Изд-во ВПК. 2005. 608 с.
3. *Крыжановский Г.Н.* Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // Вест. Рос. АМН. 1997. № 5. С. 60-62.
4. *Подымова С.Д.* Болезни печени. - М.: Медицина. 2005. 768 с.
5. *Хазанов А.И.* Важная проблема современности – алкогольная болезнь печени // Рос. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 2003. № 2. С. 13-20.
6. *Brodie B.B., Axelrod J.* The fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1949. 94 (1). P. 58-67.
7. *Cameron A.A., Plenderleith M.R., Snow P.J.* Organization of the spinal cord in four species of elasmobranch fish: Cytoarchitecture and distribution of serotonin and selected neuropeptides. Journal of Comparative Neurology. 1990. 297. P. 210-218.
8. *Chandrasekharan N.V., Dai Hu, Roos K.L.T., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression // Proc Natl Acad Sci. USA. 2002. T. 99. № 21. P. 13926-13931.
9. *Evans D.H., Claiborne J.B.* The Physiology of Fishes, 3th edn. 2005. 616 p.
10. *Johansen R., Needham J.R., Colquhoun D.J., Poppe T.T., Smith A.J.* Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. Laboratory Animals. 2006. 40. 323-340.
11. *Leonard R.B.* Primary afferent receptive field properties and neurotransmitter candidates in a vertebrate lacking unmyelinated fibres. Progress in Clinical Biological Resources. 1985. 176. 135-145.
12. *Posner L.P.* Pain and distress in fish: A review of the evidence. Institute for Laboratory Animal Research Journal. 2009. 50. 327-328.
13. *Powers D.A.* Fish as model systems. Science. - New York. 1989. 246. P. 352-358.
14. *Ramstedt M.* Alcohol and pancreatitis mortality in the population level: experiences from 14 western countries. Addiction 2004; 99: 1255-1261.
15. *Snow P.J., Plenderleith M.B., Wright L.L.* Quantitative study of primary sensory neurone populations of three species of elasmobranch fish. Journal of Comparative Neurology. 1993. 334.

The pathology of fish liver caused by Paracetamol

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

Model experiment showed that introduction of paracetamol to a carp of per os Paracetamol in a dose of 15 g/kg causes liver pathology. Paracetamol mixed with 50% alcohol caused the increase of activity of aspartate aminotransferase approximately 3 times. In skilled fishes the morphological structure of liver is broken.

Key words: carp (*Ciprinus carpio L.*), liver, paracetamol, biochemical researches, activity of enzymes, histology of Parenchymatous bodies.



Фармакогенетическое тестирование по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *MDR1* у беременных с хронической артериальной гипертензией

Е.А. Сокова, В.Г. Кулес

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

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

Изучено значение фармакогенетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* у беременных с хронической артериальной гипертензией (ХАГ) I и II степени. Генетическое тестирование по идентификации аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* и полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* проводилось у 65 русских беременных с ХАГ и 86 практически здоровых беременных женщин. Показано, что носительство генотипов *16GlyGly+3435TT* беременными ассоциировано с II степенью ХАГ и предшествующим неблагоприятным акушерским анамнезом. Впервые выявлена значимая ассоциация носительства генотипов *16ArgArg+3435CC* и дозы бета-адреноблокатора (β -АБ) Бисопролола у беременных с ХАГ. Установлены различия в частотах аллелей и генотипов по изученным полиморфным маркерам у беременных русских женщин с ХАГ, родивших детей с нормальным и пограничным индексом Пондерала при лечении Бисопрололом.

Ключевые слова: гликопротеин Р, полиморфный маркер *C3435T* гена *ABCB1*, β_2 -адренорецептор, полиморфный маркер *Arg16Gly* гена *ADRB2*, беременность, хроническая артериальная гипертензия, бета-адреноблокатор.

Введение

В настоящее время участие протеинов множественной лекарственной устойчивости, в первую очередь, *ABCB1* (*MDR1*) и их полиморфизмов, а также полиморфизмов гена *ADRB2*, в развитии, становлении и лечении артериальной гипертензии находят-

ся на стадии разработок. Результаты, полученные исследователями в эксперименте и в клинике, демонстрируют вклад гликопротеина Р в регуляцию артериального давления, возможно, через ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, а также его участие в ограничении поступления и распре-

деления ЛС в «таргетные» органы, в т.ч. и плаценту [9, 14, 15]. Физиологические гестационные изменения при беременности, касающиеся гемодинамических, гормональных, метаболических и других параметров, вносят свой, дополнительный вклад в патогенетические механизмы развития АГ, которые до конца неясны. Роль гликопротеина Р в молекулярных механизмах, лежащих в основе формирования ХАГ у беременных, а также в различных осложнениях при беременности, к настоящему моменту практически не изучена. С другой стороны, учитывая роль β_2 -адренорецепторов (β_2 -АР) в вазодилирующей физиологической регуляции артериального давления при беременности, а их полиморфизмов – в модулировании десенситизации этих рецепторов и, соответственно, изменении вазодилатации, представляется важным изучение генетического полиморфизма гена *ADRB2*, кодирующего β_2 -АР, у беременных с артериальной гипертензией, для понимания патофизиологических механизмов её возникновения, прогнозирования течения беременности, перинатальных исходов, а также для выбора тактики лечения β -адреноблокаторами.

Материалы и методы

Генетическое тестирование по идентификации аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* и полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* проведено у 65 беременных с ХАГ I и II степени и 86 практически здоровых беременных женщин, которые находились под наблюдением во II и III триместрах беременности (средний возраст – $29,62 \pm 0,67$ лет). Наци-

ональность обследованных женщин устанавливалась на основании их устного опроса. Обследование и лечение пациенток с ХАГ проводилось на базе специализированного кардиологического отделения для беременных ГКБ № 67, группа практически здоровых беременных обследована на базе женской консультации ГКБ № 71. Перед началом исследования было получено разрешение Локального этического комитета. Отбор пациенток для исследования проводился согласно критериям включения/невключения во II триместре беременности (14-16 недель гестации). Диагноз ХАГ устанавливали в соответствии с классификацией АГ при беременности [1, 2, 8].

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

Эффективность проводимой терапии оценивали по динамике клинических симптомов, показателям физикального осмотра и динамике показателей лабораторно-инструментальных методов обследования. Первичным критерием отличной оценки эффективности считали снижение уровня офисного АД и всех стандартных показателей СМАД до целевых уровней. Оценка безопасности включала мониторинг и регистрацию нежелательных явлений на протяже-

нии всего исследования. Критериями безопасности лечения считали отсутствие нежелательных явлений во время исследования при оценке причинно-следственной связи с исследуемым препаратом, отсутствие атриовентрикулярных блокад (AV-блокад) по ЭКГ и мониторингованию ЭКГ по Холтеру (ХМ-ЭКГ), отсутствие негативного влияния на маточно-плацентарный кровоток и данные кардиотокографии (КТГ).

Генотипирование по полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* и полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* проводили методом ПЦР-ПДРФ. Образцы ДНК предварительно выделялись из лейкоцитов стандартным фенольным методом.

Статистическую обработку полученных в ходе исследования результатов проводили с помощью программы «Statistica» for Windows 6.0 (StatSoft Inc.). Достоверность наблюдаемых различий качественных показателей оценивали методом хи-квадрат, при необходимости использовали поправку Йетса, двусторонний критерий Фише-

ра. Уровень достоверности был принят как достаточный при $p < 0,05$. При проведении корреляционного анализа использовалась τ (τ_{ay}) – корреляция Кендалла.

Результаты исследований

Частоты аллелей и генотипов по полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* и полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* у пациенток с ХАГ и в контрольной группе беременных подчинялись закону Харди-Вайнберга.

Как нами было показано ранее, частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* не ассоциированы с ХАГ I, II степени у русских беременных женщин [3].

Для реализации цели настоящего исследования мы изучили взаимосвязь полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* с ХАГ у русских беременных женщин (табл. 1).

Как видно из данных, представленных в табл. 1, в группе беременных с ХАГ и в контрольной группе наблюдалось практически одинаковое количест-

Таблица 1
Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* у пациенток с ХАГ и в контрольной группе

Наименование аллеля и генотипа	Распределение аллелей и генотипов у беременных с ХАГ и в контрольной группе (%), чел.		Уровень значимости (p)
	Беременные с ХАГ N=65	Контрольная группа N=86	
Arg16	45(34,6)	66(38,4)	0,582
Gly16	85(65,4)	106(61,6)	
16ArgArg	9(13,9)	15(17,4)	0,804
16ArgGly	27(41,5)	36(41,9)	
16GlyGly	29(44,6)	35(40,7)	

во гетерозиготных носителей генотипа *16ArgGly* (41,5% и 41,9% соответственно). Наиболее редким был генотип *16ArgArg* (14% и 18% соответственно). При сравнении групп по частотам аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* различия не достигли статистически значимого уровня ($p=0,582$ и $p=0,804$ соответственно). Частоты минорного аллеля *Arg16* в контрольной группе (0,384) соответствовали диапазону, обнаруживаемому в других европеоидных группах (0,38-0,46) [7].

Мы проанализировали частоты аллелей и генотипов по изученному полиморфизму у пациенток с ХАГ I, II степени и в контрольной группе (табл. 2).

Обращал на себя внимание тот факт, что у беременных с ХАГ II степени наблюдалось преобладание носительства гомозиготного генотипа *16GlyGly* и аллели *Gly16* в сравнении с беременными с ХАГ I степени и пациентками из контрольной группы (57,9%; 71,0% и 39,1%; 63,0% и 40,7% и 61,6% соответственно). Однако выборка, взятая

для исследования, недостаточна, чтобы установить статистически значимое различие в частотах носительства генотипа *16GlyGly* и аллели *Gly16* ($P=0,049$).

Следующим этапом нашего исследования явилась оценка результатов генетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* у пациенток с ХАГ I и II степени и в группах с наличием и отсутствием предшествующего неблагоприятного акушерского анамнеза (табл. 3 и 4).

Полученные данные свидетельствуют о наличии ассоциации изученного сочетания генотипов *16GlyGly+3435TT* с ХАГ II степени у беременных русских женщин ($p=0,052$).

В подгруппу с отягощенным акушерским анамнезом вошли 9 пациенток с самопроизвольными абортами в качестве исхода предыдущих беременностей и 5 пациенток с неразвивающимися беременностями (у двух из них неразвивающиеся беременности были зарегистрированы дважды).

Таблица 2

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* у пациенток с ХАГ I, II степени и в контрольной группе

Наименование аллеля и генотипа	Распределение аллелей и генотипов у беременных с ХАГ I, II степени и в контрольной группе (%), чел.			Уровень значимости (p)
	Беременные с ХАГ I степени N=46	Беременные с ХАГ II степени N=19	Группа контроля N=86	
Arg16	34(37,0)	11(29,0)	66(38,4)	0,551
Gly16	58(63,0)	27(71,0)	106(61,6)	
16ArgArg	6(13,1)	3(15,8)	15(17,4)	0,540
16ArgGly	22(47,8)	5(26,3)	36(41,9)	
16GlyGly	18(39,1)	11(57,9)	35(40,7)	

Таблица 3

Результаты генетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* у пациенток с ХАГ I, II степени

Наличие генотипов <i>16GlyGly+3435TT</i>	Распределение сочетания генотипов у пациенток с ХАГ I и II степени (%), чел.		Уровень значимости (p)
	Беременные с ХАГ I степени N=46	Беременные с ХАГ II степени N=19	
Нет	42 (91,3)	13 (68,4)	0,052
Есть	4 (8,7)	6 (31,6)	

Таблица 4

Результаты генетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* у пациенток с ХАГ I, II степени и неблагоприятным акушерским анамнезом

Наличие генотипов <i>16GlyGly+3435TT</i>	Распределение сочетания генотипов <i>16GlyGly+3435TT</i> у пациенток с ХАГ I и II степени и неблагоприятным акушерским анамнезом (%), чел.		Уровень значимости (p)
	Беременные с ХАГ без отягощенного акушерского анамнеза N=22	Беременные с ХАГ и отягощенным акушерским анамнезом N=14	
Нет	21 (95,45)	1 (4,55)	0,064
Есть	10 (71,43)	4 (28,57)	

Как видно из данных, представленных в табл. 4, носительство генотипов *16GlyGly+3435TT* наблюдалось у 28,6% пациенток с ХАГ и отягощенным акушерским анамнезом, в отличие от группы беременных с другими генотипами и отягощенным акушерским анамнезом (4,6%). Выявлена достоверная тенденция носительства изученных генотипов *16GlyGly+3435TT* с наличием в анамнезе акушерских осложнений у русских беременных женщин с ХАГ ($p=0,064$). Скорее всего, наличие тенденции можно объяснить малой выборкой исследования ($p=0,517$).

Следующий этап настоящего исследования состоял в изучении ассоци-

ации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* и полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* с эффективностью терапии β -АБ Бисопрололом. Результаты генетического тестирования, опубликованные нами ранее, показали отсутствие ассоциации полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* с эффективностью терапии β -АБ Бисопрололом [5]. Мы продолжили исследование и проанализировали результаты генетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* относительно дозы β -АБ Бисопролола, получаемого пациентками в течение настоящей беременности (табл. 5).

Таблица 5

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* в подгруппах беременных с ХАГ с различным режимом дозирования Бисопролола

Наименование аллеля и генотипа	Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера <i>Arg16Gly</i> у беременных с ХАГ с различным режимом дозирования Конкора® (%), чел.			Уровень значимости (p)
	Бисопролол 2,5 мг N=31	Бисопролол 5,0 мг N=26	Бисопролол 10,0 мг N=8	
Arg16	21 (33,87)	18 (34,62)	6 (37,50)	0,964
Gly16	41 (66,13)	34 (65,38)	10 (62,50)	
16ArgArg	4 (12,90)	3 (11,54)	2 (25,00)	0,811
16ArgGly	13 (41,94)	12 (46,15)	2 (25,00)	
16GlyGly	14 (45,16)	11 (42,31)	4 (50,00)	

Различия между группами беременных с различным режимом дозирования β-АБ Бисопролола по частотам аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* не достигли статистически значимого уровня (p=0,964 и p=0,811 соответственно). Это позволило сделать вывод об отсутствии ассоциации полиморфного *Arg16Gly* гена *ADRB2* с эффективностью терапии β-АБ Бисопролола.

Исходя из цели исследования, были проанализированы результаты генетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* у беременных с ХАГ I и II степени с различным режимом дозирования Бисопролола (табл. 6).

Анализ результатов генетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и поли-

Таблица 6

Результаты генетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* у беременных с ХАГ и различным режимом дозирования Бисопролола

Наличие генотипов 16ArgArg+3435CC	Распределение генотипов 16ArgArg+3435CC у беременных с ХАГ и различным режимом дозирования Конкора® (%), чел.			Уровень значимости (p)
	Бисопролол 2,5 мг	Бисопролол 5,0 мг	Бисопролол 10,0 мг	
Нет	31 (100)	26 (100)	6 (75,00)	<0,001
Есть	0 (0)	0 (0)	2 (25,00)	

морфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* выявил значимую ассоциацию носительства генотипов *16ArgArg+3435CC* и дозы β -АБ Бисопролола у беременных с ХАГ ($p < 0,001$). Это были пациентки, которые на 3-м визите после коррекции лечения по результатам СМАД и офисного АД получали лечение в дозе 10 мг/сут. Отношение шансов (ОШ) для генотипов *16ArgArg+3435CC* составило 24,9 [2,1; 289,8].

Таким образом, носительство генотипа *16ArgArg* по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и генотипа *3435CC* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* беременными с ХАГ повышает вероятность необходимого увеличения дозы Бисопролола до 10 мг при лечении ХАГ у беременных. Однако на данном этапе исследования генетический тест по идентификации гаплотипа *16ArgArg/3435CC* не может быть использован в качестве генетического предиктора антигипертензивного ответа на β -АБ Бисопролол у беременных с ХАГ, статистическая мощность исследования недостаточная ($p = 0,09$). Выявление генотипов *16ArgArg+3435CC* с чувствительностью 30,0% и специфичностью 98,3% прогнозирует вероятность повышения дозы Бисопролола до 10 мг; прогностическая ценность положительного результата составила 75,0%, отрицательного результата – 89,2%.

До настоящего времени продолжается дискуссия, влияет ли применение β -АБ или наличие ХАГ у беременных на гестационный возраст новорожденного. Поэтому на следующем этапе работы мы изучили влияние Бисопролола на перинатальные исходы и роль изучаемых полиморфизмов.

Нами не было выявлено корреляции дозы Бисопролола 2,5-5,0 мг/сут и 10 мг/сут с индексом Пондерала – маркером гестационного срока новорожденных ($\tau = -0,09$; $p = 0,303$ и $\tau = -0,06$; $p = 0,48$). Следует отметить, что в исследовании отсутствовали новорожденные с индексом Пондерала меньше 2,0 (свидетельствующим о малом гестационном сроке). В то же время, у 12 женщин со срочным родоразрешением индекс Пондерала новорожденных был пограничным – 2,5. Мы провели сравнение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* между подгруппами пациенток с ХАГ со срочным родоразрешением, имевших новорожденных с индексом Пондерала меньше и больше 2,5 (табл. 7).

Анализ встречаемости частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* в подгруппах беременных с ХАГ и различным индексом Пондерала выявил преобладание носительства гомозиготного генотипа *16ArgArg* и аллели *16Arg* в подгруппе беременных, родивших детей с индексом Пондерала $\leq 2,5$, по сравнению с подгруппой женщин, родивших детей с индексом Пондерала $> 2,5$ (25,0% и 10,34%; 58,3 и 31,03%; $p = 0,048$ и $p = 0,040$ соответственно). ОШ для аллели *16Arg* полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* составило ОШ=3,1 [1,13; 8,53], т.е. носительство аллели *16Arg* повышает вероятность рождения детей с измененным гестационным сроком с чувствительностью 58,3% и специфичностью 69,0%; прогностическая ценность положительного результата составила 43,8%, отрицательного результата – 80,0%.

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* в подгруппах беременных со срочными родами, ХАГ и различным индексом Пондерала

Наименование аллеля и генотипа	Распределение аллелей и генотипов у беременных с ХАГ и различным индексом Пондерала (%), чел.		Уровень значимости (p)
	Индекс Пондерала ≤2,5 N=12	Индекс Пондерала >2,5 N=29	
Arg16	14 (58,3)	18 (31,03)	0,040
Gly16	10 (41,7)	40 (68,97)	
16ArgArg	3 (25,0)	3 (10,34)	0,048
16ArgGly	8 (65,67)	12 (41,38)	
16GlyGly	1 (8,33)	14 (48,28)	
16(ArgArg + ArgGly)	11 (91,67)	15(51,72)	0,030
16GlyGly	1 (8,33)	14 (48,28)	

Обсуждение результатов

На сегодняшний день фармакогенетическое тестирование рассматривается как инструмент персонализированной медицины [4]. Существует согласованное мнение, что применение фармакогенетики в акушерстве как инструмента индивидуализации фармакотерапии может обеспечить достижение максимальной пользы и минимального риска для беременной и её ребёнка [11, 12].

В рамках пилотного исследования впервые изучено значение фармакогенетического тестирования по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* и полиморфному маркеру *C3435T* гена *ABCB1* у русских беременных женщин Московского региона с ХАГ I и II степени, получавших антигипертензивное лечение β-АБ Бисопрололом во II и III триместрах гестации.

По нашим данным, частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера

C3435T гена *ABCB1* и полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* не ассоциированы с I и II степенью ХАГ у русских беременных женщин. Обращало на себя внимание, что у беременных с ХАГ II степени преобладало носительство аллелей *Gly16* и *3435T* по сравнению с беременными ХАГ I степени и пациентками контрольной группы. В литературе есть указания на значимое увеличение риска II стадии артериальной гипертензии в популяции северных китайцев с АГ при носительстве аллели *Gly16* по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* [10]. Обсуждается участие протеинов множественной лекарственной устойчивости, в первую очередь – *ABCB1 (MDR1)* и их полиморфизмов, в развитии и становлении артериальной гипертензии. Ряд авторов показали наличие ассоциации высокого АД и аллели *3435T* гена *ABCB1* [14]. Однако результаты иссле-

дований достаточно противоречивые, что может быть объяснено этнической принадлежностью, различной степенью тяжести АГ и другими факторами в изученных популяциях.

Результаты пилотного исследования показали наличие ассоциаций изученного сочетания генотипов *16GlyGly+3435TT* с II степенью ХАГ и наличием в анамнезе акушерских осложнений у русских беременных женщин. Можно предположить, что изменение баланса адренергического тонуса вследствие влияния генетических полиморфизмов β_2 -АР и, соответственно, вазоконстрикторного ответа может являться определенным звеном в патогенезе таких состояний как гипертензия или состояний, ассоциированных со снижением маточно-плацентарного кровотока у беременных. С другой стороны, в исследовании [13] было продемонстрировано снижение количества и экспрессии гликопротеина Р у матерей с генотипом *3435TT* гена *ABCB1* через пути апоптоза.

В настоящее время достаточное внимание уделяется изучению полиморфизмов β_2 -АР (наряду с полиморфизмами β_1 -АР) как причине различного ответа на терапию β -АБ у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, в т.ч. и артериальной гипертензией [16]. Однако в литературе имеется небольшое количество работ, посвященных участию полиморфизмов *ABCB1* в лечении АГ β -АБ [9].

Нами не выявлено различий в частотах аллелей и генотипов полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* и полиморфного маркера *Arg16Gly* гена *ADRB2* между группами беременных с

различным режимом дозирования Бисопролола. Вместе с тем, выявлена значимая ассоциация носительства генотипов *16ArgArg+3435CC* и дозы β -АБ Бисопрололом у беременных с ХАГ ($p < 0,001$).

Эти результаты подтверждают предположение, что, возможно, необходима комплексная оценка эффективности β -АБ, заключающаяся в изучении генов-транспортеров субстратов ЛС и их полиморфизмов и полиморфизмов генов, кодирующих белки-мишени. На сегодняшний день необходимы дальнейшие исследования для подтверждения данного положения с достаточной статистической значимостью.

До настоящего времени в научном сообществе продолжается дискуссия, влияет ли применение β -АБ или наличие ХАГ у беременных на гестационный возраст новорожденного. Ряд авторов отмечает, что фармакотерапия беременных с ХАГ β -АБ может повышать риск рождения детей с малым гестационным сроком [6].

Нами установлено, что доза Бисопрололом 2,5-10,0 мг не ассоциирована с индексом Пондерала – маркером гестационного срока новорожденных. В нашем исследовании впервые установлено влияние генетических факторов на гестационный срок новорожденных. Носительство аллели *16Arg* по полиморфному маркеру *Arg16Gly* гена *ADRB2* повышает вероятность рождения детей с измененным гестационным сроком с чувствительностью 58,3% и специфичностью 69,0%; прогностическая ценность положительного результата составила 43,8%, отрицательного результата – 80,0%.

Список литературы

1. Диагностика и лечение сердечно-сосудистых заболеваний при беременности (Российские рекомендации) // Российский кардиологический журнал. 2013. № 4. Прил. 102 с.
2. Доклад Рабочей группы Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) по высокому артериальному давлению при беременности // Артериальная гипертензия. 2008. Т. 14. № 1. С. 7-21.
3. Кукес В.Г., Сокова Е.А., Игнатъев И.В., Казаков Р.Е. Неассоциированность полиморфного маркера С3435Т гена MDR1 с хронической артериальной гипертензией у русских беременных женщин // Биомедицина. 2011. № 4. С. 98-100.
4. Персонализированная медицина: Клинико-фармакологические аспекты / под ред. В.Г. Кукеса - М.: Издательство АНО Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов. 2014. 260 с.
5. Сокова Е.А., Кукес В.Г. Значение изучения полиморфизма гена *ABCB1*, кодирующего гликопротеин Р, для оценки отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения бета-адреноблокаторов у русских беременных с хронической артериальной гипертензией // Биомедицина. 2014. № 2. С. 119-127.
6. Abalos E., Duley L., Steyn D.W., Henderson-Smart D.J. Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy / Cochrane Database of Systematic Reviews. 2007. Issue 1. Art. No.: CD002252.
7. Brodde O.E. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses // Pharmacol. Ther. 2008. 117. P. 1-29.
8. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension // J. of Hypertension. 2013. 31(7). P. 1281-1357.
9. Eap C.B., Bochud M., Elston R.C., Bovet P., Maillard M.P., Nussberger J., Schild L., Shamlaye C., Burnier M. CYP3A5 and ABCB1 genes influence blood pressure and response to treatment, and their effect is modified by salt // Hypertension. 2007. 49. P. 1007-1014.
10. Ge D., Huang J., He J., Li B., Duan X., Chen R., Gu D. Beta2-Adrenergic receptor gene variations associated with stage-2 hypertension in northern Han Chinese // Ann Hum Genet. 2005. Jan;69 (Pt 1). P. 36-44.
11. Haas D.M., Hebert M.F., Soldin O.P., Flockhart D.A., et al. Pharmacotherapy and pregnancy: highlights from the Second International Conference for Individualized Pharmacotherapy in Pregnancy // Clin. Transl. Sci. 2009. 2. P. 439-43.
12. Haas D.M., Renbarger J.L., Denne S., Ahmed M.S., et al. Pharmacotherapy and pregnancy: highlights from the First International Conference for Individualized Pharmacotherapy in Pregnancy // Clin. Transl. Sci. 2009. 2. P. 11-4.
13. Hitzl M., Schaeffeler E., Hocher B., et al. Variable expression of Pglycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1) // Pharmacogenetics. 2004. 14(5). P. 309-18.
14. Lacchini R., Figueiredo V.N., Demacq C., et al. MDR-1 C^{3435T} polymorphism may affect blood pressure in resistant hypertensive patients independently of its effects on aldosterone release // Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2013. 14 (1).
15. Marcos J.A. Delou, Anibal G. Lopes, Ma'rcia A.M. Capella. Unveiling the Role of Multidrug Resistance Proteins in Hypertension // Hypertension. 2009. 54. P. 210-216.
16. Nonen S., Azuma J., Fujio Y. Pharmacogenomics of Adrenergic Receptors; from Hypertension to Heart Failure // The Open Hypertension Journal. 2010. 3. P. 14-20.

Pharmacogenotyping test of *ABCB1* gene C3435T and *ADRB2* gene Arg16Gly polymorphisms in pregnant women with chronic hypertension

Е.А. Sokova, V.G. Kukes

Objectives were to study the pharmacogenotyping test significance of *ABCB1* gene C3435T and *ADRB2* gene Arg16Gly polymorphisms in Russian pregnant women with chronic hypertension. The comparative analysis of allele/genotype frequencies of *ABCB1* gene C3435T and *ADRB2* gene Arg16Gly polymorphisms was undertaken in Russian pregnant women with mild to moderate chronic hypertension (N1=65) and healthy subjects on the similar periods of gestation (N2=86). The data suggest that carrying 16GlyGly+3435TT genotypes is associated with moderate chronic hypertension and unfavorable obstetrical anamnesis. The maternal 16ArgArg+3435CC genotypes showed association with the dose of Bisoprolol. The maternal allele/genotype frequencies of studied polymorphisms showed difference in groups of newborns with normal and border-line Ponderal index during Bisoprolol treatment.

Key words: P-glycoprotein, *ABCB1* gene C3435T polymorphism, β_2 -adrenoceptor, *ADRB2* gene Arg16Gly polymorphism, pregnancy, chronic hypertension, beta-adrenoblocker.

Научно-практическая конференция «Сравнительный тест кинетики растворения, фармакокинетика и биоэквивалентность: актуальные новости и взгляды»

27 ноября 2014 г. в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» прошла Научно-практическая конференция с международным участием «Сравнительный тест кинетики растворения, фармакокинетика и биоэквивалентность: актуальные новости и взгляды». Конференцию посетило более 80 слушателей из ВУЗов и научных учреждений, фармацевтических предприятий и контрактно-исследовательских организаций Москвы, Московской области, регионов России и Республики Беларусь.

Открылась конференция докладом председателя организационного комитета Конференции, к.фарм.н. Шохина И.Е., зав. лабораторией фармакокинетики и лекарственных форм ФГБУН НЦБМТ ФМБА России «Сравнительный тест кинетики растворения:

актуальные аспекты выполнения испытания». В докладе были отмечены важные вопросы выполнения данного теста с учетом новых российских регуляторных требований. Продолжила Конференцию к.фарм.н. Малашенко Е.А., ст. преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, с докладом, посвященным регуляторным нормам, предъявляемым к валидации биоаналитических методик. В своем докладе Малашенко Е.А. отметила некоторые особенности валидации биоаналитических методик с учетом изданного в 2013 г. «Руководства по экспертизе лекарственных средств».

После перерыва слово было предоставлено заместителю начальника отдела координации гармонизации систем технического регулирования в отраслях





Департамента технического регулирования и аккредитации Евразийской экономической комиссии, к.м.н. Д.А. Рождественскому (Республика Беларусь). Докладчик рассказал о работе Департамента технического регулирования ЕврАзЭС по гармонизации руководств к проведению исследований биоэквивалентности в странах Таможенного Союза. Далее Конференция была продолжена двумя докладами, посвященными некоторым аспектам исследований инновационных пептидных препаратов: к.фарм.н. Медведева Ю.В. и к.фарм.н. Смирнова В.В. (оба – Первый МГМУ им. И.М. Сеченова). После чего сотруд-

ник компании «Agilent Technologies» Богданова А.А. представила результаты кинетических исследований на нескольких длинах волн с применением нового диодно-матричного УФ-спектрофотометра «Agilent Cary 8454».

Завершена конференция была двумя докладами: д.м.н., проф. В.В. Попова, зав. лабораторией профессиональной клинической фармакодинамики НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД» («Аудиты клинических исследований инспекторами FDA»), и Шохина И.Е. («Оформление отчетов по сравнительному тесту кинетики растворения, биоаналитическому и статистическому этапу исследований биоэквивалентности»).

Слушатели отметили высокий научный и организационный уровень Конференции и выразили пожелание проведения аналогичных мероприятий в дальнейшем.

Материалы Конференции планируется опубликовать в журнале «Биомедицина» в 2015 г.



Лабораторкорм

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

Реализуем:

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



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

Доставка в любой регион России

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

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

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

www.laboratorkorm.ru, e-mail: info@laboratorkorm.ru

на правах рекламы



БИОМЕДИЦИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»
Филиал «Андреевка»

Филиал «Андреевка» образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году.

Постановлением Совета Министров СССР основной задачей Филиала является получение и выращивание лабораторных животных. Популяции животных для разведения в Филиале постоянно обновляются за счет племенных ядер, передаваемых из лаборатории генетики Центра. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируе-

мыми по генетическим, физиологическим, морфологическим показателям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С Филиалом сотрудничает более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАМН, РАН, Минздравсоцразвития, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

Филиал «Андреевка» предлагает следующих животных:

I. Морские свинки: альбиносы и пестрые.

II. Генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крыс; мыши SHK-самки подвержены раку молочных желез (частота заболевания выше 50%).

III. Линейные мыши и крысы:

– мыши линии **DBA** – имеют светло-коричневую окраску шерсти, используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях, для изучения нарушений вестибулярного и слухового аппаратов;

– мыши линии **BALB/C** – белой окраски, альбиносы, используются во всех медико-биологических исследованиях. Высокая частота опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком;

– мыши линии **C57BL/6** – черной окраски. Используются в изучении скелетных аномалий, дефектов развития головы и

глаз. Стандартная линия для поддержания мутаций. Чувствительны к действию канцерогенов, стафилококков, сальмонелл;

– мыши линии **CBA** – серой окраски, используются в радиологии, медико-биологических геронтологических исследованиях, для изучения спонтанных опухолей печени;

– крысы **W1STAR** – белой окраски, альбиносы. Используются для онкологических исследований, для изучения поведенческих реакций.

IV. Межлинейные гибриды мышей:

– **F1 CBA x C57BL/6** – шерсть серого окраса;

– **F1 C57BL/6 x DBA** – шерсть черного окраса. Гибриды F1 используются для онкологических и радиационных исследований.



141551. М.О., Солнечногорский район, п/о Андреевка, д. 49
Тел. 8(495)536-09-18; 8(495)536-37-58 Факс: 8(495)536-28-33

E-mail: andreevka-kv@rambler.ru

