

2

2016

MEDICINE
ISSN 2074-5982

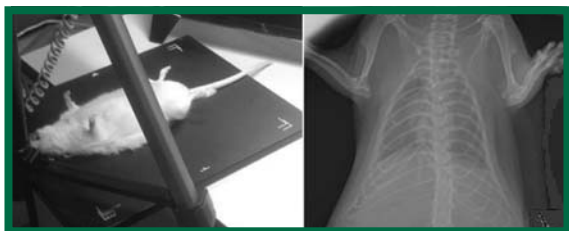
2016

2

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

ФОТООТЧЁТ
XII Научно-практическая конференция
«Биомедицина и биомоделирование»
18-19 мая 2016 г.
Московская область – Светлые горы



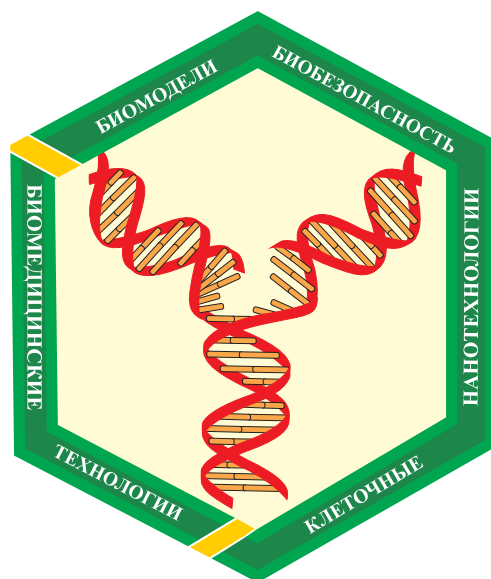
Научный журнал.

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

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 09.06.2005 г.

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 наук и кандидата наук (редакция – март 2016 года)



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор академик **Н.Н. Каркищенко**
Зам. гл. редактора **В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов**
Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

Г.Д. Капанадзе, Светлые горы МО, **С.Л. Люблинский**, Обнинск, Калужская область,
Е.Л. Матвеевко, Светлые горы МО, **А.Н. Мурашѐв**, Пущино МО,
С.Ю. Пчелинцев, Любучаны МО, **Г.В. Раменская**, Москва, **А.О. Ревякин**, Светлые горы МО,
В.П. Рябых, Боровск МО, **Х.Х. Семѐнов**, Светлые горы МО, **Д.А. Сычѐв**, Москва,
Ю.В. Фокин, Светлые горы МО, **Д.Б. Чайванов**, Москва, **Е.В. Ших**, Москва

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

К.В. Анохин, Москва, **Е.Е. Ачкасов**, Москва, **В.М. Баранов**, Москва, **А.Т. Быков**, Сочи,
Е.Ю. Бонитенко, Санкт-Петербург, **В. Влахов**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск,
А.М. Дыгай, Томск, **А.Л. Зефирѐв**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан,
В.Г. Кукес, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **Ю.С. Макляков**, Ростов-на-Дону,
А.И. Мирошников, Пущино МО, **В.Б. Назаров**, Москва, **С.В. Оковитый**, Санкт-Петербург,
В.Р. Рембовский, Санкт-Петербург, **В.П. Фисенко**, Москва, **Д.Ф. Хритинин**, Москва,
Б.Д. Цыганков, Москва, **В.И. Цысь**, Смоленск

Адрес редакции:

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

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

Отпечатано в типографии «Айсинг»
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18.
Подписано в печать 23.06.2016
Тираж 3 000 экз.

©2016, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Содержание

НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Н.Н. Каркищенко, Ю.А. Чудина, А.Е. Емельянова, А.А. Емельянов, Д.Б. Чайванов**
Технология моделирования на лабораторных животных физических методов восстановления организма человека в экстремальных условиях на базе векторной модели функциональных состояний нервной системы4
- М.А. Сырцова, С.В. Оковитый, В.Б. Бессонов, М.В. Котова**
Рентгенологическая оценка доставки порошкообразных веществ в бронхо-легочный аппарат лабораторной крысы методом «сухой» инсуффляции15

МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- И.И. Абрамец, Д.В. Евдокимов, Т.О. Зайка**
Изменения релейных и пластических свойств глутаматергических синапсов в прелимбической коре крыс при поведенческой депрессии22
- А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина**
Морфологические аспекты регенеративного потенциала ишемически поврежденного миокарда после применения аллогенного биоматериала32
- А.И. Лебедева**
Биоматериал Аллоплант при регенерации миометрия рога матки экспериментальных животных – стимулятор макрофагов мезенхимного происхождения45
- Н.С. Тропская, И.Г. Шашкова, Т.В. Черненко, Т.С. Попова**
Влияние колистина на электрическую активность тощей кишки и видовой состав микрофлоры кишечника54

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

- М.С. Сайфутдинов**
Удлинение голени экспериментальных животных методом distractionного остеосинтеза как модель развития тонического защитного рефлекса62

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Э.И. Сайранова, И.И. Садртдинова, З.Р. Хисматуллина**
Оценка морфологических изменений в миокарде крыс линии WAG/Rij под действием дофамина70
- И.А. Титович, В.Ц. Болотова**
Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола77

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.N. Karkischenko, Yu.A. Chudina, A.E. Emelyanova, A.A. Emelyanov, D.B. Chayvanov

Technology of modeling physical methods of human body recovery in extremal condition on laboratory animals based on the vector model of functional states of nervous system4

M.A. Syrtsova, S.V. Okovitiy, V.B. Bessonov, M.V. Kotova

Radiographic assessment delivery of powdery substances in broncho-pulmonary device of laboratory rat by “dry” insufflations.....15

BIOMEDICAL METHODS

I.I. Abramets, D.V. Evdokimov, T.O. Zayka

The alterations of relay and plasticity properties of glutamatergic synapses within prelimbic cortex of rats at conditions the behavioral depression22

A.I. Lebedeva, S.A. Muslimov, L.A. Musina

Morphological aspects of regenerative potential of myocardial ischemic injury after allogenic biomaterial applications.....32

A.I. Lebedeva

Alloplant biomaterial when used in myometrium regeneration of the experimental animal uterine horn is a macrophage stimulator of the mesenchymal origin44

N.S. Tropkaya, I.G. Shashkova, T.V. Chernen'kaya, T.S. Popova

The effect of colistin on the electrical activity of the jejunum and the species composition of the intestinal microbiota54

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

M.S. Saifutdinov

Lengthening of the shin of experimental animals by the method of distraction osteosynthesis as a model of the progress of the tonic protective reflex62

NON-CLINICAL RESEARCHES

E.I. Sayranova, I.I. Sadrtdinova, Z.R. Khismatullina

The assessment of the morphological changes in a myocardium of WAG/Rij rats under the influence of dopamine.....70

I.A. Titovich, V.Ts. Bolotova

Experimental study of antihypoxic activity of a new derivative aminoethanol.....77



Технология моделирования на лабораторных животных физических методов восстановления организма человека в экстремальных условиях на базе векторной модели функциональных состояний нервной системы

Н.Н. Каркищенко¹, Ю.А. Чудина², А.Е. Емельянова^{1,2}, А.А. Емельянов^{1,2}, Д.Б. Чайванов²

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

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: акад., д.м.н. Каркищенко Николай Николаевич, scbmt@yandex.ru;
к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, chaivanov@yandex.ru

В настоящей статье описаны результаты сравнительного анализа динамики физиологических процессов, сопровождающей различные функциональные состояния у человека и лабораторных животных. Изменения показателей дыхательной и сердечной деятельности в состоянии покоя и электросна после физической нагрузки у человека и животных имели сходные тенденции и характеризовались подобием паттернов при смене одного состояния другим. Наличие сходства позволяет рассматривать лабораторных животных как адекватную модель для апробации методик инициации и изменения функционального состояния с помощью физических методов воздействия на нервную систему, в том числе, низкочастотной ритмической электростимуляции.

Ключевые слова: показатели дыхательной и сердечной деятельности, физические методы воздействия на нервную систему, низкочастотная ритмическая электростимуляция, двухмерная векторная модель функциональных состояний, лабораторные животные (кролики).

Введение

Животные широко используются для исследования физиологических эффектов влияния химических и физических факторов на организм. В этом смысле они должны быть адекватной моделью соответствующих физиологических процессов человека, являющихся мар-

керами его функционального состояния. Выявление потенциальной возможности моделирования на животных функциональных состояний основано на определении особенностей животных по сравнению с человеком.

Традиционно животных использовали в качестве модели поведения и

нейрофизиологических механизмов его реализации. В случае моделирования функционального состояния может быть использовано сходство механизмов, обеспечивающих поддержание постоянства внутренней среды у теплокровных животных (млекопитающих) и человека. Экспериментально показано, что физиологические системы, обеспечивающие адаптивные и оборонительные формы поведения животных и человека, являются схожими [3, 5-7]. Функциональное состояние – это динамическое изменение статуса организма путем взаимодействия его систем, предполагающее, в частности, привлечение внутренней (функциональной) и поведенческой регуляции. В этом смысле для понимания природы конкретных состояний необходимо определить, как взаимодействуют системы гомеостаза и системы регуляции поведения. Однако динамика функциональных состояний животных, в отличие от человека, более зависит от их физиологического статуса, чем от уровня психического напряжения. Другими словами, гомеостаз человека может быть изменен с помощью поведения, а гомеостаз животных определяет их поведение. Поведение животных неразрывно связано с адаптацией к изменению условий среды, при этом совершенствование движений и, одновременно, уровня отражения приводит к улучшению приспособляемости [4]. Даже высшие животные (обезьяны) не способны изменять условия своего существования, а вынуждены меняться сами, адаптируясь к произошедшим изменениям. Это следует учитывать при

поиске у животных аналогов функциональных состояний, типичных для человека.

Двухмерная векторная модель функциональных состояний

Довольно удобным способом сопоставления животных и человека является сравнение векторных моделей их функциональных состояний, что предполагает употребление единой системы понятий. В работе [9] была рассмотрена двухмерная векторная модель, являющаяся наиболее подходящей для животных модификацией трехмерной векторной модели функциональных состояний человека. Отсутствие у животных второй сигнальной системы, представленной в виде третьего компонента трехмерной векторной модели, является основанием ее редукции до двухмерного решения. Следовательно, модель функциональных состояний животных представлена двумя измерениями: уровнем возбуждения (УВ) нервной системы и фокусом первой сигнальной системы (Ф1). Функциональные состояния человека и животных характеризуются схожими связями между ориентацией Ф1 и УВ: УВ увеличивается в результате ориентации Ф1 на внешние процессы и уменьшается при ориентации Ф1 вовнутрь. В контексте двухмерной модификации векторной модели функциональных состояний совокупность УВ нервной системы и ориентации Ф1 следует рассматривать как представление механизмов поддержания гомеостатического равновесия и регуляторных поведенческих процессов.

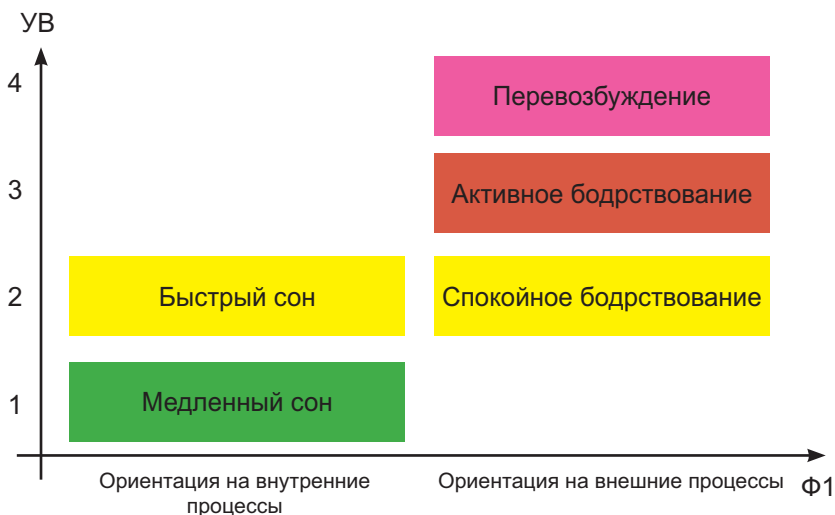


Рис. Плоскостная схема двухмерной векторной модели функциональных состояний животных.

По сравнению с трехмерной векторной моделью [8] двухмерная модель функционального состояния животных представлена в виде плоскостной проекции, оси которой представляют УВ и $\Phi 1$ (рис.). Динамика УВ носит непрерывный характер и может быть изображена в виде континуума, который для удобства разбили на 4 уровня. $\Phi 1$ имеет две основные градации: ориентацию на внешние и внутренние процессы, между которыми также невозможно установить четкую границу. В целом, полученная двухмерная модель позволяет рассматривать 5 устойчивых функциональных состояний животных: медленный и быстрый сон, спокойное и активное бодрствование, перевозбуждение. Первый уровень возбуждения представлен только состоянием медленного сна, второй уровень – состояниями быстрого сна и спокойного бодрствования, а третий и четвертый уровни, соответственно, отражают состояния активного бодрствования и перевозбуждения.

Известно, что у млекопитающих цикл сна представлен двумя стадиями (медленного и быстрого сна). Временные характеристики цикла «бодрствование-сон» у человека являются наиболее схожими с такими же параметрами у кролика, свиньи и обезьяны [5]. Исследователи сна животных характеризуют стадию медленного сна физической неподвижностью, замедлением ритма дыхания и сердечных сокращений, снижением температуры тела и мозга. Существенным признаком медленного сна являются высокоамплитудные синхронизированные медленные волны большинства мозговых структур на электроэнцефалограмме (ЭЭГ). На стадии быстрого сна у животных сохраняется сонное поведение на фоне подавления моторных актов и падения тонуса скелетных мышц, которые сопровождаются сердечной и дыхательной аритмией, сокращениями мелких мышечных групп и быстрыми движениями глаз [3, 5]. Стадия быстрого сна

характеризуется снижением температуры тела, зависящей от температуры окружающей среды, и повышением температуры мозга.

Исследователи изменений сна при патологиях нервной системы отмечают, что наиболее высокой чувствительностью к таким нарушениям, как стресс, болезнь Паркинсона, шизофрения, эпилепсия и т.п., обладает стадия быстрого сна, которая при появлении этих нарушений редуцируется или может полностью исчезнуть [5].

У животных стадии сна определяются только УВ, который изменяется в определенных рамках; что касается Ф1, то он не перемещается, а во время сна остается стабильно ориентированным на внутренние процессы.

Состояния спокойного и активного бодрствования у животных могут быть специфицированы по выполняемым задачам. Эти состояния периодически сменяют друг друга в течение дня. В спокойном состоянии животное, как правило, находится в одной и той же позе, которую оно не меняет, при этом состояние покоя характеризуется более или менее стабильным состоянием внутренней среды организма и его систем. Активное бодрствование характеризуется поисковым и оборонительным поведением, возникающим как способ удовлетворения потребности или устранения какого-либо неудобства [4]. Возникновение разных форм поведения зависит как от внешних изменений окружающей среды, так и внутренних, определяемых обменными процессами. Следовательно, внешние и внутренние факторы нарушения гомеостаза являются причинами возникновения определенного вида поведения.

Следует уточнить, что у животных поддержание постоянства внутренней среды регулируется автоматически и является универсальной реакцией на изменения внешних и внутренних факторов. Внешние изменения среды приводят к необходимости коррекции внутреннего баланса в силу того, что животное не может повлиять на окружающие факторы. Следовательно, поддержание постоянства внутренней среды обнаруживает связь только с УВ, который падает или возрастает в зависимости от интенсивности обмена, определяемого автоматически конкретными структурами мозга, – например, гипоталамусом. Фокус первой сигнальной системы при этом полностью определяется УВ нервной системы: уровень падает – фокус ориентируется внутрь, уровень возрастает – фокус переносится наружу.

Перевозбуждение можно рассматривать как состояние дистресса, развивающееся под влиянием неблагоприятных факторов, при большой физической или эмоциональной нагрузке, которое у животных имеет сходные с человеком механизмы реализации [6, 7]. Однако дистресс у животного возникает в результате практически необратимых изменений гомеостаза, которые уже невозможно компенсировать, и которые при продолжающемся влиянии стрессорных факторов приводят к смерти животного. Как правило, в этих случаях УВ нервной системы достигает чрезмерных значений, которые снижаются с помощью тормозных механизмов, обеспечивающих возможность адаптации.

Рассмотренные особенности функционального состояния животных указывают на то, что разнообразие их состояний определяется УВ, при этом

ориентация $\Phi 1$ меняется зависимо от УВ и формально не является независимым фактором. Это позволяет использовать двухмерную модель функциональных состояний животного для апробации определенных состояний, определяющихся, в основном, УВ.

Динамика функционального состояния у человека и животных: сравнительный анализ

Анализ двухмерной модели функциональных состояний показал возможность моделирования на животных методов диагностики УВ, инициации и изменения тех функциональных состояний, которые связаны с его модуляцией [9]. Итак, двухмерная модель функциональных состояний животных позволяет моделировать на них следующие устойчивые функциональные состояния: спокойное и активное бодрствование, стресс, медленный и быстрый сон. По аналогии с человеком, для животных также возможна инициация переходных процессов, среди которых определяются засыпание и пробуждение, как переходы из состояния бодрствования ко сну и обратно, а также прямой и обратный переход из состояния медленного сна в состояние быстрого сна. Переходные процессы между состояниями бодрствования имеют место, но носят скорее количественный, чем качественный характер.

Для наглядного подтверждения сходства динамики функционального состояния у человека и лабораторных животных был проведен сравнительный анализ экспериментально полученных показателей дыхательной и сердечной деятельности в различных функциональных состояниях. Сравнительный анализ был основан на обнаружении

значимых корреляционных связей между одинаковыми физиологическими показателями сердечной (ЧСС – частота сердечных сокращений, RR – длительность сердечного цикла, ДПВ – длина пульсовой волны) и дыхательной (ЧД – частота дыхания) деятельности спортсменов и кроликов, зафиксированными в экспериментах, процедуры которых были идентичны. Экспериментальные данные исследования спортсменов подробно описаны в работе [2], экспериментальные данные исследования кроликов представлены в работе [1]. Необходимо отметить, что особенностью этих экспериментов являлось сравнение динамики функционального состояния, модулируемого с помощью электросна, у испытуемых и животных в обычных условиях и под воздействием стимулирующего химического вещества (кофеин). Далее будет представлено сравнение данных по кроликам с данными по спортсменам, отдельно для экспериментальной (под воздействием химического стимулятора) и контрольной (плацебо) группы. Сравнение динамики соответствующих физиологических показателей сердечной и дыхательной деятельности людей и животных проводили с учетом различных этапов модуляции функционального состояния. Результаты корреляционного анализа представлены в таблице.

По данным табл. следует, что все полученные корреляционные связи между подобными показателями сердечной и дыхательной деятельности человека и животных характеризуются направлением связи и уровнем ее значимости. Направленность корреляционной связи может быть прямой и обратной, определяясь положительным или отрицательным значением коэффициента корреля-

Таблица

Показатели сходства физиологических маркеров динамики функционального состояния у спортсменов и кроликов, вычисленные в зависимости от этапов модуляции функционального состояния

Этапы модуляции функционального состояния (ФС)		Физиологические маркеры экспериментальных групп				Физиологические маркеры контрольных групп			
		ЧСС	RR	ДПВ	ЧД	ЧСС	RR	ДПВ	ЧД
Вся последовательность ФС	r	-0,15*	-0,10*	0,17*	-0,17*	-0,01	0,06*	-0,08*	-0,01
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,440	0,000	0,000	0,365
Покой	r	0,09*	-0,06	-0,06	-0,10*	-0,04	0,01	0,09*	0,05
	p	0,033	0,125	0,162	0,018	0,333	0,761	0,024	0,273
Электросон, первые 5 мин	r	-0,21*	-0,20*	0,09*	-0,01	0,079	0,08*	0,071	-0,10*
	p	0,000	0,000	0,020	0,730	0,055	0,043	0,109	0,014
Электросон, вторые 5 мин	r	-0,07	0,00	-0,04	0,06	0,13*	0,14*	0,27*	0,12*
	p	0,093	0,993	0,312	0,168	0,001	0,001	0,000	0,004
Электросон, третьи 5 мин	r	0,04	0,01	0,02	0,09*	0,00	0,06	0,10*	-0,02
	p	0,295	0,749	0,611	0,020	0,905	0,171	0,011	0,579
Электросон, все 15 мин	r	0,06*	0,10*	0,04	-0,15*	0,03	0,07*	0,14*	-0,02
	p	0,018	0,000	0,114	0,000	0,219	0,004	0,000	0,473
Пробуждение	r	-0,27*	0,32*	0,25*	-0,12*	0,08	0,11*	0,02	-0,09*
	p	0,000	0,000	0,000	0,006	0,055	0,007	0,554	0,021

Примечание: p – уровень значимости, r – коэффициент корреляции Пирсона, ЧСС – частота сердечных сокращений, RR – длительность сердечного цикла, ДПВ – длительность пульсовой волны, ЧД – частота дыхания.

Жирным курсивом и «*» выделены значимые коэффициенты корреляции для $p < 0,05$.

ции (r). Прямая связь (положительный коэффициент корреляции) указывает на одинаковые тенденции в изменениях по данному параметру у человека и животных, обратная связь (отрицательный коэффициент корреляции) является признаком противоположных тенденций в динамике данного показателя. Уровень значимости определяется на основе вероятности случайного возникновения проверяемой корреляционной связи: чем меньше такая вероятность (p), тем выше уровень значимости. В данном случае коэффициент корреляции признается значимым, если p оказывается менее 0,05. Далее мы рассмотрим сход-

ство данных сердечной и дыхательной деятельности человека и животных в различных функциональных состояниях с учетом этих двух характеристик.

Изначально была проанализирована вся последовательность функциональных состояний целиком. Оказалось, что в экспериментальных группах имеются значимые корреляции по всем четырем показателям физиологической активности, в то время как в контрольных группах значимыми оказались корреляции только по двум показателям сердечной деятельности (RR и ДПВ). При сравнении коэффициентов корреляции внутри экспериментальных и контрольных групп

оказалось, что по показателям ЧСС и ЧД в обоих случаях имеются обратные связи, в то время как по RR у экспериментальных групп обратные связи сменяются в контрольных группах прямыми связями, что в случае ДПВ имеет противоположную направленность. Наличие сходной направленности и в экспериментальных, и в контрольных группах для ЧСС и ЧД указывает на сходство динамики по этим показателям вне зависимости от действия стимулирующего вещества, наличие которого делает эти связи значимыми. В отношении RR и ДПВ связи являются неслучайными, при этом введение стимулирующего вещества преобразует прямую связь по показателю RR в обратную и обратную связь по ДПВ – в прямую. Следовательно, при введении стимулирующего вещества изменения длительности сердечного цикла приобретают разнонаправленный характер у людей и животных, а изменения длительности пульсовой волны – однонаправленный характер. Это, в частности, указывает на то, что введение стимулирующего вещества (в данном случае – кофеина) не меняет направленность связей у людей и животных для частотных характеристик (ЧСС и ЧД), а меняет направленность связей для временных характеристик (RR и ДПВ).

Детальный анализ смены состояний был проведен с целью поиска сходства динамики физиологических процессов у людей и животных на каждом этапе модуляции функционального состояния с помощью методики электросна. Вся последовательность функциональных состояний разделили на три этапа: покой, электросон и пробуждение. Состояние покоя представляло собой пребывание в спокойном состоянии после

физической нагрузки и длилось 5 мин. Далее оно сменялось состоянием электросна под воздействием низкочастотной электростимуляции и длилось 15 мин, в котором для более подробного анализа выделили 5-минутные этапы. Пробуждение следовало за состоянием электросна и вызывалось отключением низкочастотного ритмического воздействия (продолжительность – 5 мин).

Состояние покоя в экспериментальных группах характеризуется наличием значимых корреляций по параметрам ЧСС и ЧД, а контрольные группы обнаруживают значимую связь по параметру ДПВ. При этом обращает на себя внимание тот факт, что направленность связей у пар групп не совпадает ни по одному параметру, а имеет разную направленность. Так, например, связь по параметру ЧСС для экспериментальных групп является прямой, наряду с обратной связью для контрольных групп. Экспериментальные группы характеризуются обратными связями по остальным параметрам (RR, ДПВ и ЧД), а контрольные группы – прямыми. Следовательно, для состояния покоя в обычных условиях характерно наличие одинаковой направленности изменений длительности сердечного цикла, длительности пульсовой волны и частоты дыхания при противоположной направленности ЧСС у людей и животных. В то время как введение в организм стимулирующего вещества приводит к противоположной картине: по RR, ДПВ и ЧД обнаруживаются обратные связи, а по ЧСС – прямые. Однако для сравнения людей и животных в состоянии покоя в обычных условиях может использоваться временной показатель ДПВ (прямая связь), а в условиях дополнительного влияния стимулирующего вещества – ча-

стотные показатели ЧСС (прямая связь) и ЧД (обратная связь).

В состоянии электросна для экспериментальных и контрольных групп обнаруживается сходная направленность корреляционных связей по всем рассмотренным показателям. При этом по показателям сердечной активности (ЧСС, RR, ДПВ) обнаруживаются прямые связи, а по показателю дыхательной активности (ЧД) для рассмотренных пар групп выявлена обратная связь. Это, в частности, указывает на наличие сходных изменений физиологических процессов во время электросна в обычных условиях и в присутствии стимулирующего вещества. В обычных условиях значимыми оказываются связи по показателям RR и ДПВ, в условиях введения стимулирующего вещества значимые корреляции выявлены по показателям ЧСС, RR и ЧД. В целом, можно говорить о том, что для состояния электросна, вне зависимости от условий его инициации, характерно наличие неслучайной прямой корреляционной связи по динамике длительности сердечного цикла.

Состояние электросна было разделено на три 5-минутных этапа для более детального рассмотрения связей в парах исследуемых групп. Этот детальный анализ показал отсутствие совпадений по значимости выявленных корреляций при наличии сходной направленности связей при сравнении корреляций для экспериментальных и контрольных групп. Так, первый 5-минутный этап электросна (ЭС1) характеризуется одинаковыми связями по параметрам ДПВ (прямая связь) и ЧД (обратная связь), на втором 5-минутном этапе (ЭС2) обнаруживаются сходные связи по параметрам RR (прямая связь) и ЧД (прямая связь),

а на третьем 5-минутном этапе (ЭС3) – по всем параметрам сердечной активности (прямые связи). Относительно значимых корреляций для каждой пары групп они свои. Экспериментальные группы на этапе ЭС1 имеют значимые корреляции по всем параметрам сердечной активности, на этапе ЭС2 значимые корреляции отсутствуют, а на этапе ЭС3 – только по параметру ЧС. Контрольные группы на этапе ЭС1 имеют значимые связи по RR и ЧД, на этапе ЭС2 – по всем параметрам, на этапе ЭС3 – по ДПВ. Следовательно, при разделении электросна на 5-минутные этапы необходимо учитывать направленность и значимость связей по выявленным параметрам. В частности, для моделирования состояния электросна человека на животных целесообразно рассматривать это состояние в виде целостного паттерна, не выделяя в нем 5-минутные этапы.

Значимые связи в экспериментальных группах в состоянии пробуждения обнаруживаются по всем исследуемым показателям, в то время как значимые связи в контрольных группах выявлены для RR и ЧД. Замечательно, что направленность корреляций для пар групп носит сходный характер по трем параметрам RR (прямые связи), ДПВ (прямые связи) и ЧД (обратные связи), а для ЧСС имеет противоположные тенденции: наличие прямой связи для контрольных групп и обратной связи для экспериментальных групп. В целом, состояние пробуждения можно охарактеризовать наличием значимых и одинаково направленных связей – как для экспериментальных групп, так и для контрольных групп – по длительности сердечного цикла (прямая связь) и частоте дыхания (обратная связь).

Немаловажно выявить параметры, по которым обнаруживаются значимые корреляции для всех трех функциональных состояний (покой, электросон и пробуждение), отдельно в контрольных и экспериментальных группах. Оказалось, что в контрольных группах невозможно выделить показатели, по которым присутствовали бы значимые корреляции по всем трем функциональным состояниям. В данном случае можно выделить только пары функциональных состояний, в которых по одним и тем же параметрам обнаруживаются неслучайные связи. Так, состояния покоя и электросна характеризуются наличием прямых связей по длительности пульсовой волны, а состояния электросна и пробуждения обнаруживают наличие прямых связей по длительности сердечного цикла. Значимые корреляции в экспериментальных группах во всех трех функциональных состояниях обнаружены по частотным характеристикам: ЧСС (прямые связи и обратная связь) и ЧД (обратные связи). Важно отметить, что в контрольных группах значимые связи обнаруживаются по временным характеристикам сердечной активности, а в экспериментальных группах – по частотным характеристикам сердечной и дыхательной деятельности. Это указывает на то, что в обычных условиях для людей и животных в качестве общих параметров следует использовать такие временные характеристики, как длительность сердечного цикла и длительность пульсовой волны, а в условиях действия химического стимулирующего вещества – использовать частотные характеристики (ЧСС и ЧД).

Представленный выше анализ корреляционных связей между показателями сердечной и дыхательной активности

людей и животных позволил выделить общие для них физиологические маркеры, являющиеся показателями динамики функционального состояния. Моделирование определенного функционального состояния человека на животных становится не просто возможным, но экспериментально контролируемым на основе динамики выявленных физиологических маркеров. Общими маркерами являются только те параметры сердечной и дыхательной деятельности, по которым для людей и животных обнаружены значимые корреляции. При этом следует учитывать также направленность корреляционных связей, которая определяет наличие прямой или обратной зависимости по данному показателю.

В целом, на основе проведенного исследования, все разнообразие рассмотренных функциональных состояний можно описать в терминах физиологических маркеров, общих для людей и животных. Маркерами всей последовательности функциональных состояний в обычных условиях являются временные показатели сердечной деятельности, среди которых длительность сердечного цикла у людей и животных изменяется одинаково, а длительность пульсовой волны – разнонаправленно. В условиях дополнительного действия стимулирующего вещества (кофеина) маркерами последовательности функциональных состояний являются временные и частотные показатели сердечной и дыхательной деятельности. Частотные показатели (ЧСС и ЧД) и длительность сердечного цикла изменяются разнонаправленно у людей и животных, а длительность пульсовой волны – одинаково.

Маркеры различных инициированных функциональных состояний также

были выделены для обычных условий (обычное состояние) и в условиях действия стимулирующего вещества (стимулированное состояние). Маркером обычного состояния покоя является длина пульсовой волны, изменяющаяся одинаково, маркерами состояния электросна выступают временные параметры сердечной деятельности (RR и ДПВ), одинаково изменяющиеся, и, наконец, состояние пробуждения определяется двумя маркерами: длительностью сердечного цикла (одинаковые изменения) и частотой дыхания, изменяющейся противоположно у людей и животных. В качестве маркеров стимулированного состояния покоя выступают частотные характеристики активности: ЧСС (одинаковые изменения) и ЧД (противоположно направленные изменения). Маркерами стимулированного состояния электросна являются частотные характеристики активности и длительность сердечного цикла, среди которых ЧСС и RR изменяются одинаково, а ЧД – противоположно. Стимулированное состояние пробуждения определяется как частотными, так и временными характеристиками сердечной и дыхательной деятельности, при этом частотные характеристики у людей и животных изменяются противоположно, а временные – одинаково.

Выводы

Подводя итоги настоящего исследования, можно сделать следующие выводы.

Во-первых, сравнение функциональных состояний людей и животных позволило выявить сходство динамики частотных и временных показателей их сердечной и дыхательной активности. Такой результат указывает на возможность моделирования на животных

функциональных состояний человека, адекватность которых можно контролировать на основе соответствующих показателей сердечной и дыхательной активности, названных физиологическими маркерами.

Во-вторых, сходство функциональных состояний людей и животных выявлялось на основе корреляционных связей по четырем показателям, наличие которых определяли на основе коэффициентов с уровнем значимости не менее 0,05. Каждый коэффициент также характеризовался знаком, указывающим направленность связи: положительный коэффициент выявляет одинаковые изменения показателя у людей и животных, отрицательный коэффициент – разнонаправленные изменения. Направленность связи следует учитывать при инициации конкретного функционального состояния.

В-третьих, набор показателей физиологической активности, по которым обнаружено сходство для человека и животных, оказался различным для последовательности функциональных состояний, инициированных в обычных условиях и под действием стимулирующего химического вещества (кофеин). Этот набор в условиях стимулирования включает большее количество показателей, чем в обычных условиях.

В-четвертых, сходство всей последовательности функциональных состояний в обычных условиях обнаруживается по временным характеристикам сердечной активности (длительность сердечного цикла и длительность пульсовой волны), сходство в стимулированных условиях – имеется как по временным, так и по частотным характеристикам (частота сердечных сокращений и частота дыхания).

В-пятых, в обычных условиях сходство инициированных функциональных состояний (покой, электросон, пробуждение) обнаруживается в покое по длительности пульсовой волны, в состоянии электросна – по длительности сердечного цикла и пульсовой волны, в состоянии пробуждения – по длительности сердечного цикла и частоте дыхания. В стимулированных условиях выявляется сходство по частотным характеристикам в покое, по частотным характеристикам и длительности сердечного цикла – в состоянии электросна и по частотным и временным характеристикам – в состоянии пробуждения.

Список литературы

1. Емельянова А.Е., Емельянов А.А., Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д. Моделирование на животных физиотерапевтических способов купирования гиперактивации нервной системы после физической и психической нагрузки, в том числе на фоне действия стимулирующих веществ // Биомедицина. 2015. № 1. С. 4-10.
2. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Шустов Е.Б., Емельянов А.А., Емельянова А.Е. Транскраниальная низкочастотная ритмическая электростимуляция структур головного мозга спортсменов для купирования гиперактивации нервной системы, модулируемой приемом больших доз кофеина в тренировочный и постсоревновательный периоды // Спортивная медицина: наука и практика. 2015. № 3. С. 12-18.
3. Ковальзон В.М. Основы сомнологии: физиология и нейрохимия цикла «бодрствование-сон». – М.: Изд-во «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2012. 239 с.
4. Леонтьев А.Н. Проблемы развития психики. – М.: Изд-во Академии педагогических наук РСФСР. 1959. 494 с.
5. Оганесян Г.А., Аристамесян Е.А., Романова И.В., Ватаев С.И. Эволюция организации цикла «бодрствование-сон» у позвоночных. // Сомнология и медицина сна. Избранные лекции. – Под ред. Я.И. Левина, М.Г. Полуэктова. – М.: Медфорум, 2013. С. 13-66.
6. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. – М.: Изд-во МЕДГИЗ. 1960. 253 с.
7. Селье Г. Стресс без дистресса. – М.: Прогресс. 1982. 336 с.
8. Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н. Трехмерная векторная модель функционального состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной стимуляции // Биомедицина. 2013. № 3. С. 18-25.
9. Чайванов Д.Б., Станкова Н.В. Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели // Биомедицина. 2013. № 4. С.164-168.

Technology of modeling physical methods of human body recovery in extremal condition on laboratory animals based on the vector model of functional states of nervous system

N.N. Karkischenko, Yu.A. Chudina, A.E. Emelyanova, A.A. Emelyanov, D.B. Chayvanov

The results of comparative analysis of physiological processes dynamics, which associated with animal and human different functional states, discussed in this article. Indices alteration of respiratory and cardiac activity in rest and electrosleep after physical activity in human and laboratory animals had similar tendencies and had been characterized with pattern likeness during changings one state on another one. The similarity between human and animal have allowed consider laboratory animals as valid model for approbation of initiation and modulation of functional states of nervous system techniques, including the low-frequency rhythmical electrical stimulation.

Key words: parameters of respiratory and cardiac activity, methods of physical stimulation on nervous system, the low-frequency rhythmical electrical stimulation, the two-dimensional vector model of functional state, laboratory animals (rabbits).

Рентгенологическая оценка доставки порошкообразных веществ в бронхо-легочный аппарат лабораторной крысы методом «сухой» инсуффляции

М.А. Сырцова^{1,2}, С.В. Оковитый^{1,5}, В.Б. Бессонов³, М.В. Котова⁴

¹ – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, Санкт-Петербург

² – ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

³ – Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург

⁴ – ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург

⁵ – НИЛ системного кровообращения Института экспериментальной медицины Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра МЗ РФ, Санкт-Петербург

Контактная информация: Сырцова Марина Александровна, marina.syrzcova@mail.ru

В исследовании впервые была опробована методика рентгенографической визуализации респираторного отдела аутбредных крыс путем введения контрастного вещества методом «сухой» инсуффляции. Использование этого метода позволяет доставлять порошкообразное вещество в бронхо-легочный аппарат крысы вплоть до сегментарных бронхов в полном объеме, равномерно распределяясь между правым и левым легкими. Введение бария сульфата (доставленная доза – 100 мг) методом «сухой» инсуффляции дает возможность рентгенологически визуализировать бронхо-легочный аппарат крысы.

Ключевые слова: «сухая» инсуффляция, рентгенографическая визуализация, легкие, крыса.

Введение

Современные способы доставки лекарственных средств непосредственно к органу-мишени являются наиболее оптимальными и широко востребованными. Наибольший прогресс достигнут в создании ингаляционных систем доставки препаратов в рамках лечения бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких [8]. Применение таких систем в пульмонологии сводит к минимуму системные побочные эффекты вводимых фармакологических агентов,

сокращает время от момента введения препарата до начала наступления фармакологического эффекта, позволяет точно контролировать отгруженную дозу лекарственного вещества. Кроме того, это дает возможность использовать минимально эффективную дозу препарата и уменьшить количество вспомогательных веществ, формирующих основу лекарственной формы, что ведет к снижению лекарственной нагрузки на организм и сокращению расходов при изготовлении лекарственного препарата [6].

При проведении доклинических исследований лекарственных препаратов для ингаляционного введения, а также при моделировании различных заболеваний бронхо-легочной системы у экспериментальных животных основной проблемой является сложность определения доставленной дозы фармакологического агента в легкие и глубины его проникновения. Одним из наиболее предпочтительных методов доставки в легкие мелких лабораторных животных порошкообразных веществ является использование «сухих» инсуффляторов [7]. Данное устройство представляет собой небольшую коническую трубку, состоящую из пластикового корпуса и стальной трубки. Корпус включает несколько частей: одна часть соединена со стальной трубкой (подающая трубка), средняя часть – расширение камеры для образца или субстанции. Далее следует камера для образцов, которая переходит в отделение с мини-насосом, где происходит прием и обработка воздуха (рис. 1). Качественные доклинические испытания с использованием инсуффляторов являются основной доказательной базой для проведения дальнейших клинических исследований.

Целью исследования стала оценка глубины проникновения порошкообразных веществ в бронхо-легочный аппарат лабораторной крысы при введении их методом «сухой» инсуффляции.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 12-ти беспородных белых крысах-самцах средней массой 320 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН. Содержание животных осуществлялось в условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к воде при 12-часовом световом режиме в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом ФБОУ ВПО СПХФА. За 8 ч до проведения исследования животным ограничивался доступ к корму.

Для проведения инсуффляции животные наркотизировались с помощью комбинации тилетамина гидрохлорида/золазепама гидрохлорида (Золетил-100, Virbac, Франция) в дозе 4 мг/кг и ксилази-

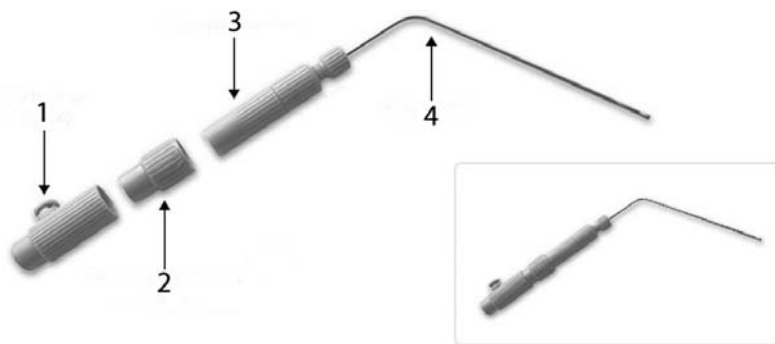


Рис. 1. Принципиальная схема устройства «сухого» инсуффлятора.

1 – мини-насос; 2 – расширение камеры для образца; 3 – камера для образцов; 4 – подающая трубка.

на гидрохлорида (Ксила 2%, Interchemie, Нидерланды) в дозе 10 мг/кг. Наркоз наступал через 3-4 мин после внутримышечного введения препаратов. После этого крыс фиксировали на специальной платформе, проводили интубацию трахеи с помощью ларингоскопа «Small Animal Laryngoscope for Rat» (Model LS-2-R, Penn-Century, США) и осуществляли инсуффляцию «сухим» инсуффлятором «Dry Powder Insufflator DP-4» (Penn-Century, США). Ранее возможность использования такого типа инсуффлятора для легочной доставки сухих порошковых веществ была показана в исследованиях на мелких лабораторных животных [5].

Для оценки глубины введения порошка в легкие было решено использовать наиболее доступный рентгенологический метод контроля с применением в качестве контраста бария сульфата (БАР-ВИПС, ООО «ВИПС-МЕД», Россия) в доставленной дозе 25, 50 и 100 мг (по 3 животных на точку). Контролем служили

оставшиеся животные, которым инсуффляционно вводилась лактоза, часто используемая в качестве вспомогательного вещества при изготовлении лекарственных форм, в доставленной дозе 25, 50 и 100 мг соответственно.

Рентгенографию выполняли на рентгеновском аппарате для ветеринарии «Пардус-300» (СПбГЭТУ «ЛЭТИ»), отличительной особенностью которого является сравнительно низкая мощность излучения и малые размеры фокусного пятна (менее 100 мкм) [3]. Снимки выполнялись при следующих физико-технических условиях: напряжение на трубке – 60 кВ; анодный ток – 150 мкА; время экспозиции – 0,1 сек. В качестве системы визуализации использовался автоматический сканер для пластин с фотостимулируемым люминофором. Время между снятием рентгенографических снимков составляло 3 мин. Для проведения рентгенографии было специально оборудовано рабочее место (рис. 2).

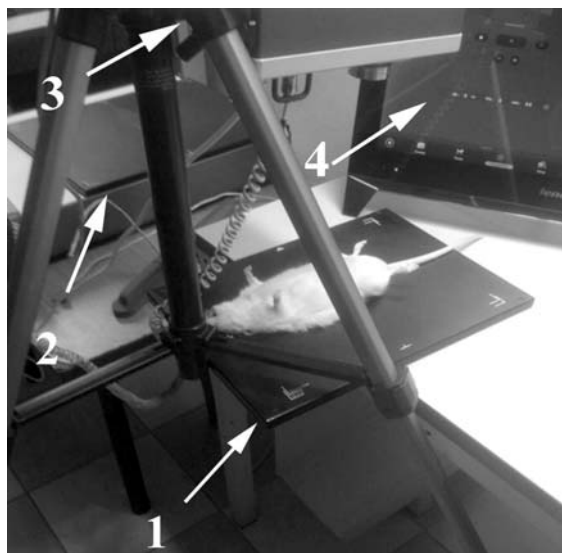


Рис. 2. Рабочее место для рентгенографического исследования.

1 – пластина для проведения рентгенографии; 2 – сканер; 3 – рентгеновский аппарат; 4 – ПК со специальным программным обеспечением для обработки получаемых изображений.

Результаты и их обсуждение

В результате эксперимента было установлено, что однократное введение в легкие крысы пропеллента (лактозы) не вызывает изменений в их рентгенологической картине по сравнению с нормой. Здоровые легкие практически не

задерживают рентгеновских лучей. Они дают светлый фон, на котором хорошо выделяются тени плотных органов грудной клетки. На снимке, выполненном в прямой проекции в фазу неполного вдоха (рис. 3А), легкие видны только в межреберьях, остальные участки прикры-

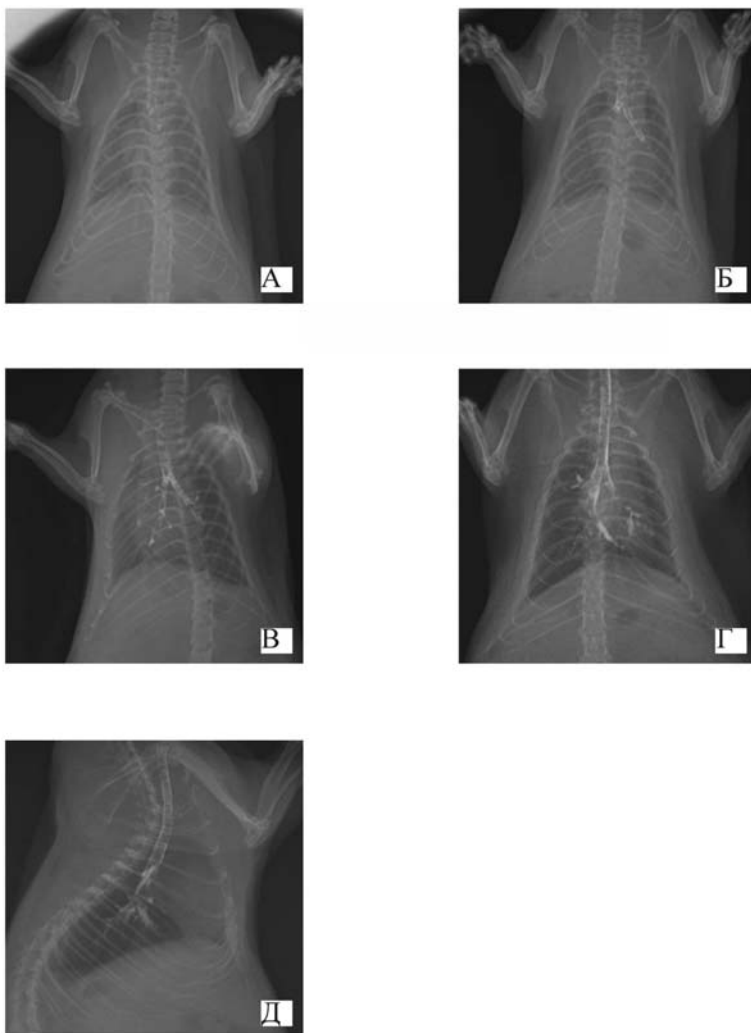


Рис. 3. Рентгенограммы грудной клетки.

А – рентгенограмма грудной клетки крысы контрольной группы после введения в легкие лактозы; Б – рентгенограмма грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (25 мг); В – рентгенограмма грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (55 мг); Г – рентгенограмма (прямая проекция) грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (100 мг); Д – рентгенограмма (правая боковая проекция) грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (100 мг).

ваются интенсивными тенями ребер, лопаток, плечевых костей, диафрагмы и сердечно-сосудистым силуэтом. Полученные результаты согласуются с описанием нормальных легких крысы [2].

После инсуффляции в легкие 25 мг бария сульфата на рентгенограмме органов грудной полости, выполненной в прямой проекции (рис. 3Б), в верхних отделах (до 5-6 ребра) обоих легочных полей наблюдали повышение прозрачности легочной ткани. В проекции бифуркации трахеи (больше справа – вероятно, вследствие задержки контраста в начальном отделе правого главного бронха) определялся высокоплотный очаг задержки контрастного вещества, визуализировалась однородная тень левого главного бронха. Направление тени косое, под углом $\sim 45^\circ$ по отношению к оси позвоночного столба, протяженностью от 4-го до 6-го ребра.

На рентгенограмме органов грудной полости, выполненной в левой косой проекции, после введения 55 мг контрастного препарата во всех видимых отделах обоих легочных полей (больше слева) отмечается повышение прозрачности легочной ткани (рис. 3В). В проекции трахеи, бифуркации, левого главного бронха, правого главного бронха и его каудального и поствального бронхов отмечаются неоднородные высокоплотные участки задержки контраста.

При введении контрастного вещества в дозе 100 мг на рентгенограммах органов грудной полости, выполненных в прямой (рис. 3Г) и правой боковой (рис. 3Д) проекциях, во всех видимых отделах обоих легочных полей отмечается повышение прозрачности легочной ткани. В проекции трахеи, бифуркации, левого и правого главных бронхов, кра-

ниального, каудального и поствального сегментарных бронхов правого легкого, двух крупных нижних сегментарных бронхов левого легкого отмечаются неоднородные высокоплотные участки задержки контрастного вещества.

Как показали проведенные исследования, по мере увеличения дозы вводимого контрастного вещества наблюдается увеличение глубины его проникновения в бронхо-легочный аппарат крысы, начиная от трахеи и заканчивая сегментарными бронхами.

Ранее эффект доставки лекарственного препарата в легкие с помощью метода «сухой» инсуффляции доказывали с помощью введения радиоактивных меченых частиц или флуоресцентных микросфер, смешанных с лактозой [4]. Как и в нашем исследовании, использование инсуффлятора позволяло увеличить глубину проникновения порошка и давало более равномерное его распределение в легких мышей. Такой метод введения фармакологических агентов может быть интересен как для оценки действия лекарственных веществ в бронхах, так и при моделировании различной бронхо-легочной патологии.

В табл. приведена сравнительная характеристика основных устройств по доставке субстанций в легкие лабораторных животных для проведения клинических исследований.

Кроме того, «сухая» инсуффляция может представлять интерес в качестве одного из методов бронхографии в ветеринарии, т.к. на сегодняшний день разработана только методика и техника интратрахеальной бронхографии крупных и средних бронхов у собак водной взвесью бария сульфата с предварительной анестезией дыхательных путей [1].

Преимущества и недостатки экспериментальных устройств доставки ингаляционных препаратов

Устройства для доставки ингалянта в легкие	Преимущества	Недостатки
Портативные системы ингаляционного введения с распределением ингалянта в гермообъеме	<ul style="list-style-type: none"> • Доступность; • Относительная дешевизна; • Портативность; • Возможно одновременное воздействие сразу несколько животных; • Не требуется наркотизация животных 	<ul style="list-style-type: none"> • Осаждение большого количества ингалянта вещества на поверхности тела животного; • Неэкономичность расхода ингалянта; • Большая потеря веществ при ингаляции; • Невозможность контроля доставленной дозы ингалянта в легкие; • Потеря вещества в атмосферу с возможностью воздействия ингалянта на экспериментатора; • Использование только жидких ингалянтов
Многофункциональные ингаляционные системы	<ul style="list-style-type: none"> • Применение для долгосрочных и краткосрочных исследований; • Возможно использование различных ингалянтов (жидких, пылевых, газообразные, наноаэрозоли); • Одновременное воздействие сразу несколько животных; • Не требуется наркотизация животных 	<ul style="list-style-type: none"> • Очень высокая стоимость; • Громоздкость; • Неэкономичность расхода ингалянта; • Большая потеря вещества при ингаляции; • Невозможность контроля доставленной дозы ингалянта в легкие
«Сухие» инсуффляторы	<ul style="list-style-type: none"> • Высокая портативность; • Быстрота выполнения «сухой» инсуффляции; • Введение ингалянта непосредственно в легкие; • Точный контроль доставленной, а не отгруженной дозы; • Экономичность 	<ul style="list-style-type: none"> • Необходимость наркотизации животных; • Использование только порошкообразных ингалянтов

Таким образом, методика «сухой» инсуффляции позволяет не только визуализировать бронхо-легочный аппарат крысы, но и равномерно распределить в нем вводимое вещество. Методика

проста в исполнении, легко воспроизводима в условиях лаборатории, не требует использования радиоактивных препаратов и дорогостоящего оборудования.

Выводы

1. Использование метода «сухой» инсуффляции позволяет доставлять порошкообразное вещество в бронхо-легочный аппарат крысы вплоть до сегментарных бронхов. Вводимые таким образом вещества попадают в орган-мишень в полном объеме, распределяясь равномерно между правым и левым легкими.

2. Введение бария сульфата (доставленная доза – 100 мг) методом «сухой» инсуффляции дает возможность рентгенологически визуализировать бронхо-легочный аппарат крысы.

Список литературы

1. *Липин В.А., Терехина М.Т., Хохлов А.Л.* Ветеринарная рентгенология. - М: Колос. 1966. 248 с.
2. *Петренко В.М.* Анатомия легких у белой крысы // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. № 10. С. 414-417.
3. *Потрахов Н.Н., Грязнов А.Ю., Бессонов В.Б. и др.* Физико-технические основы современной микрофокусной рентгенодиагностики // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». 2014. № 9. С.29-37.
4. *Burrows J.L., Douglas G.J., Smal H.* Visualization of dry-powder and liquid suspension deposition in rat lungs following intra-tracheal administration using a non-radioactive method // Pharmacokinetics & Drug Metabolism. - Sandwich: Pfizer Global R&D. 2006.
5. *Hoppentoch M., de Boer A.H.* In vitro evaluation of the DP-4M PennCentury™ insufflator // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2014. Vol. 88. No. 1. P. 153-159.
6. *Prokopovich P.* Inhaler devices: fundamentals, design and drug delivery // Woodhead Publishing Limited. 2013. 171 p.
7. *Sinha B., Mukherjee B.* Development of an inhalation chamber and a dry powder inhaler device for administration of pulmonary medication in animal model // Drug Dev. Ind. Pharm. 2012. Vol. 38. No. 2. P. 34-38.
8. Targeted drug delivery: Concepts and design / Ed. Devarajan P.V., Jain S. - Heidelberg, New-York, Dordrecht, London: Springer cham. 2015. P. 235-252.

Radiographic assessment delivery of powdery substances in broncho-pulmonary device of laboratory rat by “dry” insufflations

M.A. Syrtsova, S.V. Okovitiy, V.B. Bessonov, M.V. Kotova

In this research the technique of X-ray imaging of the respiratory department of outbred rats by administration of the contrast method “dry” insufflation was first tested. The usage of this method allows you to bring in a powdery substance in the broncho-pulmonary device rats up to the segmental bronchi fully, distributed evenly between the right and left lungs. The injection of barium sulphate (brought in dose of 100 mg) by the method of “dry” insufflation allows radiographic visualization of broncho-pulmonary device rats.

Key words: “dry” insufflation, radiographic imaging, lung, rat.



Изменения релейных и пластических свойств глутаматергических синапсов в прелимбической коре крыс при поведенческой депрессии

И.И. Абрамец, Д.В. Евдокимов, Т.О. Зайка

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк

Контактная информация: Абрамец Игорь Игоревич, abrametz2009@yandex.ru

Сведения об активности префронтальной коры при депрессивном синдроме противоречивы. Источники противоречий – различная продолжительность синдрома либо регистрация активности или в поверхностных, или в глубоких слоях коры. В исследованиях на крысах вызывали поведенческую депрессию хроническим воспалением мягких тканей спины или снижением уровней моноаминов в мозге после введения резерпина. У животных с депрессивным синдромом исследовали глутаматергическую синаптическую передачу во 2/3 и 5 слоях в опытах на срезах прелимбической коры. Установлено, что наиболее существенные изменения синаптической передачи во 2/3 слоях на фоне поведенческой депрессии – увеличение амплитуд НМДА компонентов популяционных ВПСП пирамидных нейронов и угнетение экспрессии длительной потенциации. В этих же условиях в пятом слое выявлено снижение амплитуд популяционных ВПСП пирамидных нейронов за счет уменьшения их AMPA компонентов и угнетение развития длительной потенциации. Это позволяет полагать, что в основе депрессивного синдрома лежит угнетение активности проекционных нейронов пятого слоя прелимбической коры и нарушение ее связей с лимбическими структурами.

Ключевые слова: поведенческая депрессия, воспаление, резерпин, префронтальная кора, синаптическая передача, синаптическая пластичность.

Введение

С появлением новых препаратов, эффективных при резистентных к действию традиционных антидепрессантов формах депрессий, таких как селективные и неселективные блокаторы НМДА-рецепторов (NMDA-R), позитивные модуляторы AMPA-R [12], стало очевидным, что нарушение глутаматергической синаптической передачи – по крайней мере, в кортикальных структурах – является важным звеном в патогенезе депрессив-

ного синдрома. В то же время, сведения о характере изменений глутаматергической нейротрансмиссии в медиальной префронтальной коре (mPFC), полученные в клинических и экспериментальных условиях, достаточно противоречивы. С одной стороны, в клинических условиях получены данные, свидетельствующие о гиперактивности нейронов mPFC при униполярной депрессии [4, 9]. Более того, установлено, что глубокая стимуляция мозга, которая изменяет нейро-

нальную активность в коре и подкорковых структурах в зависимости от ее направления, ослабляет депрессивную симптоматику в клинических условиях и при моделировании поведенческой депрессии у грызунов [6, 13]. У больных депрессией выявлена гиперактивность субгenuальной поясной коры [6], которая соответствует мПФК грызунов. Однако в других исследованиях у больных униполярной депрессией выявлено ослабление возбуждающей нейротрансдачи в субгenuальной поясной коре [18]. Подобные изменения в мПФК грызунов были установлены при поведенческой депрессии, вызванной длительным хроническим стрессом [5]; более того, показано, что оптогенетическая стимуляция мПФК обладает антидепрессантоподобным действием [3]; тем не менее, по данным других исследователей, эта же процедура провоцирует поведенческую депрессию [22, 23]. Клинические данные, свидетельствующие о глутаматергической гипоактивности ПФК, получены в посмертных препаратах мозга, т.е. после длительного течения заболевания; в экспериментальных условиях эти же изменения наблюдали после воздействия стресса в течение нескольких недель. Возможно, фактор времени может быть одной из причин противоречий. Другой источник наблюдаемых противоречий может быть связан с неодинаковыми реакциями популяций нейронов в разных слоях мПФК в ответ на депрессогенные воздействия.

Для решения этой проблемы мы исследовали изменения глутаматергической нейротрансдачи в синапсах пирамидных нейронов поверхностных 2/3 слоев и глубокого 5-го слоя прелимбического отдела мПФК на фоне поведен-

ческой депрессии, вызванной хроническим воспалением кожи спины или опустошением запасов моноаминов в мозге после введения резерпина.

Материалы и методы

Исследования выполнены на белых инбредных крысах массой 150-250 г, которые содержались в клетках по 4-6 особей, в условиях 12-часового цикла светлое/тёмное время (включение света в 7:00) со свободным доступом к воде и пище. Исследования выполнены в соответствии с требованиями комиссии по биоэтике ДонНМУ им. М. Горького. Хроническое асептическое воспаление у крыс вызывали по методу, предложенному [2]. Животным под кожу спины вводили 0,5 мл 9% раствора уксусной кислоты; сразу после этого крысам внутрибрюшинно вводили декстран в дозе 200 мг/кг. Через 2-3 дня на месте введения уксусной кислоты появлялся воспалительный инфильтрат. К проведению поведенческих и электрофизиологических исследований приступали на 7-е сутки после введения крысам флогогенов. Резерпин вводили внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг. Через 24 ч после введения животных брали в поведенческие исследования, через 48 ч – в электрофизиологические исследования.

В поведенческих исследованиях уровень депрессивности животных определяли по общепринятой методике [17]. Крыс помещали в аквариумы высотой 50 см, заполненные водой на 2/3 высоты; температура воды – 22-25°C. Регистрировали время иммобилизации крыс, время активного плавания и количество вскарабкиваний на стенки аквариума в течение сеанса вынужденного плавания продолжительностью 300 сек. Уровень

тревожности крыс определяли в приподнятом крестообразном лабиринте [7]. Животных помещали на центральную площадку, мордочкой к открытому рукаву. В течение 5 мин регистрировали время пребывания животных в открытых рукавах (в сек) и количество выходов в открытые рукава.

Электрофизиологические исследования выполнены на срезах мПФК (прелимбическая область). Детали метода изложены ранее [1]. Срезы толщиной 400 мкм готовили с помощью вибратора. Срезы помещали в инкубационную камеру, где их суперфузировали раствором Кребса следующего ионного состава (в мМ): NaCl – 124, KCl – 3; $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1,25; NaHCO_3 – 26, CaCl_2 – 2, MgSO_4 – 1, глюкоза – 10. Раствор Кребса в инкубационной камере насыщался карбогеном, температура поддерживалась на уровне 25°C, скорость протока – 2 мл/мин. Через 90 мин инкубации один из срезов помещался в рабочую камеру объемом 0,5 мл, где суперфузировался насыщенным карбогеном раствором Кребса при температуре 28°C; скорость протока раствора – 2 мл/мин. В срезах прелимбической коры регистрировали популяционные (п) ВПСР пирамидных нейронов 2/3-го или 5-го слоев, которые вызывали электрической стимуляцией 5-го или 2/3-го слоев соответственно. Стимуляцию синаптических входов осуществляли с помощью биполярного никромового электрода прямоугольными импульсами тока длительностью 0,1 мс, частотой 1 в 10 сек. После того как амплитуда пВПСР стабилизировалась, строили кривую зависимости амплитуды пВПСР от интенсивности пресинаптической стимуляции.

AMPA и НМДА компоненты пВПСР пирамидных нейронов коры выделяли фармакологически. В первом случае в раствор Кребса добавляли блокатор НМДА рецепторов – D-2-амино-5-фосфоновалериановую кислоту (D-APV) в концентрации 50 мкМ; во втором случае срезы коры суперфузировали раствором Кребса со сниженной до 0,2 мМ концентрацией Mg^{2+} и добавлением 10 мкМ блокатора AMPA рецепторов – 6,7-динитрохиноксалин-2,3-диона (DNQX), 50 мкМ неконкурентного блокатора ГАМК_A рецепторов – пикротоксина и 1 мкМ ко-агониста НМДА рецепторов – глицина. Длительную потенциацию (ДП) вызывали тетанической стимуляцией 2/3-го или 5-го слоев коры частой 100 Гц длительностью 1 сек, 3 стимуляции с интервалом 10 сек; интенсивность стимуляции подбиралась таким образом, чтобы амплитуда пВПСР составляла ~1/3 от максимальной. Каждая серия опытов выполнена на 6-9 срезах мозга, взятых от 3-4 животных.

Результаты исследований обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с помощью лицензионной программы Medstat. Для каждой серии определяли среднюю и стандартную ошибку средней. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований

На фоне хронического асептического воспаления выявлено возрастание уровня депрессивности животных, которое проявлялось увеличением времени иммобилизации в тесте форсированного плавания. Действительно, время иммобилизации возрастало до $158,3 \pm 6,3$ сек против $125,3 \pm 6,3$ сек в контроле; на фоне резер-

пина время иммобилизации крыс возросло до $167,5 \pm 6,2$ сек ($p < 0,05$ в обоих случаях). Параллельно с этим уменьшалось время активного плавания и климбинга. В этих же условиях возрастал уровень тревожности животных, оцениваемый в приподнятом крестообразном лабиринте. Так, время пребывания в открытых рукавах уменьшалось до $45,5 \pm 5,1$ сек (воспаление) и $52,7 \pm 5,6$ сек (резерпин) против $76,6 \pm 6,4$ сек в контроле ($p < 0,05$). Снижалось также количество переходов из закрытых в открытые рукава от $5,9 \pm 0,4$ сек в контроле до $2,9 \pm 0,3$ сек (воспаление) и $1,1 \pm 0,4$ сек (резерпин).

При электрической стимуляции проходящих в 5-м слое афферентных волокон от различных источников в пирамидных нейронах 2/3-го слоев регистрируются комплексные пВПСП, у которых с помощью фармакологических веществ удается выделить компоненты, связанные с активацией глутаматом постсинаптических AMPA и НМДА Р (рис. 1А 1, 2 и 3 соответственно). При увеличении интенсивности пресинаптической стимуляции амплитуды как комплексных пВПСП, так и их AMPA и НМДА компонентов линейно возрастали (рис. 1А).

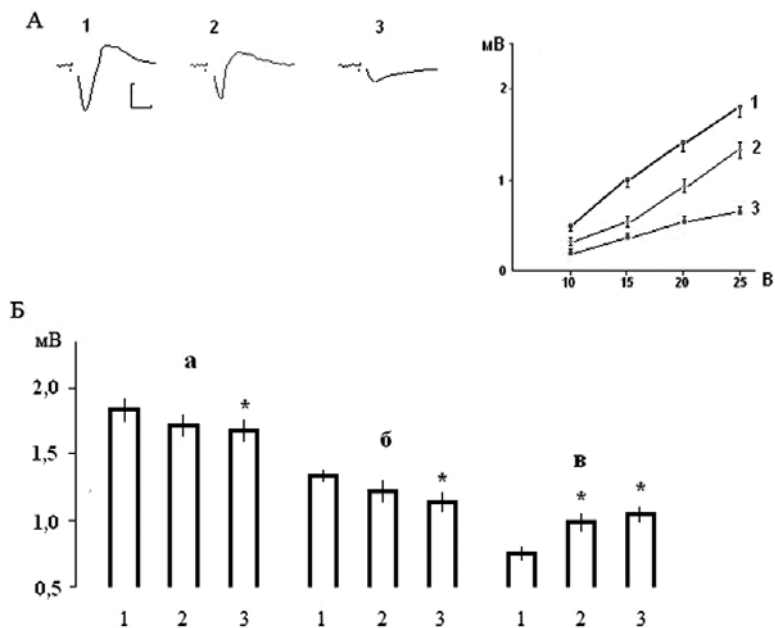


Рис. 1. Популяционные ВПСП пирамидных нейронов 2/3-го слоев мПФК, их AMPA и НМДА компоненты и изменения синаптических потенциалов в условиях развития депрессивного синдрома.

А – слева образцы максимальных комплексных пВПСП (1), AMPA и НМДА компонентов пВПСП (2 и 3 соответственно), зарегистрированные в одном срезе; справа – зависимость амплитуд комплексных пВПСП (1), AMPA (2) и НМДА (3) компонентов от интенсивности пресинаптической стимуляции. Калибровка 1 мВ, 10 мс.

Б – изменения усредненных амплитуд максимальных комплексных пВПСП (а), их AMPA (б) и НМДА (в) компонентов; 1 – контроль, 2 – на фоне хронического воспаления, 3 – на фоне действия резерпина.

* – величины достоверно отличаются от контроля при $p < 0,05$.

При поведенческой депрессии, вызванной хроническим воспалением мягких тканей спины крыс, выявлены изменения релейных свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов 2/3-го слоев мПФК. Наблюдали недостоверную (рис. 1Б) тенденцию к снижению максимальных амплитуд комплексных пВПСП – $1,70 \pm 0,22$ мВ против $1,35 \pm 0,11$ мВ в контроле (рис. 1Б). Также наблюдали на грани достоверности ($p=0,051$) уменьшение амплитуд AMPA компонентов пВПСП – $1,25 \pm 0,14$ мВ против $1,83 \pm 0,21$ мВ в контроле ($p > 0,05$). Наконец, выявлено достоверное изменение амплитуд НМДА компонентов пВПСП пирамидных нейронов 2/3-го слоев мПФК – $0,81 \pm 0,16$ мВ против $0,61 \pm 0,12$ мВ в контроле ($p < 0,05$).

Более выраженные изменения релейных свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов поверхностных 2/3-го слоев прелимбической коры были зарегистрированы при поведенческой депрессии на фоне снижения запасов моноаминов в мозге, вызванного введением резерпина. Действительно, установлено снижение

амплитуд максимальных комплексных пВПСП: $1,83 \pm 0,21$ мВ в контроле против $1,62 \pm 0,17$ мВ ($p < 0,05$) при действии резерпина (рис. 1Б). Вероятно, это обусловлено достоверным ($p < 0,05$) снижением амплитуды AMPA компонента комплексного ВПСП – $1,13 \pm 0,14$ мВ против $1,35 \pm 0,11$ мВ в контроле (рис. 1Б). В то же время отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) возрастание амплитуд НМДА компонентов комплексных пВПСП – $0,85 \pm 0,13$ мВ против $0,61 \pm 0,12$ мВ в контроле (рис. 1Б).

Наряду с изменением релейных выявлено нарушение пластических свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов 2/3-го слоев мПФК (табл.). У контрольных животных прирост амплитуды пВПСП пирамидных нейронов 2/3-го слоев мПФК на 30-й мин после прекращения тетанической стимуляции составлял $58,5 \pm 6,4\%$ по отношению к контролю; на фоне хронического воспаления этот показатель достоверно уменьшился до $12,3 \pm 4,4\%$ (табл.). Точно так же на фоне действия резерпина прирост амплитуды пВПСП был достоверно меньше – $17,6 \pm 4,7\%$ (табл.).

Таблица

Влияние хронического воспаления и воздействия резерпина на экспрессию длительной потенциации синаптической передачи

Стимуляция / отведение	Изменения (в %) амплитуд пВПСП на 30-й мин после прекращения стимуляции		
	Контроль	Хроническое воспаление	Воздействие резерпина
Стимуляция 5-го слоя Отведение 2/3-го слоя	$158,5 \pm 6,4$	$112,3 \pm 4,4^*$	$117,6 \pm 4,7^*$
Стимуляция 2/3-го слоя Отведение 5-го слоя	$135,4 \pm 5,1$	$108,2 \pm 4,6^*$	$112,6 \pm 5,5^*$

Примечание: * – величины достоверно отличаются от контроля при $p < 0,05$.

При электрической стимуляции поверхностных 2/3-го слоев в выходных пирамидных нейронах 5-го слоя мПФК регистрировали комплексные пВПСП, состоящие из АМРА и НМДА компонентов (рис. 2А). Амплитуда этих потенциалов линейно возрастала при увеличении интенсивности пресинаптической стимуляции. Следует отметить, что амплитуды комплексных пВПСП и их компонентов в пирамидных нейронах 5-го слоя были меньше по сравнению таковыми пирамидных нейронов 2/3-го слоев (рис. 1 и 2А). Это может быть обусловлено менее плотной упаковкой пирамидных нейронов глубокого слоя.

На фоне вызываемой хроническим воспалением поведенческой депрессии выявлено достоверное снижение максимальных амплитуд комплексных

пВПСП пирамидных нейронов 5-го слоя (рис. 2Б) – $0,91 \pm 0,09$ мВ против $1,27 \pm 0,07$ мВ в контроле ($p < 0,05$). Это изменение обусловлено, вероятно, угнетением АМРА компонента: амплитуды данного компонента снизились до $0,73 \pm 0,06$ мВ против $1,02 \pm 0,09$ мВ в контроле ($p < 0,05$). Выявлена (рис. 2Б) недостоверная тенденция к уменьшению амплитуд НМДА компонентов пВПСП пирамидных нейронов 5-го слоя мПФК – $0,34 \pm 0,03$ мВ против $0,42 \pm 0,03$ мВ ($p = 0,053$). Снижение амплитуд пВПСП пирамидных нейронов 5-го слоя мПФК на фоне хронического воспаления имеет постсинаптическую природу. Действительно, как следует из рис. 2, отсутствует параллелизм в снижении амплитуд АМРА и НМДА компонентов пВПСП. Кроме того, величины парного облег-

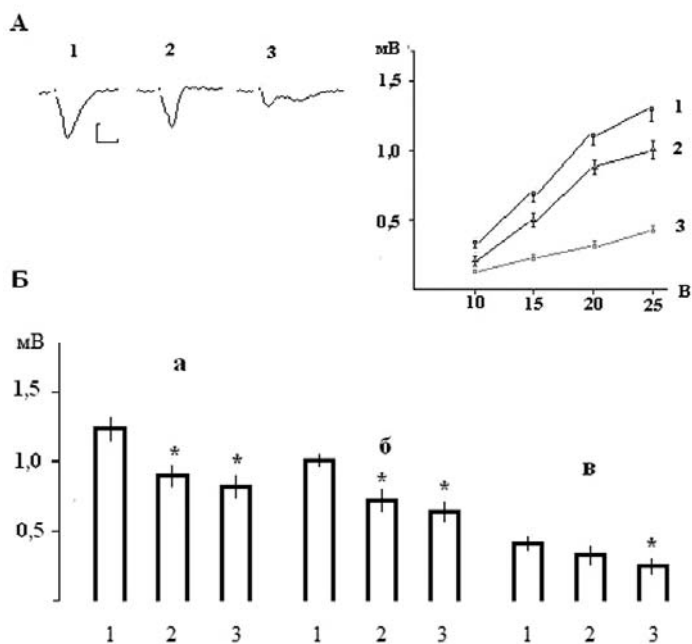


Рис. 2. Популяционные ВПСП пирамидных нейронов 5-го слоя мПФК, их АМРА и НМДА компоненты и изменения синаптических потенциалов в условиях развития депрессивного синдрома. Все обозначения – как на рис. 1.

чения при межимпульсном интервале 50 мс, изменения которых указывает на пресинаптическую природу, в контроле и на фоне хронического воспаления не отличаются ($156,8 \pm 5,7\%$ и $148,4 \pm 7,3\%$ соответственно; $p=0,673$).

Изменения релейных свойств синапсов пирамидных нейронов 5-го слоя мПФК на фоне действия резерпина были такими же, как и в предыдущем случае. Как следует из рис. 2Б, в этих условиях наблюдали снижение амплитуд комплексных пВПСП – $0,83 \pm 0,07$ мВ против $1,27 \pm 0,07$ мВ в контроле ($p < 0,05$); их АМРА компонентов – $0,65 \pm 0,06$ мВ против $1,02 \pm 0,09$ мВ в контроле ($p < 0,05$) и НМДА компонентов – $0,28 \pm 0,03$ мВ против $0,42 \pm 0,03$ мВ в контроле ($p < 0,05$). Снижение амплитуд пВПСП пирамидных нейронов 5-го слоя мПФК не сопровождалось изменениями величин парного облегчения ($156,8 \pm 5,7\%$ в контроле и $144,2 \pm 8,6\%$ на фоне резерпина; $p=0,731$), т.е. имело постсинаптическую природу.

Пластические свойства глутаматергических синапсов пирамидных нейронов 5-го слоя мПФК также претерпевали изменения на фоне поведенческой депрессии. У контрольных животных прирост амплитуд пВПСП на 30-й мин после прекращения тетанической стимуляции составлял $35,4 \pm 5,1\%$ (табл.). На фоне хронического воспаления и действия резерпина эта величина достоверно ($p < 0,05$) уменьшалась до $8,2 \pm 4,6\%$ и $12,6 \pm 5,5\%$ соответственно (табл.).

Обсуждение результатов

Наиболее выраженные изменения синаптических процессов во 2/3-м слоях мПФК на фоне хронического воспаления – повышение активности

синаптических НМДА Р (и, возможно, соотношения «НМДА-ответы / АМРА-ответы»), что наблюдали и другие исследователи [14], а также угнетение экспрессии ДП. В глубоком 5-м слое – ослабление возбуждающей нейротрансдукции в связи с угнетением активности АМРА Р (возможным ростом отношения «НМДА-ответы / АМРА-ответы») и угнетением развития ДП (рис. 1 и 2, табл.). Эти изменения могут быть следствием повышения уровня в мозге цитокинов – интерлейкинов-1 и -6, а также фактора некроза опухолей «альфа». Рецепторы указанных цитокинов и глутаматные рецепторы локализованы в мембранах пирамидных нейронов 2/3-го и 5-го слоев мПФК, но разное распределение этих рецепторов и неодинаковое влияние на НМДА Р и АМРА Р и определяет вызываемое ими нарушение релейных и пластических свойств синапсов пирамидных нейронов [21].

Подобные изменения релейных и пластических свойств синапсов пирамидных нейронов поверхностного и глубокого слоев мПФК выявлены при вызванной резерпином поведенческой депрессии (рис. 1 и 2, табл.). С одной стороны, введение резерпина вызывает активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и рост уровня кортикостерона в крови и мозге крыс [16], который снижает плотность АМРА Р и НМДА Р в постсинаптических уплотнениях нейронов мПФК [5]. С другой стороны, вымывание моноаминов в мозге при действии резерпина изменяет активацию моноаминовых рецепторов и уровень фосфорилирования постсинаптических АМРА Р и НМДА Р [25].

Депрессия как заболевание представляет собой континуум синдромов и суб-синдромов депрессивных и недепрессивных [8]. Такие симптомы депрессии, как чувство вины, сниженное настроение, суицидальные идеи, невозможно воспроизвести на животных. Другие симптомы депрессии – беспомощность, ангедония, поведение отчаяния, нарушения сна и аппетита, угнетение мотиваций – воспроизводятся на животных как депрессивно-подобные симптомы [10]. Наблюдаемое нами увеличение продолжительности иммобилизации и уменьшение попыток вскарабкаться на стенки аквариума в тесте форсированного плавания, уменьшение времени нахождения крыс в открытых рукавах и снижение количества переходов из закрытых в открытые рукава приподнятого крестообразного лабиринта можно расценивать как депрессивно-подобные симптомы.

Поверхностные 2/3 слои мПФК обрабатывают информацию, поступающую от лимбических структур (прилежащего ядра, миндалин, вентрального гиппокампа и контрлатеральной мПФК), и направляют обработанную информацию в глубокие 5 и 6 слои. Аксоны нейронов глубоких слоев мПФК проецируются к лимбическим и среднемозговым структурам [19]. Поэтому очевидно, что нарушения активности нейронов мПФК может быть причиной развития депрессивно-подобных симптомов.

Нарушение пластических свойств синапсов пирамидных нейронов 2/3-го слоев может изменять взаимодействие мПФК и миндалин, в результате чего уменьшается вероятность коррекции негативных эмоциональных состояний. Так, для угасания проявлений услов-

но рефлекторного страха («замирание» животных при действии безусловного стимула) необходима экспрессия ДП в мПФК [15].

Но наиболее серьезная причина развития депрессивно-подобного поведения – снижение активности проекционных нейронов 5-го слоя мПФК, обусловленное даун-регуляцией AMPA Р. С помощью оптогенетических исследований установлено, что стимуляция пирамидных нейронов 5-го слоя мПФК низкой (4 Гц) частотой уменьшает время иммобилизации в плавательном тесте, не увеличивая при этом двигательную активность животных. Хроническая стимуляция (4 Гц, 5 мин, 14 дней) нейронов 5-го слоя устраняла поведенческую депрессию, вызванную хроническим субординационным стрессом. Наконец, оптогенетическая стимуляция нейронов 5-го слоя мПФК синхронизировала осцилляторную активность в мПФК и ее лимбических проекциях в бета-диапазоне [11, 19]. Межструктурную осцилляторную синхронность считают потенциальным механизмом, позволяющим связывать в мозге активность популяций нейронов, распределенных в кортикальных и подкорковых структурах и участвующих в формировании поведенческих реакций. Известно, что развитие терапевтического эффекта антидепрессантов у больных депрессией сопровождается усилением синхронизации лимбических структур в бета-диапазоне [20]. Этот эффект обусловлен сенситизацией AMPA Р и повышением функциональной активности проекционных нейронов глубоких слоев мПФК и присутствием всем обладающим антидепрессивной активностью лекарствам – традиционным антидепрессантам, селективным

и неселективным блокаторам НМДА Р, позитивным аллостерическим модуляторам АМРА Р и метаботропных глутаматных рецепторов первой группы [12, 24, 25].

Выводы

В условиях моделирования депрессивного синдрома различной нейрoхимической природы и с разной продолжительностью его формирования наблюдали однотипные изменения релейных и пластических свойств пирамидных нейронов поверхностных и глубоких слоев мПФК.

В воспринимающих поверхностных слоях мПФК наблюдали повышение активности НМДА рецепторов и угнетение экспрессии длительной потенциации.

В проекционных нейронах глубокого слоя мПФК установлено угнетение возбуждающей синаптической передачи и нарушение экспрессии длительной потенциации.

Указанные изменения нарушают взаимодействие мПФК с лимбическими структурами (в первую очередь, миндалиной и прилежащим ядром, регулируемыми негативные эмоции и мотивации) и приводят к развитию депрессивного синдрома.

Список литературы

1. Абрамец И.И., Евдокимов Д.В., Талалаенко А.Н. Изменения пластических свойств и метапластичности глутаматергических сигналов в коре и гиппокампе крыс при резерпиновой поведенческой депрессии // Нейрофизиология. 2007. Т. 39. № 3. С. 214-221.
2. Тринус Ф.П., Мохорт Н.А. Нестероидные противовоспалительные средства. – Киев: Здоровье. 1975. С. 218.
3. Covington H.E., Lobo M.K., Maze I., et al. Antidepressant effect of optogenetic stimulation

- of the medial prefrontal cortex // J. Neurosci. 2010. V. 30. No. 48. P. 16082-16090.
4. Etkin A. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective // Curr. Top. behav. neurosci. 2010. V. 2. No. 3. P. 251-277.
 5. Goldwater D.S., Pavlides C., Hunter R.G., et al. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery // Neuroscience. 2009. V. 164. No. 2. P. 798-808.
 6. Hamani C., Mayberg H., Stone S., et al. The subcallosal cingulate gyrus in the context of major depression // Biol. Psychiatry. 2011. V. 69. No. 4. P. 301-308.
 7. Handley S.L., Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration of "fear"-motivated behavior // Naunyn-Smiedebergs Arch. Pharmacol. 1984. V. 327. No. 1. P. 1-5.
 8. Haro J., Orelund L. Depression as spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implications of the locus coeruleus // Brain Res. Rev. 2001. V. 38. No. 1. P. 79-128.
 9. Holtzheimer P.E., Mayberg H.S. Deep brain stimulation for psychiatric disorders // Annu. Rev. Neurosci. 2011. V. 34. P. 289-307.
 10. Krishnan V., Nestler E.J. Animal models of depression: molecular perspectives // Curr. Top. behav. neurosci. 2011. V. 7. No. 2. P. 121-147.
 11. Kumar S., Black S.J., Hultman R., et al. Cortical control of affective networks // J. Neurosci. 2013. V. 33. No. 3. P. 1116-1129.
 12. Mathew S.J., Manji H.K., Charney D.S. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders // Neuropsychopharmacol. 2008. V. 33. No. 9. P. 2080-2092.
 13. Mayberg H.S., Lozano A.M., Voon V., et al. Deep brain stimulation for treatment resistant depression // Neuron. 2005. V. 45. No. 2. P. 651-660.
 14. Metz A.E., Yau H.-J., Centeno M.V., et al. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2009. V. 108. No. 7. P. 2423-2428.
 15. Milad M.R., Quirk G.J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction // Nature. 2002. V. 420. No. 6911. P. 70-74.
 16. Olfe J., Domanska G., Schuett C., et al. Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alteration of the

- sympathetic and HPA axis responsiveness // BMC Physiology. 2010. V. 10. No. 2. P. 2-11.
17. *Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M.* "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and effects of imipramine // Eur. J. Pharmacol. 1978. V. 51. No. 2. P. 291-294.
18. *Price J.L., Drevets W.C.* Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders // Trends Cogn. Sci. 2012. V. 16. No. 1. P. 61-71.
19. *Riga M., Matos M.R., Glas A., et al.* Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry // Frontiers Syst. Neurosci. 2014. V. 8. Article 230; doi 10 3389/fnsys.2014.00230.
20. *Salvadore G., Cornwell B.R., Sambataro F., et al.* Anterior cingulate desynchronization and functional connectivity with the amygdala during a working memory task predict rapid antidepressant response to ketamine // Neuropsychopharmacol. 2010. V. 35. No. 7. P. 1415-1422.
21. *Vezzani A., Viviani B.* Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability // Neuropharmacol. 2015. V. 96. No. 1. P. 70-82.
22. *Warden M.R., Selimbeyoglu A., Mirzabekov J.J., et al.* A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge // Nature. 2012. V. 492. No. 7429. P. 428-432.
23. *Yizhar O., Fenno L.E., Prigge M., et al.* Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction // Nature. 2011. V. 477. No. 7363. P. 171-178.
24. *Zarate C.A., Singh J.B., Carlson P.J., et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression // Arch. Gen. Psychiatry. 2006. V. 63. No. 4. P. 856-864.
25. *Zoladz P.R., Munos C., Diamond D.M.* Beneficial effects of tianeptine on hippocampus-dependent long-term memory and stress-induced alterations of brain structure and function // Pharmaceuticals. 2010. V. 3. P. 3143-3166; doi: 10 3390/ph 3103143.

The alterations of relay and plasticity properties of glutamatergic synapses within prelimbic cortex of rats at conditions the behavioral depression

I.I. Abramets, D.V. Evdokimov, T.O. Zayka

Data about a prefrontal cortex activity particularly its prefrontal division at conditions of depressive syndrome are controversial. Sources of discrepancies are different syndrome duration or registration of activity in cortex superficial or deep layers. We evoked behavioral depression by chronic inflammation of back skin or by decreasing of monoamine levels in brain after reserpine administration in experiments on rats. It was explored the glutamatergic synaptic transmission at 2/3 and 5 layers of prefrontal cortex on brain slices of rats with depressive syndrome. The most significant alterations of synaptic transmission at 2/3 layers at condition of behavioral depression are increasing of amplitudes of NMDA component of field EPSPs and inhibition of long-term potentiation expression. In 5 layer of cortex it was detected decreasing amplitudes of field EPSPs for account of inhibition its AMPA components and inhibition of long-term potentiation expression. It may be to think that decreasing of activity of output neurons of 5 layer of medial prefrontal cortex and violation of connection of cortex with limbic structures bases of depressive syndrome.

Key words: behavioral depression, inflammation, reserpine, prefrontal cortex, synaptic transmission, synaptic plasticity.

Морфологические аспекты регенеративного потенциала ишемически поврежденного миокарда после применения аллогенного биоматериала

А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина

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

Контактная информация: к.б.н. Лебедева Анна Ивановна, Jeol02@mail.ru

Цель работы – определение основных механизмов регенерации ишемически поврежденного миокарда после использования аллогенного биоматериала. Кроликам осуществляли перевязку передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Через 5 суток интрамиокардиально в зону ишемии вводили аллогенный биоматериал, в результате чего формировался соединительнотканно-мышечный регенерат с преобладанием мышечной ткани. Выявлено, что продукты биодеградации биоматериала подавляют профиброгенную активность клеток, стимулируют ангиогенез и регенеративные возможности миокарда. Сердечные миопрогениторные клетки дифференцировались в зрелые кардиомиоциты.

Ключевые слова: аллогенный биоматериал, ишемизированный миокард, кардиомиоциты, регенерация.

Введение

В настоящее время нет единого мнения о регенеративной способности миокарда. Одни исследователи признают возможность репарации миокарда за счет наличия стволовых клеток с возможностью их кардиомиогенной дифференциации [10, 16, 20], другие авторы считают, что миокард не содержит регенеративного пула и не способен к адекватному восстановлению после повреждения во взрослом организме, а кардиомиоциты расцениваются как терминально дифференцированные элементы [1, 7, 11].

Исходя из положения, что кардиомиоцитарный резерв сердца существенно ограничен и не может покрыть зону обширных повреждений миокарда, используют ряд методов, из которых наиболее разработанным считается органная трансплан-

тация. Применение данной манипуляции связано с риском иммунного отторжения органа, большим листом ожидания, ограничивается морально-этическими, религиозными, законодательными и др. аспектами. Менее радикальными являются методы клеточной терапии, кардиомиопластика стволовыми клетками различного происхождения: фетальными клетками, клетками пуповинной крови, скелетными миоцитами и т.д. [1]. Однако восполнение кардиомиоцитарного пула не может служить полноценным методом восстановления миокарда, т.к. не решается проблема ремоделирования постинфарктного фиброза. Как правило, формированию рубца в мышечной ткани способствует стремительное накопление стромальных элементов и низкая скорость или отсутствие репликации мышечных клеток [7]. В этом аспекте

перспективным представляется применение диспергированного аллогенного биоматериала. Продукты биodeградации биоматериала ингибируют профиброгенную клеточную активность и снижают скорость коллагенообразования, тем самым стимулируют клеточные элементы тканевого ложа [3, 22].

Цель исследования – определение основных механизмов регенерации ишемически поврежденного миокарда с помощью биоматериала Аллоплант (БМА).

Материалы и методы

Экспериментальные исследования с применением БМА были проведены на 48-ми серых кроликах популяции нелинейных конвенциональных животных обоего пола массой 2,5-3 кг. Животные были получены из крестьянско-фермерского хозяйства д. Салзегутово Кармаскалинского р-на «ИП Лобов В.М.» (ветеринарное свидетельство № 56-31 2050).

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasburg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами организации (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [12].

Животные содержались в стационарных клетках индивидуально. В качестве

корма использован стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для кроликов ПЗК-92. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводную очищенную воду всем животным давали без ограничений в поилках. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен экспертным советом по биомедицинской этике ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ.

Биоматериал Аллоплант разработан в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России (руководитель – проф. Э.Р. Мулдашев). Указанный биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР № 87 901-87 от 22.07.1987 г. Он представляет собой диспергированный трансплантат, приготовленный в данном случае из сухожилий кроликов и обработанный по технологии Аллоплант®.

Все животные были разделены на две группы: контрольную (18 кроликов) и опытную (30 кроликов). С целью создания острой ишемии в миокарде левого желудочка под внутримышечным наркозом (0,1% раствор кетамина) осуществляли перевязку средней трети передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Через 5 суток под аналогичным наркозом интрамиокардиально в зону ишемии вводили суспензию БМА в физиологическом растворе. Животных выводили из опыта путем инсуффляции летальной дозы паров фторотана на 7, 14, 21, 30, 90 и 180 сутки. В контрольной группе на каждую точку исследования использовали по 3 животных, в опытной – по 5 животных.

Кусочки ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону. Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первичных антител применяли: Thy1, TGF-β1 и PCNA в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первичных антител. Площадь окрашивания и суммарную площадь просветов кровеносных сосудов производили в 20-ти полях зрения каждого образца (n=6) при увеличении ×400. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения и микроскопа AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и программой анализа изображений Axiovision (C. Zeiss, Германия).

Для электронно-микроскопического исследования вырезали кусочки тканей размером 1-2 мм³ и фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, приготовленного на какодилатном буфере (рН 7,2-7,4) с дофиксацией в 1%

растворе OsO₄ на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия) и окрашивали их раствором толуидинового синего на 2,5% растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Ультратонкие срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония).

Для обработки числовых данных использовали параметрический дисперсионный анализ по Р. Фишеру при помощи критерия Fd и непараметрический (ранговый) дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллесу с использованием для сравнения отдельных выборок рангового U-критерия.

Результаты и их обсуждение

В контрольной группе в зоне ишемии миокарда происходила гибель кардиомиоцитов и замещение погибших клеток плотной аваскулярной волокнистой соединительной тканью – рубцом (рис. 1).

После введения БМА спустя 7-14 суток в очаге инфаркта обнаруживались начальные признаки формирования грануляционной ткани с присутствием макрофагов и фибробластов, частицы биоматериала подвергались биодеградации и постепенной резорбции. Краевые зоны грануляционной ткани замещались новообразованной васкуляризированной рыхлой соединитель-

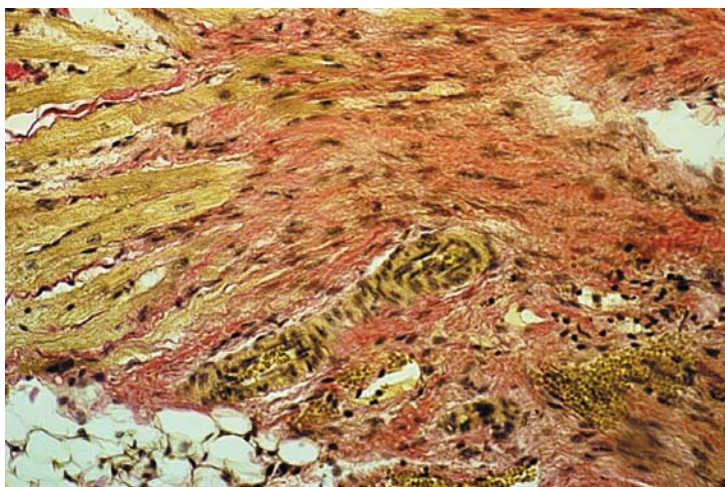


Рис. 1. Заживление миокарда кролика через 90 суток после перевязки коронарной артерии. Гипертрофия мышечных волокон вокруг рубца. Окраска по методу Ван Гизона. Ув. х400.

ной тканью. Через 21-30 суток количество частиц биоматериала значительно уменьшалось. Наряду с макрофагально-фибробластической инфильтрацией в реактивной зоне наблюдались малодифференцированные клетки Thy1,

причем локализовались они не только в регенерате, но и преимущественно возле кровеносных сосудов. В связи с этим можно предположить, что они мигрировали гематогенным путем (рис. 2). Известно, что антиген Thy1

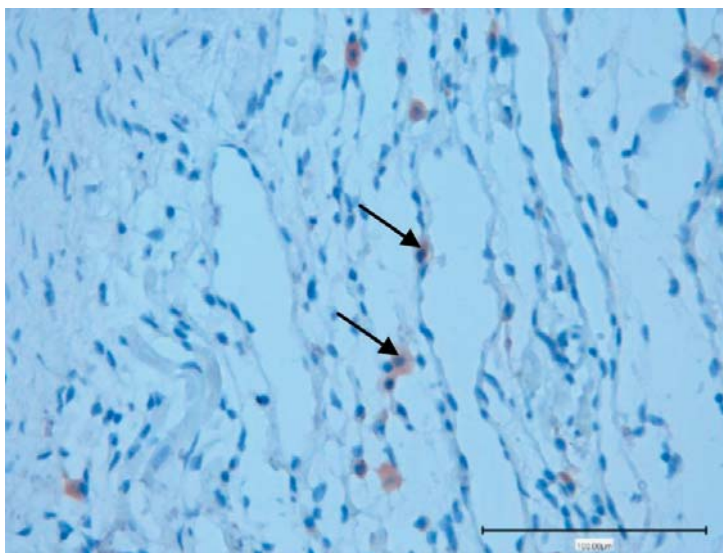


Рис. 2. Малодифференцированные клетки Thy1 (↑) в ишемически поврежденном миокарде через 14 суток после введения БМА. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления Thy1⁺ клеток с докраской гематоксилином. Ув. х400.

/ CD90 экспрессируется не только на поверхности лимфоидных клеток, но и является маркером костномозговых мезенхимных стволовых клеток [18]. Также этот белок выявлен на клетках кардиосфер наряду с c-kit клетками, являющимися прогениторными клетками кардиомиоцитов. Наличие Thy1 связывают с ангиогенезом в ишемически поврежденной ткани миокарда, источником мезенхимных стволовых клеток и кардиомиогенных клеток, способных дифференцироваться в зрелые клеточные формы [17, 19].

Известно, что продукты биодegradации БМА являются хемоаттрактантами негематопoэтических предшественников мезенхимных клеток CD45-/CD90+, что было установлено с помощью проточной цитофлюориметрии [2]. После применения БМА возле кровеносных сосудов выявлялись малодифференцированные клетки, которые гипотетически в условиях миокардиального окружения могут преобразовываться в зрелые кардиомиоциты. Миокард содержит стволовые клетки c-kit⁺, обнаруживаемые при патологических состояниях, которые обладают хемотаксисом к очагу повреждения и бывают костномозгового происхождения или резидентными [16, 25].

Анализ ультраструктуры клеток показал гетерогенность клеточных популяций в регенерате. Выявлялись клетки с признаками различной дифференциации кардиомиоцитов: от молодой малодифференцированной клетки до юного кардиомиоцита. Малодифференцированные клетки не имели какой-либо клеточной специализации. Ядра были округлой формы. В ядре выявлялся преимущественно

эухроматин. Гетерохроматин конденсировался в небольшом количестве в виде узкой полоски вдоль ядерной мембраны. Ядрышковый аппарат был не развит. Ядерно-цитоплазматическое отношение смещалось в сторону ядра. В тонком ободке цитоплазмы обнаруживались единичные митохондрии, разрозненные рибосомы, короткие каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), овальные митохондрии с параллельными кристами в просветленном матриксе (рис. 3А). Также выявлялись клетки более крупных размеров с расширенным ободком цитоплазмы, где главным морфологическим признаком являлось наличие единичных разрозненных толстых миофиламентов в присутствии электронноплотных гранул – зёрен гликогена и скоплений рибосом. На активацию белоксинтетической деятельности указывало строение ядра. Оно было крупного размера, содержало преимущественно эухроматин, гетерохроматин в виде тонкой полосы располагался маргинально. В эндоплазме наблюдались многочисленные крупные митохондрии округлой формы с четкими параллельными кристами и плотным затемненным матриксом. Перинуклеарное пространство было заполнено рибосомами и зернами гликогена. Причем гранулярный компонент преобладал над фибриллярным. Также определялись расширенные короткие каналы ГЭР, комплекс Гольджи (рис. 3Б). Можно предположить, что данные клетки находились в кардиомиобластической стадии дифференциации. Со временем клетки увеличивались в размерах. В ядре обнаруживался в основном эухроматин,

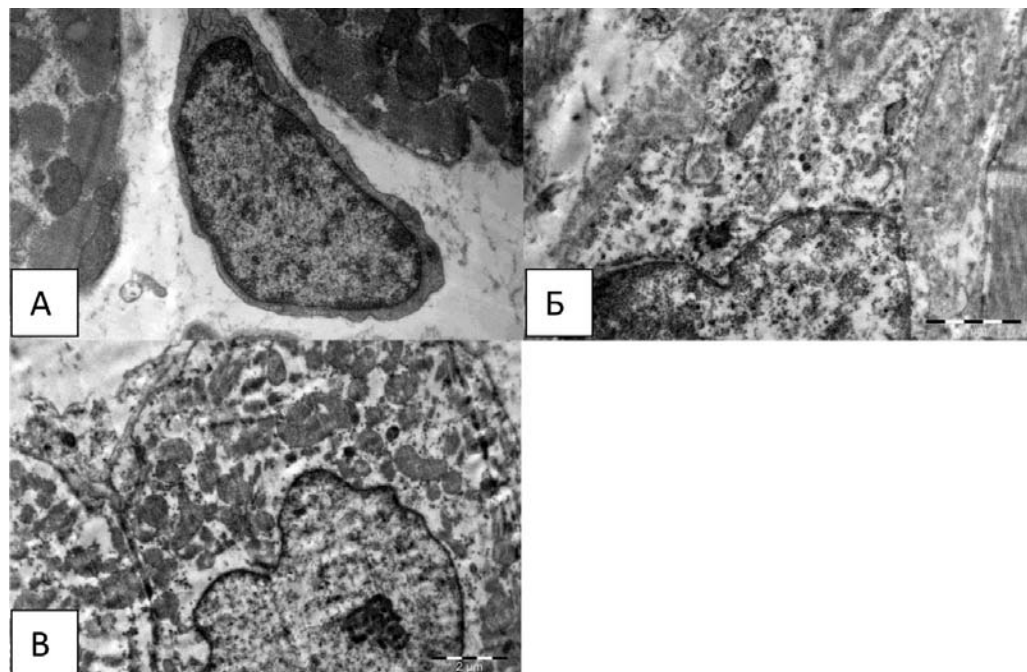


Рис. 3. Кардиомиоциты различной степени дифференцировки через 21 сутки после введения БМА. А – малодифференцированная клетка, ув. $\times 12000$; Б – миобластическая клетка, ув. $\times 12000$; В – контакт юных кардиомиоцитов, ув. $\times 8000$. Электронограммы.

определялось крупное ядрышко. В цитоплазме накапливались митохондрии, которые были хаотично распределены. Возле них обнаруживались короткие пучки миофиламентов без Z-линии, на концах которых обнаруживались скопления зёрен гликогена. После накопления определенной критической массы миофибрилл в цитоплазме выявлялись признаки слияния кардиомиоцитов с формированием вставочных дисков между собой и образованием синцития (рис. 3В). Наличие межклеточных контактов между юными кардиомиоцитами является следствием терминальной кардиомиогенной функционально-морфологической дифференциации [15].

В реактивной зоне в непосредственной близости с культей поврежденного мышечного волокна выявлялись скопления малодифференцированных миобластических клеток в виде однорядных цепочек, что напоминало «мышечные почки». Ядра данных клеток содержали эухроматин, в них хорошо определялся ядрышковый аппарат, что указывало на активную белоксинтетическую деятельность. В объемной цитоплазме прослеживались фибриллярные структуры. Интерстициальное пространство было заполнено гелеобразным аморфным веществом – вероятно, гликозаминогликанами, коллагеновых волокон обнаружено не было (рис. 4).

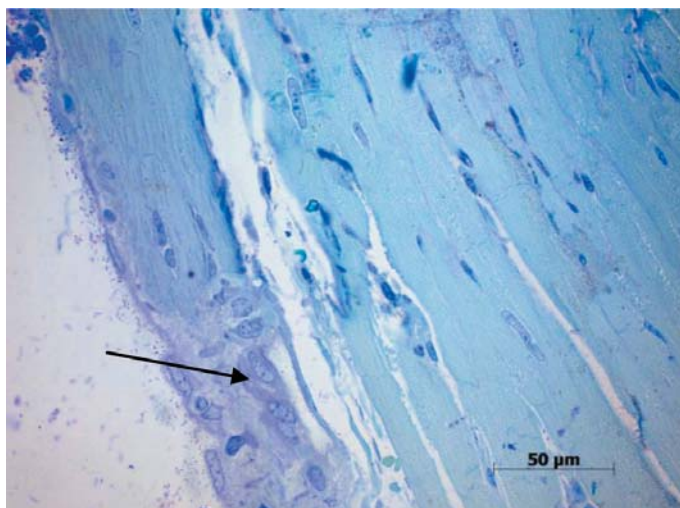


Рис. 4. «Мышечная почка» на культуре сердечного мышечного волокна (↑) через 30 суток после введения БМА. Полутонкий препарат. Окраска толуидиновым синим. Ув. x1000.

Наряду с малодифференцированными клетками нами обнаружено, что небольшие размером зрелые кардиомиоциты обладали пролиферативной активностью. Причем ядра у клеток располагались эксцентрично, рядом друг с другом в непосредственной близости – в постмитотическом состоянии (позд-

няя телофаза) и образовывали «почки роста» (рис. 5). В работе [8] также отмечали наличие подобных клеток, получивших название «малых» резидентных кардиомиоцитов. В последние годы появляется все больше сведений о том, что кардиомиоциты обладают пролиферативным потенциалом, и ими являют-

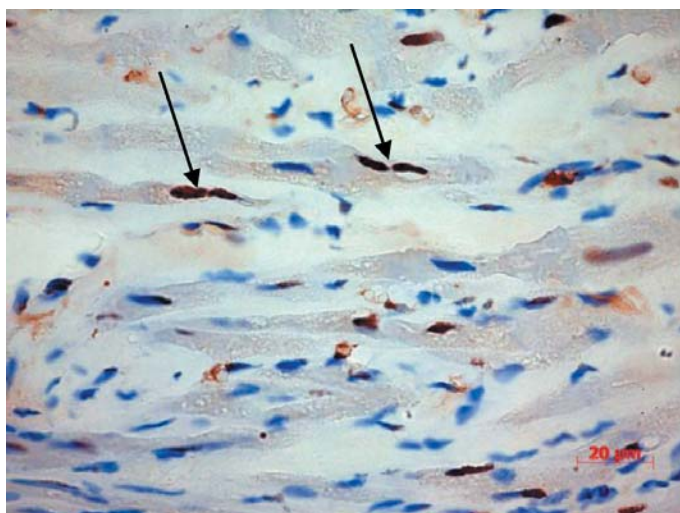


Рис. 5. Пролиферация ядер кардиомиоцитов (↑) через 30 суток после введения БМА. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления PCNA⁺ клеток с докраской гематоксилином. Ув. x400.

ся, как правило, «малые» одноядерные кардиомиоциты [4, 8, 9]. Найденные кардиомиоциты PCNA-позитивны, т.е. способны к пролиферации, и существует вероятность их участия в пополнении пула кардиомиоцитов.

В зрелых кардиомиоцитах обнаруживались признаки внутриклеточной регенерации, выражающиеся в гиперплазии цитоплазматических органелл. Вдоль сарколеммы наблюдались наплыва саркоплазмы – зоны с просветленной

цитоплазмой, заполненной рибосомами и гранулами гликогена. В ней определялись короткие фрагменты сократительных структур различной степени зрелости. Между пучками были расположены многочисленные митохондрии (рис. 6).

Спустя 90 суток в ишемизированной зоне миокарда формировался соединительнотканно-мышечный регенерат с преобладанием мышечной ткани, что значительно улучшало морфологическую картину (рис. 7).

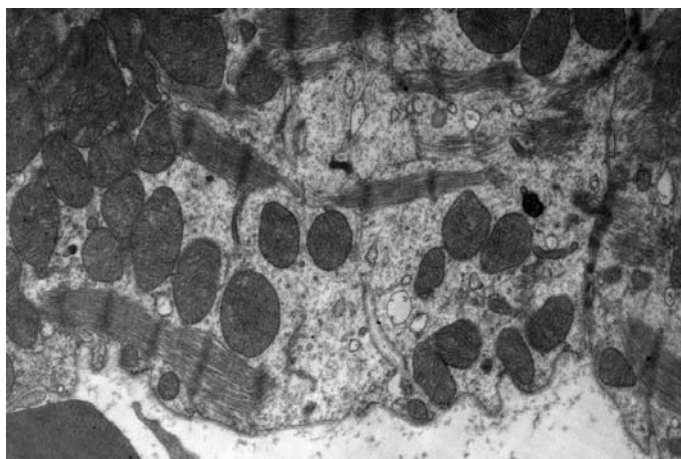


Рис. 6. Гипертрофия зрелых кардиомиоцитов через 30 суток после введения БМА. Электронограмма. Ув. x15000.

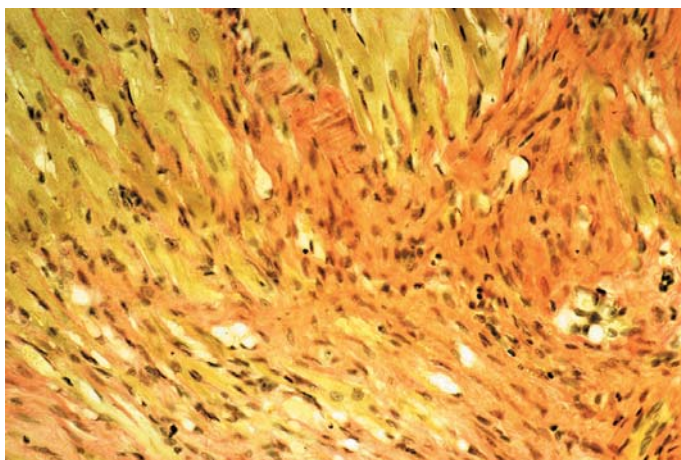


Рис. 7. Соединительнотканно-мышечный регенерат с преобладанием мышечных волокон через 90 суток после введения БМА. Окраска по методу Ван Гизона. Ув. x400.

Неравнозначный механизм заживления скелетной мышечной ткани в контрольной и опытной группах может быть обусловлен определенной цитокиновой нагрузкой клеток гистиона. Цитокин TGF-β1 оказывает противовоспалительный эффект и является промотором фиброза и иммуносупрессором, блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов. Повышенное его содержание приводит к дисрегенерации и атрофии в мышечной ткани [26]. При исследовании экспрессии в тканях TGF-β1 выявлено, что в начальные сроки наблюдения (3-е суток) площадь окрашивания в контроле составляла $16 \pm 1,15$ мкм², что почти в 8 раз больше, чем в опытной группе ($2,10 \pm 0,57$). В период 7-14 суток в контроле выявлялось нарастание экспрессии цитокина с $18,00 \pm 0,67$ мкм² до $33,00 \pm 1,05$ мкм². После чего в интервале с 21 до 60 су-

ток его количество постепенно снижалось ($30,90 \pm 1,20$ мкм²; $26,00 \pm 1,63$ мкм²; $16,20 \pm 0,92$ мкм² соответственно). В опытной группе уровень экспрессии через 7 суток составлял $2,90 \pm 0,74$ мкм², через 14 суток – $12,10 \pm 0,99$ мкм², через 21 сутки – $14,10 \pm 0,74$ мкм². В период 30-60 суток экспрессия TGF-β1 резко снижалась до $5,70 \pm 1,16$ мкм² – $3,00 \pm 0,94$ мкм² соответственно. Данные статистически значимы ($p < 0,001$). Был применен двухфакторный дисперсионный анализ, позволяющий выявить взаимодействие факторов – сравнить две группы (опытная и контрольная) во времени. Коэффициент влияния фактора (КВФ) составил 70%, коэффициент Фишера (F) – 51. Так, в контрольной группе экспрессия TGF-β1 на всех сроках наблюдения являлась высокой по сравнению с опытной группой (рис. 8),

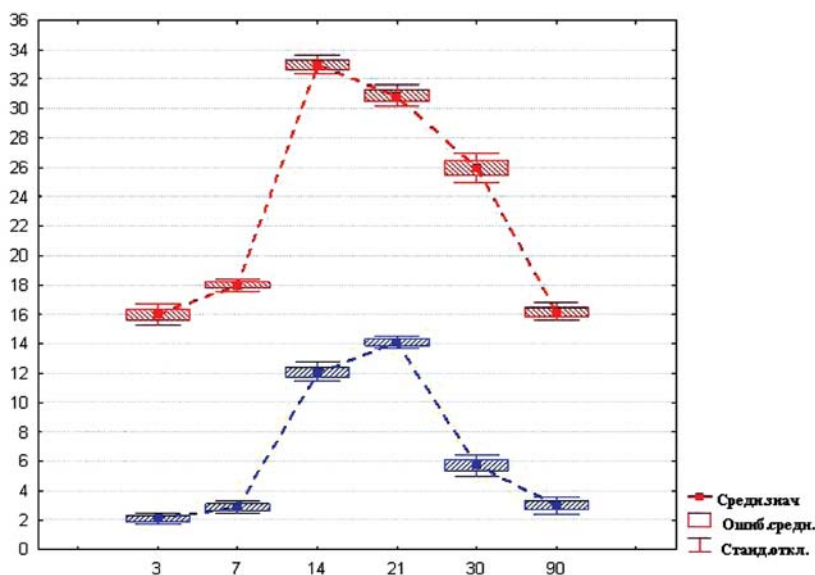


Рис. 8. Динамика экспрессии TGF-β1 в миокарде животных опытной группы (синий цвет) и контрольной группы (красный цвет). По оси абсцисс – сутки. По оси ординат – площадь (мкм²).

Фактор группирования – опыт-контроль. КВФ = 97%; ККК = 0,99; F = 8054; $p < 0,001$.

Фактор времени. КВФ = 97%; ККК = 0,98; F = 767; $p < 0,001$.

КВФ – коэффициент влияния фактора, ККК – коэффициент канонической корреляции, F – коэффициент Фишера, p – достоверность.

что стимулировало избыточное коллагенообразование и формирование рубца.

Низкий уровень TGF- β 1 в опытной группе определяет умеренное, а не избыточное коллагенообразование, что дает возможность роста и развития кардиомиоцитов. Ингибитором фиброза в данном случае выступают продукты резорбции БМА. Известно, что экстрагируемые из биоматериала Аллоплант протеогликаны тормозят пролиферацию клеток, обладающих высокой митотической активностью, в т.ч. фибробластов [5]. В составе биоматериала превалируют коллаген, протеогликаны, гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота, кератан- и дерматансульфат) [14]. Коллаген, являясь средством заместительной терапии в поврежденной ткани, ингибирует фибробластическую деятельность по типу обратной связи и участвует в торможении пролиферативной и коллагенсинтетической функции фибробластов [13]. Гликозаминогликаны, к числу которых относится и гиалуроновая кислота, регулируют в тканях ионнообменную активность, репаративные, механические свойства, процессы роста и дифференцирования клеток, участвуют в постнатальном гистогенезе [13]. Экзогенно введенная гиалуроновая кислота препятствует рубцеванию за счет супрессии факторов фиброза в клетках и снижения адгезии фибробластических клеток в ране после хирургического вмешательства [21]. Установлено, что высокомолекулярные гиалуронановые полисахариды, как молекулы пространственного наполнения и гидратации тканей, обладают ангиогенными, противовоспалительными и иммуносупрессивными свойствами [24].

Полноценность регенерата определяется не только количеством коллаге-

на, определяющего выраженность фиброза, но и степень васкуляризации. При морфометрическом анализе суммарной площади просветов капилляров (СППК) выявлено, что подавляющим оказалось влияние фактора времени: $\eta^2=49\%$; $F=23,5$; $p<0,0001$. Влияние фактора «наличия/отсутствия» БМА и совместное действие обоих факторов оказалось мало: $\eta^2=4\%$; $F=9,6$; $p<0,003$ и $\eta^2=2\%$; $F=0,97$; $p>0,43$ соответственно. Паттерн последовательных изменений СППК миокарда практически идентичен. В начальный период наблюдений (3-е суток) средняя СППК миокарда в опыте и контроле очень близка ($99,3\pm 57$ $\mu\text{м}^2$ и $82,7\pm 44$ $\mu\text{м}^2$ соответственно) и значимо не различалась ($p>0,43$). На 7-й день – и в опыте, и в контроле – среднее значение резко возрастало, достигая, соответственно, уровня $401,7\pm 274,7$ $\mu\text{м}^2$ и $267,8\pm 132,8$ $\mu\text{м}^2$. Далее – и в опыте, и в контроле – начиналась фаза спада СППК миокарда, с 30-го дня от начала эксперимента – стабилизация средних значений этого показателя на уровне $94\div 99$ $\mu\text{м}^2$ в опыте и $56\div 57$ $\mu\text{м}^2$ в контроле. В этот период (14-90 суток) различия средних значений в опыте и контроле сохранялось на статистически значимом уровне ($p<0,02\div 0,002$). Внутригрупповая вариабельность составляла 50% и более (рис. 9).

Неоангиогенез осуществлялся за счет иммиграции эндотелиальных клеток из сосудистой стенки в интерстиций миокарда, что также служит признаком формирования сосудистых почек при ангиогенезе [13]. Эндотелиоциты, в свою очередь, мигрировали в толщу поврежденной ткани, где начинали формироваться новообразованные капилляры (рис. 10).

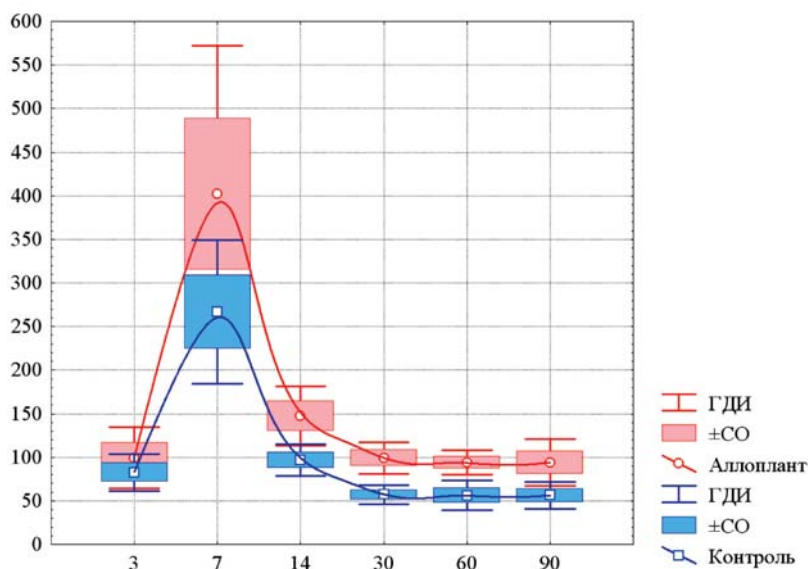


Рис. 9. Среднее значение СППК миокарда в опытной группе (красный цвет) и в контрольной (синий цвет). По оси абсцисс – сроки наблюдения в днях. По оси ординат – среднее число клеток. ГДИ – границы доверительного интервала для средних, $\pm CO$ – стандартная ошибка среднего значения. В опытной группе $\eta^2=50\%$, $F=10,5$, $p < 0,0001$; в контрольной – $\eta^2=64\%$, $F=18,6$, $p < 0,0001$.

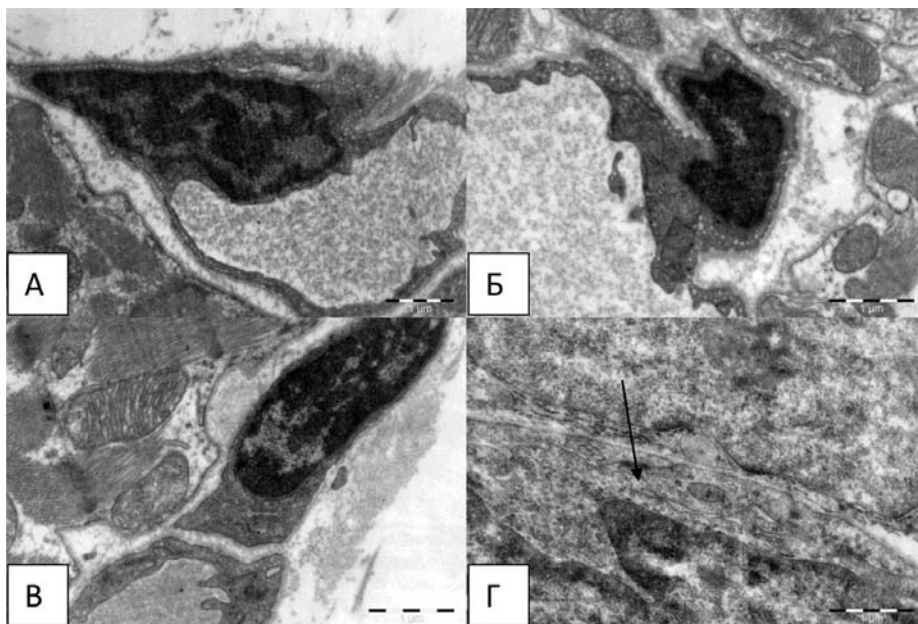


Рис. 10. Неоангиогенез в ишемически поврежденном миокарде через 21 сутки после введения БМА. Электронограммы. А, Б, В – стадии иммиграции эндотелиоцита из сосудистой стенки в интерстиций, ув. $\times 12000$; Г – канализация цитоплазмы эндотелиоцита (\uparrow), формирование капилляра, ув. $\times 17000$.

В контрольной группе на месте некротически измененных кардиомиоцитов разрасталась аваскулярная плотная соединительная ткань – рубец. В опытной группе продукты резорбции аллогенного биоматериала способствовали улучшению структуры миокарда в процессе постишемического восстановления. Происходило формирование соединительнотканно-мышечного регенерата, где стромальный компонент состоял из рыхлой соединительной ткани, а в межволоконные пространства мигрировали и прорастали мышечные клетки [6].

Оксигенация ишемически поврежденной ткани миокарда осуществляется за счет адекватного неоангиогенеза. Нами выявлено, что уровень васкуляризации регенерата после применения БМА превосходит контрольные значения. Неоангиогенез стал возможен за счет гиперплазии самих эндотелиоцитов, их миграции в интерстициальное пространство и формирования почк роста. Вероятно, это связано с ангиогенной стимуляцией гликозаминогликанами [23]. Редукция же гемокapилляров в контрольной группе животных может быть вызвана стремительным и избыточным накоплением коллагена.

Заключение

Таким образом, после интрамиокардиального применения аллогенного биоматериала нами обнаружено улучшение структуры ишемически поврежденного миокарда за счет комплекса факторов: стимуляция ангиогенеза, миграция стволовых клеток из кровеносного русла, дифференциация кардиомиогенных клеток, наличие «малых» резидентных пролиферативно активных кардиомиоцитов, внутриклеточная регенерация

зрелых кардиомиоцитов – гипертрофия и кариокинез кардиомиоцитов. Возможное участие перечисленных клеток в ремоделировании миокарда осуществляется на фоне ингибирования фиброза, которое реализуется за счет действия продуктов резорбции аллогенного биоматериала.

Список литературы

1. *Деев Р.В.* Отечественный опыт изучения эффективности метода «клеточной кардиомиопластики» в эксперименте // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005. № 1. Т. 1. С. 17-18.
2. *Курчатова Н.Н., Сибиряк С.В., Хасанов Р.А. и др.* Миграция мезенхимальных стволовых клеток в биоматериалы ALLOPLANT: предварительные данные // Иммунология Урала. 2005. № 1. Т. 4. С. 17-18.
3. *Лебедева А.И.* Аллогенный губчатый биоматериал – ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани // Российский биотерапевтический журнал. 2014. № 4. Т. 13. С. 37-44.
4. *Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Клиникова М.Г. и др.* Пролиферативная активность кардиомиоцитов при хронической гиперхолестеринемии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013. № 4. С. 231-237.
5. *Мулдашев Э.Р., Уилен Т.Дж., Курчатова Н.Н. и др.* Влияние экстракта трансплантата для пластики века серии Alloplant на синтез ДНК в культуре клеток // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1994. № 1. С. 75-79.
6. *Мусина Л.А., Андриевских С.И., Муслимов С.А. и др.* Морфологические изменения, выявленные после введения аллогенного биоматериала в ишемически поврежденный миокард // Морфологические ведомости. 2009. № 3-4. С. 62-65.
7. *Непомнящих Л.М.* Патологическая анатомия и ультраструктура сердца: Комплексное морфологическое исследование общепатологического процесса в миокарде. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд.-ие. 1981. С. 324.
8. *Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Ларионов П.М., Шурыгин М.Г.* Регенерация миокарда: Пролиферативный потенциал кардиомиоцитов и индукция кардиомиогенеза при альтернативной и пластической недостаточности сердца // Вестник РАМН. 2010. № 5. С. 3-11.

9. Павлова С.В., Перовский П.П., Чепелева Е.В. и др. Характеристика кардиальных культур клеток, полученных из экспланта сердечной мышцы человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013. № 3. С. 132-140.
10. Рубина К.А., Мелихова В.С., Парфенова Е.В. Резидентные клетки – предшественники в сердце и регенерация миокарда // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. № 1. Т. 2. С. 29-35.
11. Румянцев П.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. - Л.: Наука. 1982. С. 283.
12. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
13. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. - М.: Медицина. 1981. 312 с.
14. Хасанов Р.А., Мулдашев Э.Р., Булатов Р.Т. и др. Экспериментально-морфологическое исследование гомогенизированных аллотрансплантатов // Новые технологии микрохирургии глаза. – М. 1998. С. 64-66.
15. Хлопонин П.А. Малодифференцированные кардиомиоциты в нормальном и репаративном кардиомиогенезе. Вопросы морфологии XXI века. Выпуск 3. – СПб: Изд-во ДЕАН. 2012. С. 88-94.
16. Anversa P., Leri A., Kajstura J. Cardiac Regeneration // J. Am. Coll. Cardiol. 2006. Vol. 47. P. 1769-1776.
17. Cheng K., Ibrahim A., Hensley M.T., Shen D., Sun B., Middleton R., Liu W., Smith R.R., Marbán E. Relative roles of CD90 and c-kit to the regenerative efficacy of cardiosphere-derived cells in humans and in a mouse model of myocardial infarction // J. Am. Heart Assoc. 2014. Vol. 9. No. 3. P. 5.
18. Craig W., Kay R., Cutler R.L., Lansdorp P.M. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells // J. Exp. Med. 1993. Vol. 1. No. 177(5). P. 1331-1342.
19. Gago-Lopez N., Awaji O., Zhang Y., Ko C., Nsair A., Liem D., Stempien-Otero A., MacLellan W.R. THY-1 receptor expression differentiates cardiosphere-derived cells with divergent cardiogenic differentiation potential // Stem Cell Reports. 2014. Vol. 18. No. 2(5). P. 576-591.
20. Hierlihy A.M., Seale P., Lobe C.G., et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population // FEBS Lett. 2002. Vol. 530. P. 239-243.
21. Jin S.P., Jae H.L., Chung S.H., Chuke D.W., Gou Y.K. Clinics in orthopedic surgery. 2011. Vol. 3. No. 4. P. 315-324.
22. Muldashev E.R., Muslimov S.A., Musina L.A., et al. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials // Cell Tissue Bank. 2005. Vol. 6. No. 2. P. 99-107.
23. Park J.S., Lee J.H., Han Ch.S., et al. Effect of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose solution on perineural scar formation after sciatic nerve repair in rats // Clinics in orthopedic surgery. 2011. No. 3. P. 315-324.
24. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? // Glycobiology. 2003. Vol. 13. No. 12. P. 105-115.
25. Taghavi Sh., George J.C. Homing of stem cells to ischemic myocardium // Am. J. Transl. Res. 2013. Vol. 5. No. 4. P. 404-411.
26. Yoshimura A., Muto G. TGF- β function in immune suppression // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2011. Vol. 350. P. 127-147.

Morphological aspects of regenerative potential of myocardial ischemic injury after allogenic biomaterial applications

A.I. Lebedeva, S.A. Muslimov, L.A. Musina

Objective – to determine the main mechanisms for the regeneration of myocardial ischemic damage after using allogenic biomaterial. The rabbits were performed ligation of the anterior descending branch of the left coronary artery. After 5 days in the intramyocardial ischemia zone injected allogenic biomaterial, resulting formed connective-muscular reclaimed, with a predominance of muscle tissue. It was found that the products of biodegradation of the biomaterial profibrogenic suppress the activity of the cells, stimulate angiogenesis and regenerative capacities of the myocardium. Cardiac myoprogenitor cells differentiated into mature cardiomyocytes.

Kew words: allogenic biomaterial, ischemic myocardium, cardiomyocyte, regeneration.

Биоматериал Аллоплант при регенерации миометрия рога матки экспериментальных животных – стимулятор макрофагов мезенхимного происхождения

А.И. Лебедева

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

Контактная информация: к.б.н. Лебедева Анна Ивановна, Jeol02@mail.ru

В дефект миометрия рога матки крысы был имплантирован биоматериал Аллоплант (БМА). В результате формировался полноценный структурный регенерат, состоящий из кластеров лейомиоцитов и прослоек волокнистой соединительной ткани. Регенерация происходила с привлечением макрофагов М1 мезенхимного происхождения, содержащих гликозаминогликаны. В контрольной группе в зоне дефекта без применения БМА выявлялся дефицит макрофагов, происходило формирование грубого рубца. Морфологическое исследование проводили с применением гистологических (окраска гематоксилином и эозином, по Ван Гизону), гистохимических (окраска по Хейлу) и иммуногистохимических (vimentin, CD68, IL1, FGF1, TGFβ1) методов.

Ключевые слова: биоматериал Аллоплант, макрофаги, миометрий рога матки, регенерация.

Введение

В ранее опубликованных статьях были освещены аспекты регенерации миометрия рога матки самок кроликов, индуцированных биоматериалом Аллоплант (БМА) [5, 4]. Выявлено, что после имплантации БМА происходила резорбция частиц биоматериала и замещение их рыхлой соединительной тканью с высокой степенью васкуляризации. Происходила пролиферация малых гладкомышечных клеток – лейомиоцитов. В миометрии экспериментальной группы доля паренхимы доминировала над стромальным компонентом. В контрольной группе животных без применения биоматериала на фоне дефицита макрофагов наблюдалась активация фибробластических клеток, накопление коллагеновых волокон и формирование грубого рубца.

БМА стимулирует миграцию макрофагов М1 системы активации в соединительной и скелетной мышечной ткани, что способствует эффективному и полноценному очищению раны от раневого дэбриса, ингибированию фиброза и приводит к адекватной полноценной регенерации [12, 7, 6]. Известно, что макрофаги являются ключевым звеном, определяющим течение и исход регенерации [13].

Целью данного исследования явилось выявление морфофункциональных характеристик и цитокинового профиля макрофагов миометрия рога матки экспериментальных животных. Т.к. данное исследование связано с использованием ряда моноклональных антител, имеющих видоспецифичный резидуальный аффинитет к антигенам крыс, были проведены аналогичные эксперименты на самках крыс.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 25-ти самках крыс Wistar массой 200-250 г. Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ РФ от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». Животные находились в стационарных клетках индивидуально. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорацционный ПЗК-92. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводную очищенную воду всем животным давали без ограничений в поилках.

БМА разработан в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России» (руководитель – проф. Э.Р. Мулдашев). Указанный биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР № 87 901-87 от 22.07.1987 г. Он представляет собой трансплантат с объемно-волокнистой структурой, приготовленный в данном случае из сухожилий крыс и обработанный по технологии Аллоплант®.

Под внутримышечным наркозом с применением раствора кетамина продольный разрез маточного рога производили фокусированным лучом CO₂-лазера в режиме мощности 40-60 Вт «коагуляция» с помощью установки Coherent 3000L (Coherent Inc., США). В первой серии экспериментов у 10-ти животных (контрольная группа) делали разрез лазером, дефект ушивали викрилом. У 15-ти крыс (опытная группа) делали разрез лазером и заполняли дефект стенки маточного рога алло-

генным биоматериалом для замещения объемных дефектов. Переднюю брюшную стенку ушивали непрерывным двухслойным викриловым швом 6/0 (Ethicon, США). Животных выводили из опыта через 7, 14, 30, 60, 120 суток после операции путем инсуффляции летальной дозы паров фторотана. Гистологические срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону. Гистохимические исследования для определения суммарной фракции кислых гликозаминогликанов проводили по методу Хейла [2].

Иммуногистохимические исследования проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 4-5 мкм с минимальной площадью 1 см². Для этого аутопсийный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезжовивали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия). Использовали непрямой стрептавидин-биотинный метод с применением моноклональных антител к PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) (клон PC 10, 1:300), vimentin (клон C 20, 1:300), CD 68 (клон ED 1, 1:300), TGFβ1 (трансформирующий фактор роста бетта) (клон ТВ 21, 1:300), FGF 1 (фактор роста фибробластов) (клон C 19, 1: 300) (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотинную систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Микроскопические исследования проводились с использованием све-

тового микроскопа со специализированным программным обеспечением управления настройками и захватом изображения Leica DMD 108 (Германия).

Результаты исследований

После имплантации БМА в мышечный слой рога матки в начальные сроки (7 суток) наблюдалась умеренная макрофагально-фибробластическая инфильтрация частиц биоматериала клетками, за счет которых происходили изменения тинкториальных свойств. Частицы набухали, проявляли признаки пикринофилии и резорбировались клетками макрофагального ряда. Среди инфильтрирующих клеток выявлялись макрофаги, которые постепенно мигрировали к фрагментам биоматериала. Макрофаги были овальной или вытянутой формы с округлым ядром, располо-

женным центрально. Цитоплазма в виде тонкого ободка располагалась вокруг ядра и образовывала короткие выросты (рис. 1).

Максимальная численность клеток нарастала в период 14-30 суток. В данное время частицы трансплантата практически не определялись. В зоне операции обнаруживалось массивное скопление макрофагальных клеток. Макрофаги были увеличены в размере. В широком ободке цитоплазмы прослеживались разнокалиберные фагоцитарные вакуоли, которые придавали клетке пенистый вид. Тем не менее, признаков гранулематозного воспаления, выражающегося в наличии гигантоклеточных форм макрофагов, не было. Окружающая ткань была представлена тяжами гладкомышечных клеток одновекторного направления. Признаков грубого рубцевания не наблюдалось (рис. 2а).

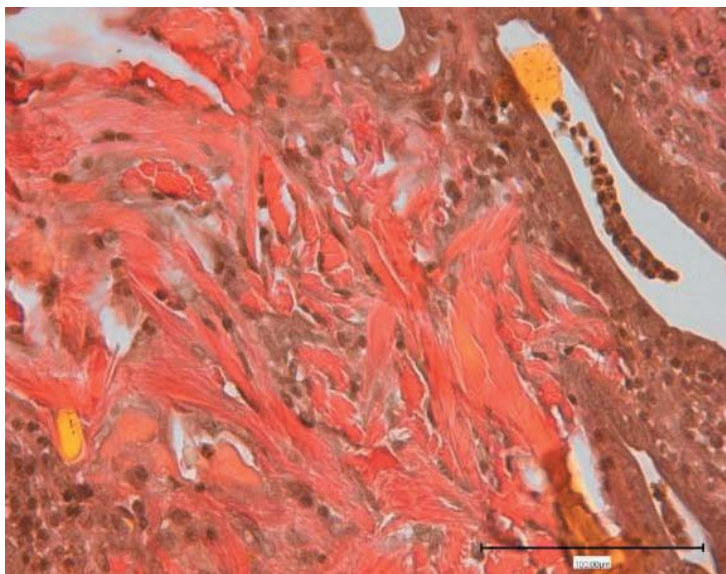


Рис. 1. Умеренная инфильтрация макрофагами, набухание и лизис частиц БМА в миометрии рога матки крысы через 7 суток. Окраска по Ван Гизону.

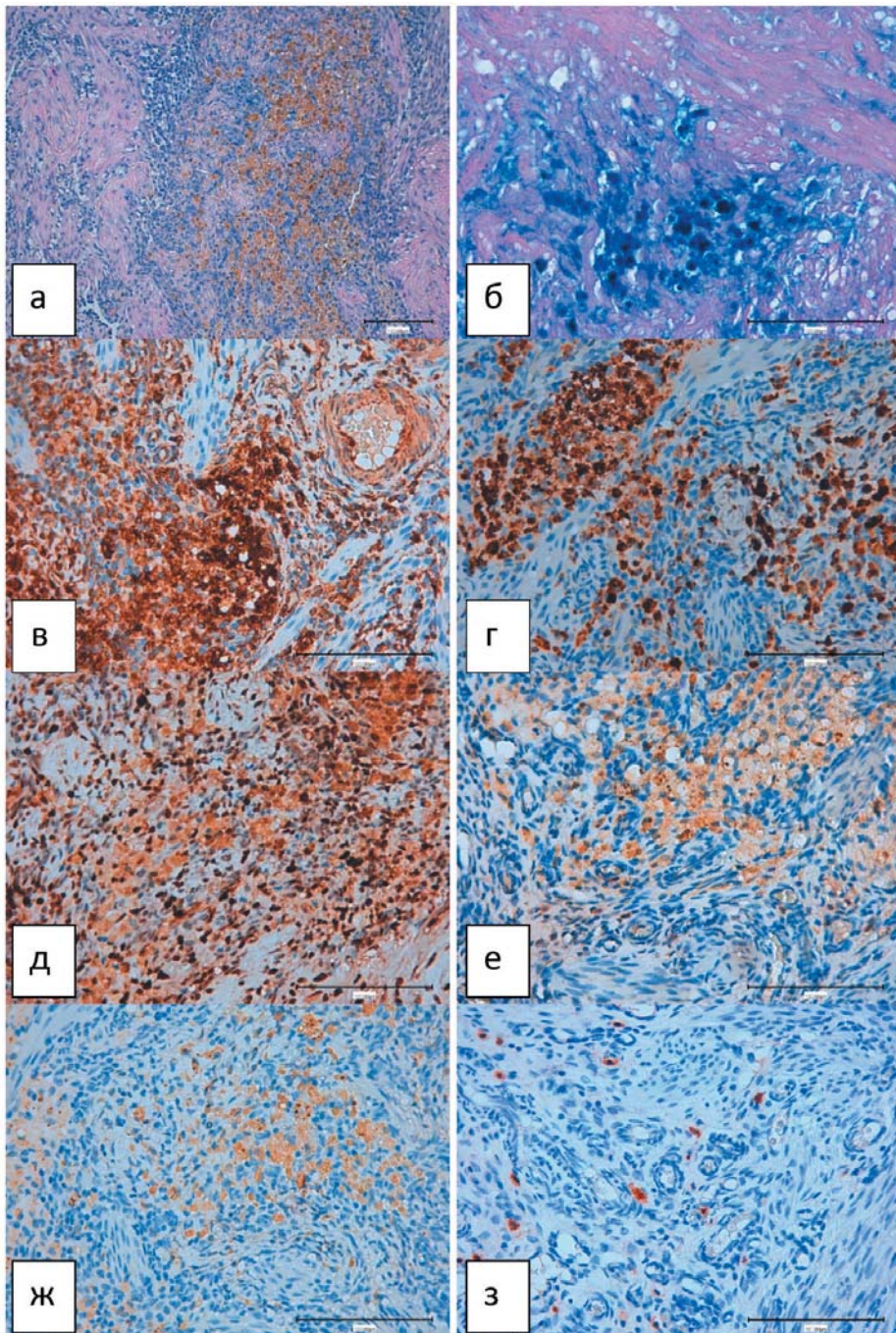


Рис. 2. Серийные срезы ткани рога матки крысы через 30 суток после введения БМА. А – интенсивная макрофагальная реакция, окраска гематоксилином и эозином; Б – гликозаминогликаны в цитоплазме макрофагов, окраска по Хейлу с докраской эозином; В – vimentin⁺; Г – CD 68⁺; Д – PCNA⁺; Е – FGF1; Ж – TGFβ1; З – IL1⁺ непрямым иммунопероксидазным методом выявления антител с докраской гематоксилином.

В начальные сроки эксперимента (7 суток) макрофагальные клетки при выявлении PCNA антигена не окрашивались, спустя 30 суток макрофаги были PCNA⁺ позитивны (рис. 2д). На серийных срезах аутопсийного материала выявлялись следующие фенотипические характеристики: в цитоплазме макрофагов определялись гликозаминогликаны (рис. 2б), определялся белок промежуточных филаментов vimentin (рис. 2в), противовоспалительные цитокины – FGF1, TGFβ1 – отсутствовали, либо реакция была слабо выражена (рис. 2е, ж), провоспалительные цитокины IL1, тем не менее, выявлялись (рис. 2з). Все макрофаги были CD 68-позитивны (рис. 2г).

Спустя 60 суток в миометрии рога матки крыс происходила полноценная

регенерация ткани. Она была представлена разновекторными кластерами лейомиоцитов в окружении тонких соединительнотканых прослоек. Частиц биоматериала и скоплений макрофагов в данный период не обнаруживалось (рис. 3).

В контрольной группе животных без использования биоматериала в процессе заживления дефектов наблюдался дефицит CD 68⁺ клеток и признаки их функциональной незрелости. Количество TGFβ1⁺ макрофагов (M2) значительно превосходило долю макрофагов с провоспалительной направленностью, в результате чего происходило формирование грубого рубца с дальнейшим перерождением в жировую ткань. Vimentin⁺ и Хейл⁺ макрофагов в очаге заживления не зафиксировано.

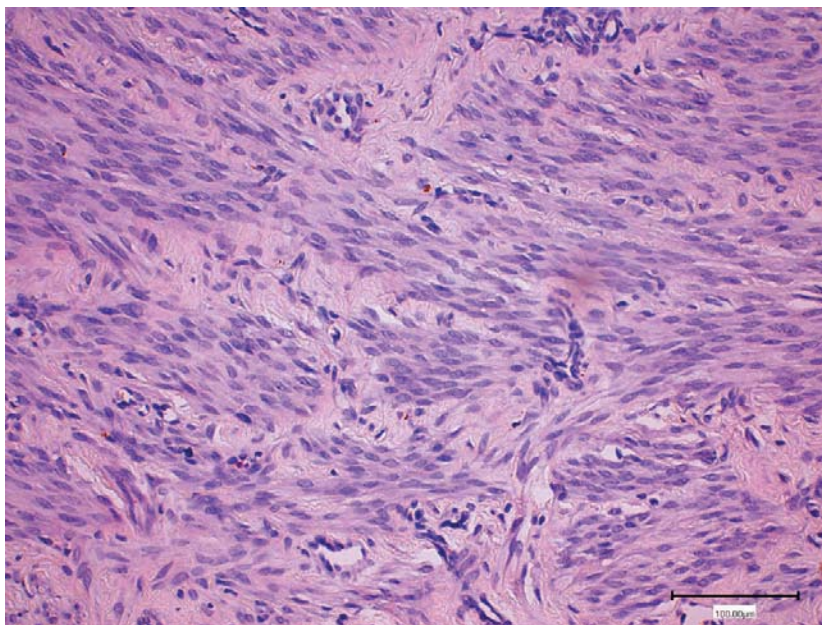


Рис. 3. Миометрий рога матки крысы после имплантации БМА через 60 суток. Окраска гематоксилином и эозином.

Обсуждение результатов

Известно, что макрофаги являются гетероморфной клеточной популяцией. Они могут проявлять как секреторную активность, так и фагоцитарную, выраженную в той или иной степени. В зависимости от условий микроокружения макрофаги проявляют цитокиновую антагонистическую полярность M1 и M2. Взаимодействие и выраженность цитокиновых фаз определяет течение и исход патологического процесса [19].

При регенерации миометрия рога матки крыс с использованием БМА происходила усиленная миграция макрофагов CD68⁺, которые становились доминирующими клетками гистиона в пролиферативной стадии воспаления. Макрофаги CD68⁺ проявляют яркое интенсивное окрашивание, что свидетельствует о наличии большого количества микросиалина. Микросиалин – высокогликозилированный трансмембранный гликопротеин члена семейства LAMP (лизосом-ассоциированных мембранных протеинов). Он локализован преимущественно в мембране поздних эндосом [18]. Кроме того, показано, что данная молекула процессирует антиген путем постепенного ферментного расщепления фагоцитируемых клеткой объектов [17]. Это свидетельствует об активной фагоцитарной деятельности клеток и полноценном очищении раны от раневого детрита и самого биоматериала, который к 30-ти суткам полностью резорбируется.

Классическое представление о происхождении макрофагов – это происхождение из костномозговых предшественников [13]. Однако в опытной группе нами были зафиксированы

vimentin⁺ позитивные макрофаги, содержащие цитоплазматические белки промежуточных филаментов, характерные для клеток мезенхимального происхождения. Данные макрофаги имели Хейл-положительную окраску, т.е. секретировали гликозаминогликаны, которые являются компонентом межклеточного матрикса. Признано, что за их выработку ответственны, как правило, клетки фибробластического ряда [13].

Макрофаги мезенхимного происхождения широко распространены в тканях различных органов. Так, наряду с костномозговыми макрофагами, в головном мозге млекопитающих определяются микроглиальные клетки, являющиеся производными желточного мешка [16]. В стекловидном теле гиллоциты, помимо фагоцитарной функции в патологических условиях, также способны к секреции компонентов межклеточного матрикса [1, 20]. Известно, что плацентарные макрофаги (клетки Кашенко-Гофбауэра) происходят из мезенхимальных стволовых клеток внезародышевой мезенхимы до начала циркуляции моноцитов [8]. Локализуются они в ворсинках хориона. Стромальные плацентарные макрофаги возникают из мезенхимы одновременно с местным ангиогенезом и являются самовозобновляющейся митотически активной популяцией клеток, независимой от эмбриональных моноцитов. Характерной чертой данных клеток является наличие многочисленных крупных вакуолей, содержащих гликозаминогликаны [9, 15]. Клетки Кашенко-Гофбауэра, обладая фагоцитарной деятельностью, участвуют во многих процессах ре-

моделяции ворсинок хориона – ткани, представленной рыхлой соединительной тканью с большим содержанием гликозаминогликанов, заполняющих интерцеллюлярное пространство [8].

Ранее в наших работах отмечались «матриксформирующие» макрофаги, обнаруженные при имплантации БМА в соединительной ткани и имеющие морфологические характеристики подобные таковым плацентарных макрофагов [11]. Предположение о причислении vimentin⁺ макрофагов к категории клеток Кашенко-Гоффбауэра закрепляется фактом выявления в их цитоплазме большого количества гликозаминогликанов, интенсивно окрашивающихся в синий цвет при проведении гистохимической реакции по методу Хейла. Полное раскрытие механизмов действия Vimentin⁺/Хейл⁺/CD68⁺ макрофагов после применения аллогенных биоматериалов требует дополнительных исследований. Можно предположить, что их наличие в зоне регенерации связано с синтезом углеводного компонента внеклеточного матрикса, определяющего зрелость коллагеновых волокон соединительнотканых прослоек, создание гомеостаза в очаге замещения реактивной зоны при адекватной полноценной регенерации мышечных тканей, и играть структурно-информативную роль для клеточных коопераций.

Т.к. в начальные сроки эксперимента PCNA⁺ макрофаги не выявлялись, следовательно, на этой стадии эксперимента в зоне имплантации БМА накопление макрофагов происходило за счет миграции резидентов и костномозговых предшественников, а в более отдаленные сроки популяция кле-

ток поддерживалась за счет деления vimentin⁺ макрофагов. Известно, что протеогликаны, высвобождающиеся при деградации и лизисе БМА, являются хемоаттрактантами макрофагальных клеток [10]. В случае, когда резервные клеточные возможности истощаются, или их недостаточно для полноценной утилизации биоматериала, в зону поражения рекрутируются дополнительные источники.

Наши исследования показали, что окончательный итог регенерации гладкой мышечной ткани зависит от фенотипа макрофагов и их секреторной активности, которая носит дуалистический характер. Заживление дефекта рога матки с использованием аллогенного биоматериала может быть обусловлено низкой степенью коллагеногенеза, регуляция которого осуществляется в т.ч. макрофагами [3]. Так, антигены FGF1 и TGFβ1 в макрофагах миометрия практически не определялись или их количество было минимальным. Классически активированные макрофаги, содержащие провоспалительные монокины (IL1), подавляли экспрессию противовоспалительных, т.к. они являются антагонистами по отношению друг к другу [14]. Это обуславливало полноценный фагоцитоз самого биоматериала и раневого детрита, обладающего антигенностью, и снижение скорости коллагеногенеза.

Заключение

В процессе регенерации мышечного слоя рога матки, индуцированного аллогенным биоматериалом, наряду с костномозговыми макрофагами участвуют мезенхимные аналоги с активной фагоцитарной функцией и с провоспалительным цитокиновым спектром M1.

Список литературы

1. **Вит В.В.** Строение зрительной системы человека: уч. пособ. - Одесса: Астропринт. 2010. 220 с.
2. **Кононский А.И.** Гистохимия. - Киев: «Вища школа». 1976. С. 146-147.
3. **Лебедева А.И.** Аллогенный губчатый биоматериал – ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани // Российский биотерапевтический журнал. 2014. № 4. Т. 13. С. 37-44.
4. **Лебедева А.И.** Посттравматический гистогенез миометрия рога матки кролика, индуцированный аллогенным биоматериалом // Технологии живых систем. 2015. № 1. С. 34-40.
5. **Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А.** Регенерация гладкой мышечной ткани рога матки кролика после разреза лучом лазера и применения аллогенного биоматериала // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2013. № 4. Т. 28. С. 41-45.
6. **Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Гареев Е.М.** Роль резидентных макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной биоматериалом Аллоплант // Биомедицина. 2014. № 2. С. 43-50.
7. **Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Щербаков Д.А.** Изучение активности макрофагов и их цитокинового спектра при регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной аллогенным биоматериалом // Российский иммунологический журнал. 2013. № 2-3. Т. 7(16). С. 305.
8. **Милованов А.П.** Патология системы мать-плацента-плод: рук-во для врачей. – М.: Медицина. 1999. 448 с.
9. **Милованов А.П., Шатилова И.Г., Кадыров М.** Гистофизиология плацентарно-маточной области // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. 1997. № 2. С. 38-44.
10. **Муслимов С.А.** Морфологические аспекты регенеративной хирургии - Уфа: Башкортостан -.168 с., 2000.
11. **Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Волгарева Е.А.** Ультроструктура макрофагов, выявляемых при имплантации аллогенного биоматериала Аллоплант // Морфология. 2006. № 1. С. 53-56.
12. **Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Зыков О.В.** Роль макрофагов в регенерации соединительной ткани при имплантации биоматериалов // Здравоохранение Башкортостана. Актуальные вопросы патологии. 2004. № 4. С. 146-149.
13. **Серов В.В., Шехтер А.Б.** Соединительная ткань. - М.: Медицина. 1981. 312 с.
14. **Abraham D.J., Xu S., Black C.M., et al.** Tumor necrosis factor α -suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor- β in normal and scleroderma fibroblasts // J. Biol. chem. 2000. Vol. 275. Is. 20. P. 15220-15225.
15. **Castelluci M., Celona A., Bartels H., et al.** Mitosis of the Hofbauer cells: possible implications for a fetal macrophage // Placenta. 1987. Vol. 8. No. 1. P. 65-76.
16. **Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M.F., Conway S.J., Ng L.G., Stanley E.R., Samokhvalov I.M., Merad M.** Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages // Science. 2010. No. 5. Vol. 330(6005). P. 841-845. doi: 10.1126/science.1194637.
17. **Holness C.L., da Silva R.P., Fawcett J., Gordon S., Simmons D.L.** Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/Igp family // J. Biol. chem. 1993. Vol. 268. P. 9661-9666.
18. **Linehan S.A.** The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs // BMC Immunol. 2005. Vol. 6. P. 1471-1477.
19. **Mantovani A., Sica A., Locati M.** Macrophage polarization comes of age // OJRM. 2005. Vol. 23. Is. 4. P. 344-346. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.001.
20. **Yamada H., Obata H., Kaji Y., Yamashita H.** Expression of transforming growth factor superfamily receptors in developing rat eyes // Jpn. J. Ophthalmol. 1999. No. 43. P. 290-294.

Alloplant biomaterial when used in myometrium regeneration of the experimental animal uterine horn is a macrophage stimulator of the mesenchymal origin

A.I. Lebedeva

Alloplant biomaterial (ABM) was implanted into the myometrium defect of the rat's uterine horn. As a result of that procedure full-blown structural regenerate consisting of leiomyocyte clusters and interlayers of the fibrous connective tissue was being formed. Regeneration invoking M 1 macrophages of the mesenchymal origin containing glycosaminoglycanes was taking place. In the control group there was revealed a deficit of macrophages with the formation of the rough scar in the defect zone when ABM hadn't been used. The morphological investigation was carried out with the use of histological (hematoxylin and eosin stain as per van Gieson), histochemical (Hale's stain) and immunohistochemical (vimentin, CD68, IL1, FGF1, TGF β 1) methods.

Key words: Alloplant biomaterial, macrophages, myometrium uterine horn, regeneration.

Влияние колистина на электрическую активность тощей кишки и видовой состав микрофлоры кишечника

Н.С. Тропская, И.Г. Шашкова, Т.В. Черненькая, Т.С. Попова

ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента Здравоохранения г. Москвы», Москва

Контактная информация: Тропская Наталья Сергеевна, ntropskaya@mail.ru

Исследовано влияние колистина на электрическую активность тонкой кишки и видовой состав микрофлоры кишечника. Электрическую активность регистрировали с имплантированных электродов в мышечный слой тонкой кишки крыс. Показано, что внутрижелудочное введение колистина в течение 7 суток не приводило к нарушению генерации мигрирующего миоэлектрического комплекса тощей кишки, что сопровождалось незначительными изменениями ее микрофлоры с выраженными изменениями количественного состава микрофлоры слепой кишки.

Ключевые слова: кишечная микрофлора, колистин, мигрирующий миоэлектрический комплекс, тонкая кишка.

Введение

В последнее время в литературе уделяется большое внимание взаимосвязи микрофлоры и функционального состояния кишечника [1, 3, 14]. Хорошо известно, что применение антибиотиков изменяет баланс микрофлоры [2, 4]. В экспериментальном исследовании при изучении влияния антибиотиков различного спектра действия (бацитрацин, интрамицин, колистин) на микрофлору кишечника цыплят, было показано, что при краткосрочном введении антибиотиков происходит нарушение баланса кишечной микрофлоры, сохраняющееся через 7 дней после их отмены. Кроме того, характер изменения микрофлоры кишечника зависит от спектра действия антибиотика [13]. К антибиотикам узкого спектра действия относится колистин. Он является поверхностным биологически активным веществом, которое взаи-

модельствует с клеточными мембранами грамотрицательных бактерий, в результате чего меняется их структура и функция, что ведет к гибели бактериальной клетки [6]. В работах, посвященных колистину, в основном рассматривается его эффективность по отношению к грамотрицательным патогенам, токсичность, схема дозирования и сравнение с другими препаратами [8, 12]. Так, авторы работы [7] отмечают увеличение резистентности бактерий к колистину в связи с его широким применением для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Большинство работ касается нефротоксичности колистина при внутривенном введении. Показано, что нефротоксичность наступает при очень высоких дозах, которые не рекомендованы на сегодняшний день [9, 10, 11, 15]. Нейро- и нефротоксические эффекты исчезают после прекра-

щения введения или при снижении дозы [6]. В работе [5] также подчеркивается, что все изменения в организме лабораторных животных после введения тетраголда (комплексный препарат, содержащий колистин и сульфаниламиды), вызванные 20-дневным введением в высоких дозах, носили обратимый характер. Несмотря на то, что изучение взаимосвязи между микробиотой и моторикой кишечника представляет большой интерес, влияние антибиотиков на моторную функцию кишечника мало изучено.

Цель исследования – изучить влияние колистина на параметры мигрирующего миоэлектрического комплекса тонкой кишки и микробиоту кишечника крыс.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 12-ти крысах-самцах популяции линий Wistar массой 360-460 г. Протокол исследований был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Контрольную группу составили 7 здоровых животных. В опытной группе (n=5) для предварительной оперативной подготовки использовали раствор кетамина, который вводили внутривентриально из расчета 0,3 мл на 100 г массы тела. Во время операции проводили срединную лапаротомию, вживляли зонд в антральную часть желудка и три игольчатых электрода в стенку начальной части тощей кишки (5, 10 и 15 см дистальнее связки Трейтца). После фиксации зонд и электроды проводили через мягкие ткани брюшной стенки и тазовой области и затем с помощью специального инструмента протаскивали под кожей хвоста и

выводили наружу. После чего животные помещались в металлические индивидуальные клетки.

Все животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20-24°C и влажности 45-65%, с режимом освещенности с 8⁰⁰ до 20⁰⁰ – свет, с 20⁰⁰ до 8⁰⁰ – сумеречное освещение.

Эксперименты выполняли после того, как при регистрации электрической активности наблюдалось наличие мигрирующего миоэлектрического комплекса (ММК) – маркера электрической активности тонкой кишки в норме. В качестве антибиотика для селективной деконтаминации грамотрицательной флоры был выбран колистин, который оказывает бактерицидное действие на грамотрицательные бактерии. Записи электрической активности проводили ежедневно в течение 8-ми дней после 18-часовой пищевой депривации. Сначала регистрировали фоновую электрическую активность в течение 1 ч. После этого в желудочный зонд вводили 2 мл раствора колистина в дозе 100 мг/кг и продолжали регистрацию электрической активности в течение 2-х ч. После записей крысам давали стандартный виварный корм и воду. Колистин вводили ежедневно однократно в течение 7-ми суток. На 8-е сутки проводили запись электрической активности, а затем у животных опытной и контрольной групп забирали кал для бактериологического анализа. Затем крыс взвешивали и усыпляли введением летальной дозы наркоза. Вскрывали брюшную полость, проводили забор содержимого тощей кишки (20 см за связкой Трейтца) и слепой кишки для последующего бактериологического анализа.

Электрофизиологические исследования. Записи электрической активности проводились с использованием электронного энцефалографа NVX-52 в полосе от 0,1 до 30 Гц. Выходной сигнал поступал в компьютер IBM PC AT. При обработке данных производили фильтрацию сигналов в полосе 5-30 Гц для выявления спайковой активности.

При анализе электрической активности оценивали ММК. В норме ММК состоит из четко повторяющейся последовательности трех фаз: фаза покоя (фаза I) – более 95% медленных волн без пиковых потенциалов (сокращения отсутствуют), фаза нерегулярной активности (фаза II) – пиковые потенциалы возникают не на каждой медленной волне (сокращения происходят нерегулярно) и фаза регулярной ритмической активности (фаза III) – группы пиковых потенциалов возникают на каждой медленной волне – более 95% медленных волн имеют группы пиковых потенциалов (сокращения происходят регулярно с частотой медленных волн). Кроме того, необходимо подчеркнуть, что ММК возникает в проксимальных отделах тонкой кишки и распространяется в каудальном направлении. Достигнув терминальных отделов тонкой кишки, ММК возникает вновь в проксимальных отделах. Поэтому, помимо оценки цикла ММК в одном конкретном месте тонкой кишки, важным является оценка распространения ММК вдоль тонкой кишки. В связи с тем, что основным ориентиром для оценки распространения ММК служит фаза III, а также тот факт, что окончание фазы III характеризуется внезапным исчезновением групп пиковых потенциалов (хотя единичные пиковые потенци-

алы могут наблюдаться), общепринято, что скорость распространения ММК рассчитывают по скорости распространения фазы III вдоль тонкой кишки.

Оценивали следующие параметры ММК:

- количество ММК в час;
- период каждого цикла ММК (сек) – время от окончания одной фазы III до окончания следующей фазы III на одном электроде;
- процент времени каждой из фаз ММК.

В часовых записях подсчитывали длительность каждой из фаз ММК (в сек), затем длительность каждой фазы умножали на 100 и делили на период ММК. При отсутствии какой-либо фазы ММК в часовых записях подсчитывали длительность регистрируемых фаз (в сек), затем длительность каждой фазы умножали на 100 и делили на 3600 сек (длительность записи);

- скорость распространения фазы III в тощей кишке – расстояние между электродами (5 см), деленное на время от окончания фазы III на 1 (или) 2 электроде до окончания фазы III на 2 или 3 электроде.

Бактериологические исследования. Микробиологическое исследование кала и содержимого тощей и слепой кишок проводилось в соответствии с нормативными документами, принятыми для исследования кала у людей: отраслевым стандартом 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Были изучены 8 групп микроорганизмов: *Escherichia coli* (*E.coli*), *Enterococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp., плесневые грибы, *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp.

Статистическая обработка результатов исследований. Для каждой группы животных для всех параметров рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, медиану, перцентили. В связи с тем, что распределение значений не носило нормального характера, данные в окончательном варианте представляли как медиану и перцентили – Me (25;75)% – и для статистического анализа использовали непараметрические критерии. При сравнении параметров электрической активности до введения колистина с фоновыми значениями после введения колистина с 1-х по 8-е сутки применяли непараметрический критерий – ранговый дисперсионный анализ по Фридману. При сравнении данных бактериологических исследований опытной группы с контрольной группой (здоровые животные) использовали непараметрический U- критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались значения при $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В фоновых записях (до введения колистина) в межпищеварительном периоде электрическая активность тощей кишки характеризовалась выраженной ритмичностью с чередованием периодов покоя и активности и наличием ММК (4 ММК в час). ММК представлял собой циклическую, повторяющуюся сократительную активность тонкой кишки в межпищеварительный период. Период ММК в тощей кишке составлял 725 (625;770) сек. Процентное соотношение фаз ММК представлено на рисунке. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами составила 2,2 (1,9;2,5) см/мин, между 2-3 электродами – 1,8 (1,7;2,3) см/мин.

Начиная со вторых суток, происходило статистически значимое снижение длительности фазы I и статистически значимое увеличение длительности фазы II относительно контроля. При этом период ММК составил 585 (545;685)

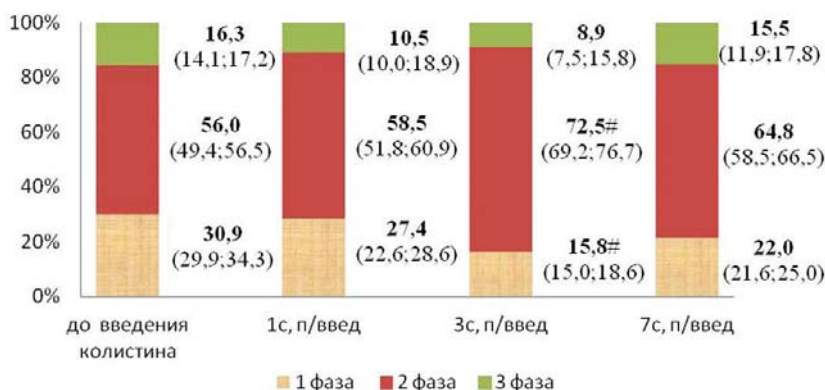


Рис. Динамика длительности фаз ММК в различные сроки после введения колистина. На диаграмме представлены данные электромиограмм, зарегистрированных с электродов, расположенных на расстоянии 10 см за связкой Трейтца.

Примечание: # – $p < 0,05$, отличия значений параметров до введения и в различные сроки после введения колистина статистически значимы.

сек. Число ММК статистически значительно снизилось до 2 (2;2) ММК в час. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами незначительно снизилась и составила 2,0 (1,1;2,5) см/мин, между 2-3 электродами – увеличилась и составила 2,8 (1,4;3,2) см/мин.

На третьи сутки наблюдались максимальные изменения в соотношении фаз (рис.). При этом период ММК составил 785 (545;845) сек. Количество ММК статистически значительно уменьшилось до 1 (1;2) ММК в час. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами увеличилась до 2,3 (1,8;2,5) см/мин, между 2-3 электродами – до 3,3 (2,3;3,3) см/мин.

В последующие сутки наблюдалась тенденция к нормализации параметров

ММК. На седьмые сутки процентное соотношение фаз было статистически незначимым относительно контроля, период ММК составлял 670 (630;925) сек, что близко к норме. Наблюдалось 3 (2;3) ММК в час, что статистически значимо не отличалось от нормы. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами незначительно снизилась и составила 1,8 (1,6;2,2) см/мин ($p>0,05$) между 2-3 электродами – увеличилась и составила 2 (2;4,5) см/мин ($p>0,05$).

Таким образом, введение колистина в течение семи суток не изменяет основные параметры ММК и не оказывает существенного влияния на моторику тонкой кишки.

Данные по бактериологическим исследованиям представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Содержание различных видов микроорганизмов в тощей, слепой кишке и кале в контрольной (здоровые животные) и опытной группе (животные после семисуточного введения колистина), КОЕ/мл, Ме (25;75)%

Вид микроорганизмов	Тощая кишка		Слепая кишка		Кал	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>Staphylococcus</i> spp.	0(0;10 ³)	10 ³ (0;10 ⁴)	10 ³ (10 ³ ;10 ⁶)	0(0;10 ³)#	10 ³ (0;10 ⁴)	10 ⁴ (0;10 ⁵)
<i>Enterococcus</i> spp.	0(0;10 ³)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁶)#	10 ³ (0;10 ⁵)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁶)	10 ³ (0;10 ⁴)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁶)*
<i>E.coli</i>	0(0;10 ³)	10 ² (0;10 ⁵)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁵)	10 ³ (10 ² ;10 ⁴)	10 ³ (10 ³ ;10 ⁵)	0(0;10 ²)#
<i>Proteus mirabilis</i>	0(0;0)	0(0;10 ⁴)	0(0;10 ³)	0(0;10 ²)	0(0;0)	10 ² (0;10 ³)
<i>Enterobacter</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;10 ⁴)	0(0;0)	0(0;0)
Плесневые грибы	0(0;0)	0(0;10 ²)	0(0;0)	10 ² (10 ² ;10 ⁵)*	0(0;0)	0(0;10 ²)
<i>Lactobacillus</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	10 ⁷ (10 ⁴ ;10 ⁷)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁴)*	10 ⁶ (10 ⁶ ;10 ⁷)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁵)*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁴)*	10 ⁵ (10 ⁵ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁴)*

Примечание: * – $p<0,01$; # – $p<0,05$ отличия опытной группы от контрольной статистически значимы. При сравнении данных бактериологических исследований опытной группы с контрольной группой (здоровые животные) использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 2

Представленность различных видов микроорганизмов в тощей, слепой кишке и кале в контрольной (здоровые животные) и опытной группе (животные после семисуточного введения колистина) и изменение количества микроорганизмов в опытной группе по сравнению с контрольной

Вид микроорганизмов	Тощая кишка		Слепая кишка		Кал		Тощая кишка	Слепая кишка	Кал
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт			
<i>Staphylococcus</i> spp.	3/7	4/7	7/7	2/7	4/7	4/7		#	
<i>Enterococcus</i> spp.	3/7	6/7	5/7	7/7	5/7	7/7	#		*
<i>E.coli</i>	3/7	5/7	6/7	6/7	6/7	2/7			#
<i>Proteus mirabilis</i>	0/7	3/7	2/7	2/7	1/7	4/7			
<i>Enterobacter</i> spp.	0/7	1/7	1/7	2/7	1/7	1/7			
Плесневые грибы	0/7	2/7	0/7	7/7	0/7	2/7		*	
<i>Lactobacillus</i> spp.	0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7		*	*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7		*	*

↑	0	↓

Примечание: в левой части таблицы в числителе указано количество животных, у которых были выявлены микроорганизмы, а в знаменателе – общее число животных в группе; в правой части таблицы:

увеличение количества микроорганизмов в опытной группе по сравнению с контрольной (заштриховано черным цветом);

уменьшение количества микроорганизмов в опытной группе по сравнению с контрольной (заштриховано серым цветом);

0 – количество микроорганизмов не изменилось.

* – $p < 0,01$; # – $p < 0,05$ отличия опытной группы от контрольной статистически значимы.

Бактериологические исследования показали, что в контрольной группе у трех животных из семи в содержимом тощей кишки из восьми групп микроорганизмов присутствовали только *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *E.coli*. При анализе микрофлоры каждо-

го отдельного животного было установлено, что микробиоценоз тощей кишки здоровых животных составлял от 0 до 3 видов бактерий. В содержимом слепой кишки у всех животных присутствовали *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. У большинства жи-

вотных высеивались *E.coli*, *Enterococcus* spp. У двух животных из семи присутствовали *Proteus mirabilis*, и у одного животного высеивался *Enterobacter* spp. Состав микрофлоры слепой кишки каждого животного составлял от трех до шести видов микроорганизмов. В кале у всех животных выявлялись *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. У большинства присутствовали *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *E.coli*. У одного животного высеивались *Proteus mirabilis* и *Enterobacter* spp. Микробиоценоз кала каждого животного был представлен 2-6 видами бактерий.

В опытной группе после семисуточного введения колистина отмечались следующие изменения. Так, в содержимом тощей кишки у трех животных появились *Proteus mirabilis*, у одного животного – *Enterobacter* spp., и у двух – плесневые грибы. Статистически значимо увеличилось количество *Enterococcus* spp. Также отмечалось увеличение количества *Staphylococcus* spp., *E.coli*, но оно было статистически незначимым. Видовое разнообразие микрофлоры тощей кишки у каждого животного увеличилось по сравнению с контролем и составляло от одного до пяти видов микроорганизмов. В содержимом слепой кишки у всех животных появились плесневые грибы. Статистически значимо уменьшилось количество *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. Статистически незначимо увеличилось количество *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp. Видовое разнообразие микрофлоры слепой кишки у каждого животного практически не изменилось по сравнению с контролем и составляло 4-7 видов микроорганизмов. В кале статисти-

чески значимо увеличилось количество *Enterococcus* spp. Статистически значимо уменьшилось количество *E.coli*, *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. Также произошло увеличение количества *Proteus mirabilis* и плесневых грибов, но эти изменения были статистически незначимы. Видовое разнообразие микрофлоры кала у каждого животного практически не изменилось по сравнению с контролем и составляло от четырех до семи видов микроорганизмов.

Таким образом, введение колистина в течение семи суток приводит к увеличению количества *Enterococcus* spp. в содержимом тощей кишки, к увеличению количества грибов в содержимом слепой кишки и *Enterococcus* spp. в кале при одновременном снижении количества *Staphylococcus* spp, *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. в слепой кишке и *E.coli*, *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. в кале.

Заключение

Подавление грамотрицательной микрофлоры колистином в течение семи суток у здоровых животных не изменяло основные параметры ММК и не оказывало существенного влияния на моторику тонкой кишки, что свидетельствовало о сохранении нормальной пропульсивной перистальтики. В работе [5] также отмечалось, что как однократное, так и длительное введение тетраголда (препарат на основе колистина) в течение 20-ти дней не влияло на перистальтическую активность тонкого кишечника. В нашем исследовании наиболее выраженные изменения наблюдались в количественном составе микрофлоры слепой кишки и кала, в то время как изменения микробиоты в тощей кишке

были незначительны, что, по-видимому, связано с сохранением распространяющего ММК в тощей кишке и нормальной пропульсивной перистальтики.

Список литературы

1. *Ардатская М.Д., Минушкин О.Н.* Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции // *Consilium Medicum. Гастроэнтерология.* 2006. № 2. С. 4-17.
2. *Бельмер С.В.* Антибиотик-ассоциированный дисбактериоз кишечника // *Русский медицинский журнал.* 2004. № 3. С. 148.
3. *Бельмер С.В., Гасилова Т.В.* Нарушения моторики органов пищеварения и общие принципы их коррекции // *Лечащий врач.* 2010. № 7. С. 12-15.
4. *Скворцов В.В.* Дисбиоз кишечника и антибиотик-ассоциированная диарея // *Лечащий врач.* 2008. № 2. С. 43-47.
5. *Чернов В.В.* Фармако-токсикологическая характеристика тетраголда: автореф. дис.... канд. вет. наук / В.В. Чернов. – Воронеж. 2008. 22 с.
6. *Beringer P.* The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2001. Vol. 7. No. 6. P. 434-440.
7. *Bialvaei A.Z., Kafil H.S.* Colistin, mechanisms and prevalence of resistance // *Curr. Med. Res. Opin.* 2015. Vol. 31, No. 4. P. 707-721.
8. *Hachem R.Y., Chemaly R.F., Ahmar C.A., et al.* Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa in cancer patients // *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. Vol. 51, No. 6. P. 1905-1911.
9. *Koch-Weser J., Sidel V.W., Federman E.B., et al.* Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy // *Ann. Intern. Med.* 1970. Vol. 72. No. 6. P. 857-868.
10. *Ledson M.J., Gallagher M.J., Cowperthwaite C., et al.* Four years' experience of intravenous colomycin in an adult cystic fibrosis unit // *Eur. Respir. J.* 1998. Vol. 12. No. 3. P. 592-594.
11. *Li J., Nation R.L., Milne R.W., et al.* Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2005. Vol. 25. No. 1. P. 11-25.
12. *Li J., Nation R.L., Turnidge J.D., et al.* Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections // *Lancet Infect. Dis.* 2006. Vol. 6. No. 9. P. 589-601.
13. *Ohya T., Sato S.* Effects of dietary antibiotics on intestinal microflora in broiler chickens // *Natl. Inst. Anim. Health Q. - Tokyo.* 1983. Vol. 23. No. 2. P. 49-60.
14. *Quiqley E.M.* Microflora modulation of motility // *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2011. Vol. 17. No. 2. P. 140-147.
15. *Wolinsky E., Hines J.D.* Neurotoxic and nephrotoxic effects of colistin in patients with renal disease // *N. Engl. J. Med.* 1962. Vol. 266. P. 759-768.

The effect of colistin on the electrical activity of the jejunum and the species composition of the intestinal microbiota

N.S. Tropkaya, I.G. Shashkova, T.V. Chernen'kaya, T.S. Popova

The effect of colistin on the electrical activity of the small intestine and microbiota was studied. The electrical activity was recorded by electrodes implanted in the muscle layer of the rat jejunum. It is shown that the intragastric administration of colistin for 7 days did not result in disruption of generation of the migrating myoelectric complex in jejunum that was accompanied by minor modifications of its microflora with marked changes in the quantitative composition of microflora in the cecum.

Key words: intestinal microbiota, colistin, migrating myoelectric complex, jejunum.



Удлинение голени экспериментальных животных методом дистракционного остеосинтеза как модель развития тонического защитного рефлекса

М.С. Сайфутдинов

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, Курган

Контактная информация: д.б.н. Сайфутдинов Марат Саматович, maratsaif@yandex.ru

Современные технологии восстановительной медицины не учитывают наличие и интенсивность защитного тонического рефлекса, возникающего в ответ на травму. В качестве модели механизмов его взаимодействия может использоваться дистракционный остеосинтез. Цель работы – анализ динамики биоэлектрической активности покоя мышц удлиняемой методом дистракционного остеосинтеза голени экспериментальных животных как электрофизиологического маркера тонического защитного рефлекса. Удлинение голени собак вызывает появление в электромиограмме покоя мышц спонтанных фибрилляторных и фасцикуляторных потенциалов, интенсивность которых меняется с течением времени в зависимости от стадии дистракционного остеосинтеза и отражает интенсивность процессов перестройки структуры двигательных единиц и их вовлечение в тонический защитный рефлекс.

Ключевые слова: электромиография, двигательные единицы, защитный тонический рефлекс, дистракционный остеосинтез.

Введение

Тонический защитный рефлекс, возникающий как реакция сенсомоторной системы на травму и хирургическую агрессию, безусловно, должен учитываться при проведении реабилитационных мероприятий. Однако данный феномен не учитывается лечащими врачами. Его наличие и влияние на процесс лечения не обсуждается в специальной литературе. Необходимо исследовать взаимодействие защитных рефлексов с факторами патогенеза и лечебными воздействиями на организм. Наиболее перспективной

базовой моделью для этого может служить удлинение голени экспериментальных животных методом дистракционного остеосинтеза, поскольку после оперативного вмешательства сохраняется пролонгированный очаг повышенной активности тканевых рецепторов, поддерживающий тонический защитный рефлекс длительное время. При этом интенсивностью проприоцептивного афферентного потока можно управлять, меняя заданным образом интенсивность растяжения тканей с помощью дистракционного аппарата.

Опубликованные ранее результаты совместного электрофизиологического и морфологического исследования мышц удлиняемой конечности экспериментальных животных показали, что интенсивные реактивные изменения в мышечных веретёнах под влиянием длительного дозированного растяжения ограничивают их возможное участие в генерации повышенного уровня спонтанной активности α -мотонейронов [8], наблюдаемой в период дистракции и фиксации. Остаётся неясным механизм развития повышенной тонической активности медленных двигательных единиц: сводится ли он к одному физиологическому процессу – тоническому защитному рефлексу, либо имеется множество разных, скрытых от внешнего наблюдателя, феноменов.

В связи с вышесказанным, **целью** настоящей работы является анализ динамики биоэлектрической активности покоя мышц удлиняемой методом дистракционного остеосинтеза голени экспериментальных животных как электрофизиологического маркера тонического защитного рефлекса.

Материалы и методы

Исследование проведено на 26-ти взрослых (1-3 года) беспородных собаках, которым на голень накладывали аппарат Илизарова. Контралатеральная голень оставалась контрольной. У всех животных осуществлялась закрытая флекссионная остеоклазия берцовых костей в средней трети диафиза (26 оперативных вмешательств), и через 5 дней после операции производилась дистракция костных фрагментов с темпом 1 мм в сутки за 4 приёма в течение 28-35 суток. После чего осуществлялась фик-

сация костных фрагментов в течение 1-3 мес. Животных оперировал д.м.н. С.А. Ерофеев. Электромиографические (ЭМГ) обследования экспериментальных животных проводились в предоперационном периоде, в конце периода дистракции (на 14-е, 28-е, 35-е сутки), раз в 30 дней в течение фиксации и через 30 дней после снятия дистракционного аппарата. С помощью цифровой ЭМГ-системы «DISA-1500» (DANTEC, Дания) регистрировали биоэлектрическую активность *m. tibialis anterior* и *m. gastrocnemius* оперированной и контралатеральной голени в покое по общепринятой методике [5] при биполярном игольчатом отведении (стандартный электрод 13K13). Всего проведено 97 ЭМГ-обследований.

Оценивали наличие в ЭМГ покоя различных видов спонтанной активности, интенсивность (единичные, множественные потенциалы) и устойчивость (скорость затухания) их проявления. Если зафиксированный вид спонтанной активности сохранял постоянную интенсивность в течение десяти сек, то он считался незатухающим. Постепенное его угасание квалифицировалось как медленное затухание, а полное исчезновение после введения игольчатого электрода – как быстрое затухание. Рассчитывали частоту встречаемости (n/N) каждого из выявленных типов активности как отношение числа наблюдений данного паттерна (n) к объёму выборки в очередной контрольный срок эксперимента (N). Частота встречаемости является фактически его долей (p), для которой рассчитывали ошибку (s_p) и дисперсию (D_p):

$$s_p = \sqrt{D_p}; \quad D_p = \frac{p(1-p)}{N}$$

Значимость разности долей между разными сроками тестирования оценивали с помощью z-критерия разности долей. Математическая обработка полученных данных проводилась с помощью программного комплекса Microsoft Excel 2010 и интегрированного с ним пакета анализа данных Attestat [2].

ЭМГ-обследования проводились под внутривенным барбитуровым наркозом с соблюдением принятых в подобных случаях правил и норм. Содержание животных и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с Федеральным законом «О защите животных от жестокого обращения», принятым Государственной Думой РФ 01.12.1999 г. и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [4].

Результаты тестирования мышц в предоперационном обследовании и контралатеральной голени рассматривались как контрольные, для учёта возможного влияния наркоза на фоновую биоэлектрическую активность.

Результаты исследований

В предоперационном обследовании проявлений спонтанной ЭМГ-активности в мышцах голени справа и слева не зарегистрировано, что соответствует норме. После наложения distractionного аппарата и 14-ти дней distraction во всех наблюдениях регистрировались одно-, двухфазные биопотенциалы короткой длительности (1-3 мс), сопровождающиеся при звуковой индикации характерным шумовым эффектом в виде серии высокочастотных щелчков, напоминающих

«тонкий хруст целлофана» или «стук дождя по железной крыше» – потенциалы фибрилляции (ПФ). А также повторяющиеся на электрограммах двух-, трёх- и полифазные биопотенциалы с длительностью, варьирующей в пределах широкого диапазона, соответствующего потенциалам действия (ПД) двигательных единиц (ДЕ). Они сопровождалась характерным ритмичным постукиванием и идентифицировались нами как потенциалы фасцикуляции (ПФК). Спонтанная биоэлектрическая активность тестируемых мышц удлиняемой голени состояла из обоих видов потенциалов высокой интенсивности. Регистрировались множественные медленно затухающие и незатухающие ПФ в сочетании с преимущественно быстро затухающими ПФК. Незатухающие и медленно затухающие ПФК были представлены значительно меньше (табл. 1, 2). Степень выраженности отдельных составляющих биоэлектрического фона была крайне неравномерной и широко варьировала у разных животных.

На 28-й день distraction спонтанная биоэлектрическая активность мышц удлиняемой голени имела высокую интенсивность. Регистрировались множественные незатухающие ПФ в сочетании с незатухающими или медленно затухающими ПФК (рис. А). Незатухающие ПФ преобладали над медленно затухающими на фоне сокращения частоты встречаемости быстро затухающих ПФК, доля которых снижалась статистически значимо ($p < 0,05$) за счёт увеличения преимущественно доли медленно затухающих фасцикуляций ($p > 0,05$).

Таблица 1

Частота встречаемости (n/N) потенциалов фибрилляции в мышцах голени экспериментальных животных в процессе её удлинения методом distractionного остеосинтеза

Срок (дни)	Типы активности												
	Быстро затухающие				Медленно затухающие				Незатухающие				
	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	
<i>m. tibialis anterior</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Д	14	0	0	0	0	3	0,50	0,20	0,04	3	0,50	0,20	0,04
	28	0	0	0	0	8	0,31	0,09	0,01	18	0,69	0,09	0,01
	35	2	0,25	0,15	0,02	4	0,50	0,18	0,03	2	0,25	0,15	0,02
Ф	30	12	0,46	0,10	0,01	9	0,35	0,09	0,01	5	0,19	0,08	0,01
	60	4	0,50	0,18	0,03	3	0,38	0,17	0,03	1	0,13	0,12	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>m. gastrocnemius</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Д	14	0	0	0	0	3	0,50	0,20	0,04	3	0,50	0,20	0,04
	28	0	0	0	0	7	0,27	0,09	0,01	19	0,73	0,09	0,01
	35	2	0,25	0,15	0,02	4	0,50	0,18	0,03	2	0,25	0,15	0,02
Ф	30	12	0,46	0,10	0,01	8	0,31	0,09	0,01	6	0,23	0,08	0,01
	60	4	0,50	0,18	0,03	3	0,38	0,17	0,03	1	0,13	0,12	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: сроки тестирования (крайний левый столбик): И – исходно, Д – distractionция, Ф – фиксация, П – после снятия аппарата; n – количество наблюдений, s – ошибка доли, D – дисперсия доли. Серым фоном выделены значения частоты встречаемости, статистически значимо (p<0,05) отличающиеся от предыдущего срока тестирования (критерий разности долей).

Таблица 2

Частота встречаемости (n/N) потенциалов фасцикуляции в мышцах голени экспериментальных животных в процессе её удлинения методом distractionного остеосинтеза

Срок (дни)	Типы активности												
	Быстро затухающие				Медленно затухающие				Незатухающие				
	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	
<i>m. tibialis anterior</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Д	14	4	0,67	0,19	0,04	1	0,17	0,15	0,02	1	0,17	0,15	0,02
	28	6	0,23	0,08	0,01	12	0,46	0,10	0,01	8	0,31	0,09	0,01
	35	1	0,13	0,12	0,01	6	0,75	0,15	0,02	1	0,13	0,12	0,01
Ф	30	3	0,12	0,06	0,01	12	0,46	0,10	0,01	11	0,42	0,10	0,01
	60	4	0,50	0,18	0,03	3	0,38	0,17	0,03	1	0,13	0,12	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	6	0,30	0,10	0,01	2	0,10	0,07	0,01	0	0	0	0
<i>m. gastrocnemius</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Д	14	4	0,67	0,19	0,04	1	0,17	0,15	0,02	1	0,17	0,15	0,02
	28	3	0,12	0,06	0,01	14	0,54	0,10	0,01	9	0,35	0,09	0,01
	35	1	0,13	0,12	0,01	6	0,75	0,15	0,02	1	0,13	0,12	0,01
Ф	30	3	0,11	0,06	0,01	13	0,50	0,10	0,01	10	0,38	0,10	0,01
	60	3	0,27	0,13	0,01	2	0,25	0,15	0,02	3	0,27	0,13	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	6	0,3	0,10	0,01	2	0,1	0,06	0,01	0	0	0	0

Примечание: все обозначения – как под табл. 1.

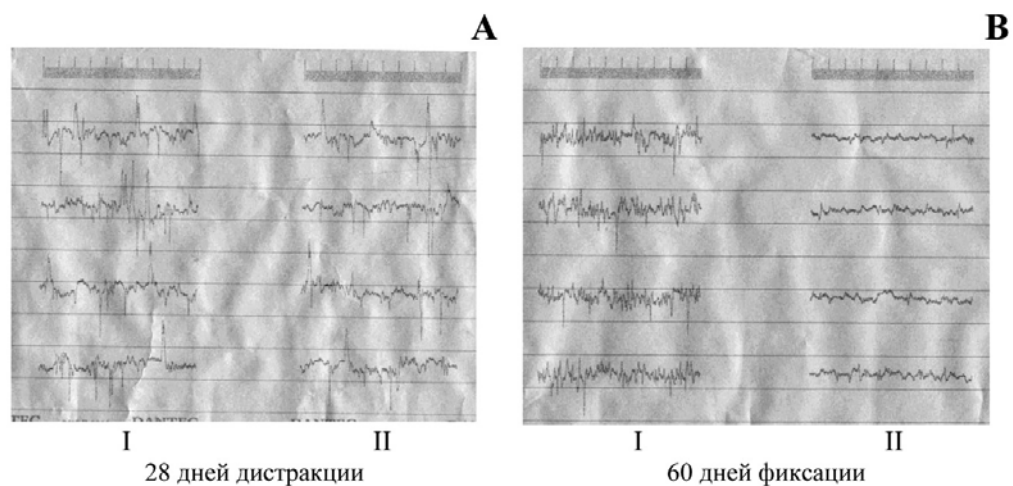


Рис. Изменение интенсивности ЭМГ покоя в момент введения электрода (I) и спустя 10 сек (II). Большое вертикальное деление соответствует 50 мкВ; большое деление на горизонтальной шкале сверху соответствует 10 мс.

На 35-й день distraction появились быстро затухающие ПФ, но по-прежнему преобладали медленно затухающие фибрилляции при сокращении ($p > 0,05$) частоты встречаемости незатухающих ПФ. Среди ПФК также наиболее часто встречались медленно затухающие ПФК. Изменения доли быстро затухающих и незатухающих фасцикуляций по сравнению с предыдущими сроками тестирования статистически не значимы ($p < 0,05$).

В период фиксации наблюдалось постепенное снижение интенсивности ПФ. Это больше заметно на примере незатухающей активности, которая равномерно убывала, и у животных с пролонгированной фиксацией к моменту её окончания полностью исчезала. В то время как частота встречаемости медленно и быстро затухающих ПФ вначале менялась разнонаправлено, и к концу фиксации быстро затухающие ПФ (рис. В) встречались даже чаще, чем в период distraction.

Перед демонтажом distractionного аппарата ПФ и ПФК наблюдались в виде единичных всплесков спонтанной активности.

Высокая интенсивность фибрилляторной составляющей ЭМГ покоя чаще всего сочеталась с наличием множественных незатухающих ПФК. Уменьшение количества ПФ и увеличение скорости их затухания сопровождалось снижением интенсивности ПФК. Однако в этом случае взаимосвязь прослеживалась менее жёстко. При незначительной выраженности денервационной активности могли наблюдаться ПФК разной интенсивности, но при выраженных ПФ на электрограммах всегда присутствовали множественные незатухающие или медленно затухающие ПФК. Данное обстоятельство позволяет предположить, что возникновение ПФК при удлинении конечностей может иметь несколько причин.

Через 30 дней после демонтажа distractionного аппарата ПФ не были зарегистрированы ни в одном наблюдении. В небольшом количестве наблюдений отмечалось появление ПФК при введении игольчатого электрода, но они быстро затухали. Очень редко имела место медленно затухающая активность. Однако во всех случаях при длительном наблюдении её исчезновение было полным, т.е. фактором, активирующим генерацию ПФК, являлось воздействие на мышцу при введении игольчатого электрода.

На протяжении всего эксперимента в мышцах контралатеральной голени не было зарегистрировано никаких проявлений спонтанной биоэлектрической активности.

Обсуждение результатов

Отсутствие ПФК в тестируемых мышцах в предоперационных обследованиях и на контралатеральной конечности исключало возникновение фасцикуляций под влиянием наркоза ни при первом его применении, ни вследствие кумулятивного эффекта.

Процессы, порождающие ПФ, хорошо описаны в литературе, в т.ч. при distractionции [9], в работах, выполненных совместно физиологами и морфологами [8]. Можно выделить два источника данного вида спонтанной активности: мышечные волокна, потерявшие контакт с иннервировавшим их α -мотонейроном, и новообразованные мышечные волокна [10], не успевшие такой контакт установить. Наличие ПФ и динамика их интенсивности отражает структурную перестройку периферической части ДЕ под влиянием длительного дозированного растяжения.

Относительно происхождения ПФК в мышцах на фоне удлинения конечности

имеется ряд предположений, которые анализировались нами в предыдущей работе [8]. Интенсивное вовлечение мышечных веретён [8], толстых миелинизированных волокон [1] и сенсорных нейронов [7] в реактивно-репаративные процессы под воздействием длительного дозированного растяжения минимизирует их участие в механизмах генерации ПФК. Нам представляется наиболее вероятным рассматривать данный вид спонтанной активности в условиях удлинения конечности как результат проявления тонического защитного рефлекса [3]. Его спинальный генератор активируется вследствие одновременной интенсификации активности тканевых рецепторов в зоне наложения distractionного аппарата и снижения проприоцептивной импульсации в лемнисковой подсистеме соматосенсорного анализатора, на что косвенно указывают изменения параметров соматосенсорных вызванных потенциалов [6].

Защитный тонический рефлекс, наряду с активацией небольшого количества медленных ДЕ, включает торможение значительной части быстрых α -мотонейронов спинальных моторных центров соответствующих мышц в области вмешательства. Амплитуда ЭМГ покоя подвергнутых растяжению мышц в эти сроки является результатом суммации асинхронных разрядов небольшой части медленных ДЕ.

В период фиксации между интенсивностью ПФ и ПФК имеет место обратное взаимоотношение. Наблюдаемое постепенное снижение интенсивности ПФ у экспериментальных животных и частичное их замещение множественными ПФК связано с восстановлением значительной части нервно-мышечных контактов.

Полное исчезновение ПФК после снятия дистракционного аппарата свидетельствует в пользу их рефлекторного происхождения, поскольку в это время снижается интенсивность воздействия альтерирующих факторов на ткани удлинённого сегмента конечности. В связи с этим исчезает повышенная интероцептивная афферентация и прекращается действие тонического защитного рефлекса.

Динамика изменений спонтанной биоэлектрической активности, наблюдаемая у экспериментальных животных, совпадает с картиной ЭМГ покоя у больных при удлинении конечностей в клинике.

Выводы

1. Под воздействием длительного дозированного растяжения в мышцах удлиняемого сегмента конечности экспериментальных животных повышается интенсивность спонтанной биоэлектрической активности.

2. Электромиограмма покоя мышц удлиняемой голени экспериментальных животных содержит биопотенциалы различного генеза, интенсивность генерации которых изменяется в зависимости от стадии дистракционного остеосинтеза.

3. Компоненты спонтанной активности, имеющие периферическое происхождение, отражают процесс перестройки структуры периферической части двигательных единиц под воздействием длительного дозированного растяжения. Биопотенциалы, отражающие фоновую активность α -мотонейронов, связаны с механизмами тонического защитного рефлекса.

Список литературы

1. *Варсегова Т.Н., Щудло Н.А., Щудло М.М., Еманов А.А.* Изменения поверхностного малоберцового нерва в зависимости от частоты высокодетальной автодистракции при ортопедическом удлинении голени у собак с суточным темпом 3 мм // Морфология. 2015. Т. 148. № 5. С. 43-47.
2. *Гайдышев И.П.* Анализ и обработка данных: специальный справочник. - СПб: Питер. 2001. С. 752.
3. *Ерохин А.Н., Сайфутдинов М.С.* Профилактика гипертракционных нейропатий у больных при дистракционном остеосинтезе // Журнал неврологии и психиатрии им С.С. Корсакова. 2013. № 7. С. 52-54.
4. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2003. № 4(7). С. 34-36.
5. *Касаткина Л.Ф., Гильванова О.В.* Электромиографические методы исследования в диагностике нервно-мышечных заболеваний. Игольчатая электромиография. - М.: Медика. 2010. 416 с.
6. *Сайфутдинов М.С., Шейн А.П., Криворучко Г.А.* Соматосенсорная афферентация в условиях дистракционного остеосинтеза // Сенсорные системы. 2013. Т. 27. № 1. С. 68-79.
7. *Сафонова Г.Д.* Структурные изменения нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов при удлинении голени взрослых собак // Морфология. 2011. Т. 139. № 3. С. 35-40.
8. *Шевцов В.И., Сайфутдинов М.С., Чикорина Н.К.* Мышечные веретёна при удлинении конечности: проприорецептивный конфликт или дефицит активности? // Бюлл. экспер. биол. 2008. Т. 146. № 7. С. 114-116.
9. *Шейн А.П., Сайфутдинов М.С., Криворучко Г.А.* Локальные и системные реакции сенсомоторных структур на удлинение и ишемию конечностей. – Курган. 2006. 284 с.
10. *Williams P., Kyberd P., Kenwright J.* The morphological basis of increased stiffness of rabbit tibialis anterior muscles during surgical limb-lengthening // J. of Anatomy. 1998. Vol. 193. No. 1. P. 131-138.

Lengthening of the shin of experimental animals by the method of distraction osteosynthesis as a model of the progress of the tonic protective reflex

M.S. Saifutdinov

Modern technologies of regenerative medicine do not take into account the presence and intensity of the tonic protective reflex that occurs in response to injury. The distraction osteosynthesis can be used as a model of its interaction mechanisms. Objective of research is analysis of the dynamics of spontaneous electrical activity of muscles of the shin of experimental animals, lengthen by the method of distraction osteosynthesis, as the electrophysiological marker of the tonic protective reflex. The dogs shin lengthening causes the appearance of spontaneous fibrillation and fasciculation potentials in the electromyogram of muscles at rest, which intensity changes with time depending on a stage of distraction osteosynthesis and reflects the intensity of motion units restructuring processes and their involvement in the protective tonic reflex.

Key words: electromyography, motion units, protective tonic reflex, distraction osteosynthesis.



Оценка морфологических изменений в миокарде крыс линии WAG/Rij под действием дофамина

Э.И. Сайранова, И.И. Садртдинова, З.Р. Хисматуллина

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа

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

В настоящей работе приведены результаты морфологических изменений миокарда крыс линии WAG/Rij при однократном введении максимальных доз препарата дофамина (10 мкг/кг). Спустя сутки после введения дофамина в миокарде были обнаружены гемостаз и лимфостаз крупных и мелких сосудов. Вокруг сосудов наблюдали периваскулярно-воспалительно-клеточную инфильтрацию макрофагами, лимфоцитами, тучными клетками. Структура кардиомиоцитов и поперечная исчерченность миофибрилл была сохранена, что свидетельствовало о сохранении морфофункциональных характеристиках клеток в данной группе. Спустя месяц поперечная исчерченность кардиомиоцитов исчезала в результате разрушения миофиламентов, происходили патоморфологические изменения в виде выраженного расстройства кровообращения, ишемии миокарда и, как следствие, восковидного некроза, приводящего к гибели кардиомиоцитов и нарушению сократимости миокарда.

Ключевые слова: дофамин, крысы линии WAG/Rij, миокард.

Введение

Дофамин является одним из химических факторов внутреннего подкрепления, у человека с его участием осуществляется контроль двигательной активности, эндокринных функций, эмоций, мышления. Кроме того, дофамин участвует в развитии некоторых заболеваний – болезни Паркинсона, депрессии, патологической агрессивности и т.д. [2]. С помощью фармакологических, биохимических и молекулярных методов было обнаружено наличие разных подтипов рецепторов дофамина (D1, D2, D3, D4) в сердечной ткани человека; у крыс D1- и D2-рецепторы локализованы в сердце [11, 16, 17].

В последние десятилетия широко обсуждается роль дофамина в регуляции функций сердечно-сосудистой системы [2, 3, 6, 18]. Кроме того, в настоящее время установлена связь депрессии с сердечно-сосудистой заболеваемостью и смертностью [4].

Известно, что крысы линии WAG/Rij представляют собой признанную генетическую модель абсансной эпилепсии человека [9, 13]. Показано, что развитие абсансной эпилепсии коррелирует с серьезными нарушениями в дофаминергической системе у крыс линии WAG/Rij [1].

В клинической медицине часто применяют агонисты адренорецепторов. Было установлено, что дофамин – пред-

шественник норадреналина – изменяет функции сердечно-сосудистой системы, совершенно отличные от тех, которые регулируют адреналин и норадреналин [8]. Согласно литературным данным, при введении дофамина, как и при активации дофаминергической системы на фоне стресса, не исключается токсическое влияние дофамина на миокард [5].

Целью настоящего исследования являлось изучение морфологических изменений в миокарде крыс линии WAG/Rij при однократном введении максимальных доз препарата дофамина.

Материалы и методы

Настоящее исследование выполнено на половозрелых самцах крыс ($n=30$) инбредной линии WAG/Rij в возрасте 6 мес. массой 200-220 г. Крысы содержались в условиях вивария биологического факультета Башкирского государственного университета, характеризующихся постоянством комнатной температуры (20-22°C) и уровнем влажности. Животные находились в стандартных пластмассовых клетках по 3-4 особи. Корм и воду животные получали *ad libitum*. При работе с крысами полностью соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 г.).

Животные были разделены на 2 группы: контроль ($n=10$) и острый эксперимент ($n=20$). В эксперименте дофамин («Дофамин», ОАО «Биохимик», Россия, Саранск) вводили внутривенно в дозах, вызывающих стимуляцию β_1 - и α - адренорецепторов, из расчета 10 мкг/кг [5]. В остром эксперименте животных разделили на 2 группы: первой группе крыс ($n=10$) дофамин вводили однократно и

производили забор материала через 24 ч, второй группе крыс ($n=10$) препарат вводили также однократно, но забор материала производили через 1 мес. В течение всего эксперимента контрольных и опытных животных содержали без стрессовых и медикаментозных воздействий. Умерщвление животных проводилось методом декапитации в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. Исследуемый внутренний орган (сердце) фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, парафиновые срезы для морфологического исследования окрашивали гематоксилином и эозином. Визуализацию препаратов и анализ морфоструктурных изменений кардиомиоцитов в поле зрения проводили с помощью светооптического цифрового микроскопа Leica DMD108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Результаты и их обсуждение

Результаты микроскопического исследования показали, что в контрольной группе миокард крыс имеет хорошо выраженную структуру клеток: кардиомиоциты цилиндрической или отросчатой формы и четко разделены цитолеммой, анастомозировали между собой с образованием трехмерной сети, функциональных волокон. Ядра крупные, находились в центре кардиомиоцитов. Между кардиомиоцитами располагались прослойки рыхлой соединительной ткани, капилляры, нервы. Отеки в сердечной ткани отсутствовали, водный баланс клеток и кровеносный ток сосудов нарушены не были (рис. 1).

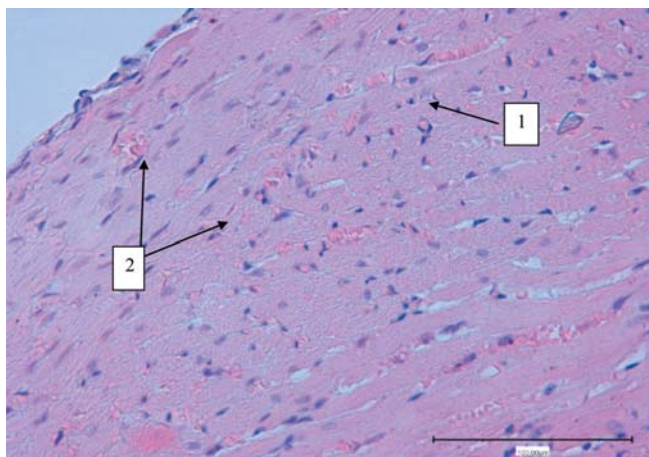


Рис. 1. Миокард крысы линии WAG/Rij контрольной группы.
1 – ядра кардиомиоцитов; 2 – кровеносные сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200.

В остром эксперименте после однократного введения препарата через 24 ч (1-я группа) структура кардиомиоцитов и поперечная исчерченность миофибрилл была сохранена, что свидетельствовало о сохранении морфофункциональных характеристиках клеток в данной группе (рис. 2, 3). Вокруг сосудов наблюдалась периваскулярно-воспалительно-клеточная инфильтрация макрофагами, лимфоцита-

ми, тучными клетками. Были обнаружены гемостаз и лимфостаз крупных и мелких сосудов. Периваскулярно располагались клетки Аничкова – ядерный хроматин расположен в виде «гусеницы»; зубчато при продольном разрезе. При поперечном разрезе клетки напоминают форму «глаза филина». Характерной функциональной особенностью клеток Аничкова является фагоцитарная активность (рис. 3).

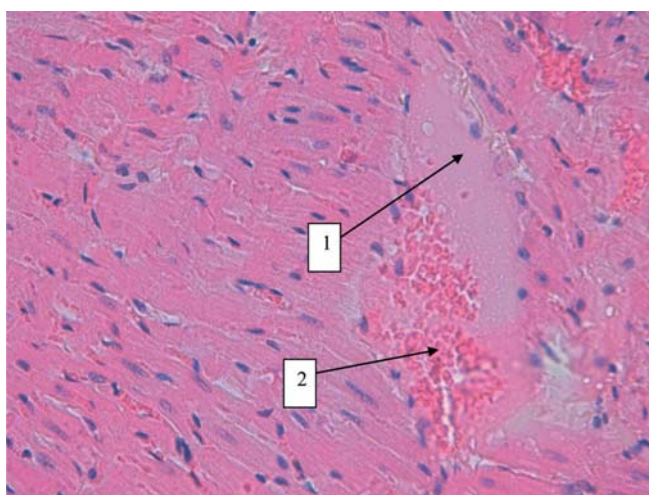


Рис. 2. Структура миокарда через 24 ч после введения дофамина.
1 – лимфостаз крупных и мелких сосудов; 2 – гемостаз сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400.

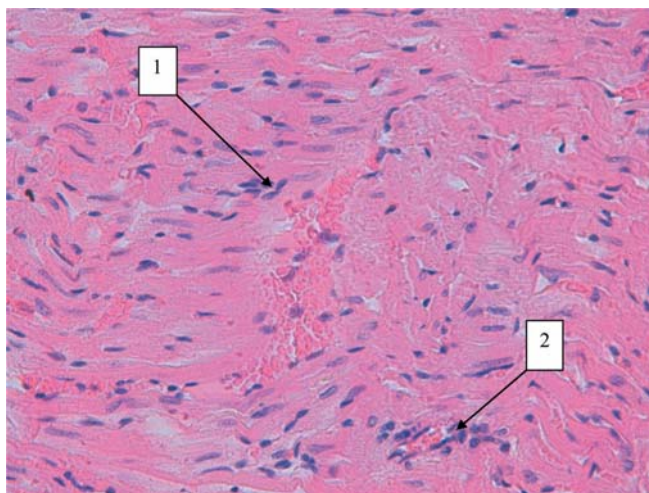


Рис. 3. Воспалительный процесс в миокарде крыс экспериментальной группы. 1 – клетки Аничкова; 2 – периваскулярная инфильтрация клетками воспалительного ряда. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Во 2-й группе острого эксперимента наблюдались признаки ценкеровского распада кардиомиоцитов вследствие лизиса и распада миофибрилл. В этих зонах исчезала поперечная исчерченность сердечных клеток в результате разрушения миофиламентов. Восковидный некроз имел мозаичный характер

(рис. 4). Клеточная плотность миокарда – высокая, в силу увеличения количества соединительнотканых клеток (фибробластов, макрофагов), воспалительных клеток (лимфоцитов) и клеток Аничкова. Между сердечными волокнами были расширены промежутки за счет накопления крупнокалиберных

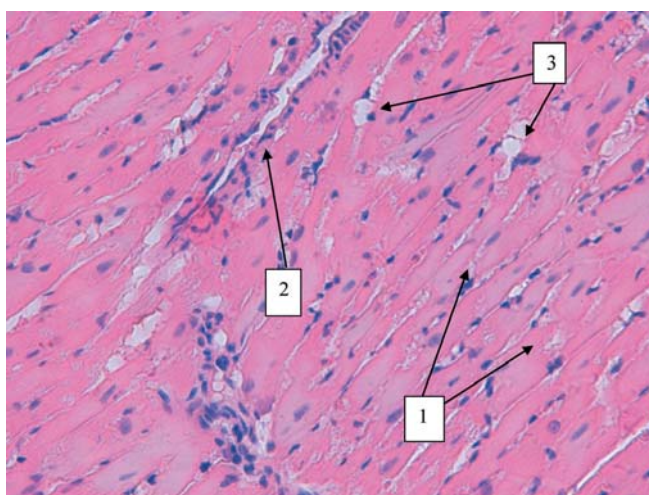


Рис. 4. Нарушения поперечной исчерченности миофибрилл миокарда крыс через 1 мес. 1 – восковидный некроз кардиомиоцитов; 2 – воспалительные клетки вокруг сосуда; 3 – вакуоли интерстициального пространства. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400.

вакуолей. Вероятно, эти изменения произошли из-за нарушения микроциркуляции, тромбоза сосудов. В данной экспериментальной группе наблюдалось геморрагическое пропитывание тканей (инфильтрация) – кровоизлияние с сохранением структуры ткани. На препаратах четко выражены как единичные эритроциты, так и их скопления в виде сладжа эритроцитов (тромбоз) (рис. 5). Определялись массивные макрофагально-фибробластические инфильтраты с доминированием фибробластов, что указывало на начавшуюся пролиферативную стадию воспаления, которая может провоцировать кардиосклероз [7].

По некоторым данным, в малых и средних дозах (2-10 мкг/кг, т.н. «коронарной») дофамин возбуждает β_1 -адренорецепторы, что увеличивает коронарный кровоток и потребление кислорода миокардом, вызывая положительный инотропный эффект с увеличением минутного объема крови [10, 15].

При применении больших доз (10 мкг/кг), как в нашем эксперименте, преобладает стимуляция α_1 -адренорецепторов, с повышением общего периферического сосудистого сопротивления и частоты сердечных сокращений [12, 14].

Таким образом, выявленные патоморфологические изменения в виде выраженного нарушения гемодинамики, ишемии миокарда и, как следствие, восковидного некроза являются необратимыми процессами и неминуемо приводят к гибели кардиомиоцитов, что влечет за собой нарушение сократимости миокарда.

Наблюдаемые нами морфологические изменения в миокарде крыс могут свидетельствовать о потенциальной токсичности дофамина при введении в организм больших доз препарата. Поэтому пациенты с заболеваниями сердечно-сосудистой системы нуждаются в четком и тщательном контроле за состоянием организма, особенно при серьез-

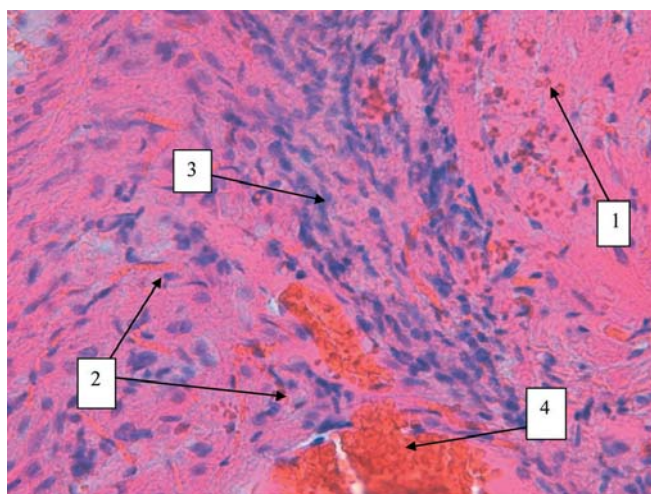


Рис. 5. Морфологическая структура миокарда через 1 мес. после введения дофамина. 1 – геморрагическое пропитывание тканей единичными эритроцитами; 2 – скопление эритроцитов; 3 – макрофагально-фибробластическая инфильтрация; 4 – кровоизлияния. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400.

ных нарушениях в дофаминергической системе. Полученные результаты требуют детального изучения для объяснения механизмов влияния дофаминергических препаратов. В дальнейшем нами планируются исследования с использованием морфометрических, гистохимических и физиологических методов, которые позволят раскрыть механизмы влияния дофамина на живой организм.

Выводы

Однократное введение дофамина спустя сутки (1-я группа острого эксперимента) вызывает наименьшие токсические повреждения, выражающиеся в местном васкулите и нарушении микроциркуляции.

После однократного введения дофамина через месяц (2-я группа острого эксперимента) вокруг сосудов наблюдается периваскулярно-воспалительно-клеточная инфильтрация макрофагами, лимфоцитами, тучными клетками. Определяются массивные макрофагально-фибробластическая инфильтраты в паренхиме миокарда, что указывает на начавшуюся пролиферативную стадию воспаления, которая может провоцировать кардиосклероз. Наличие восковидного некроза усугубляет процесс, имеющий необратимый характер.

Список литературы

1. *Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б.* Нейробиологические основы девиантного поведения при алкоголизме // Вестник Башкирского университета. 2015. № 2. Т. 20. С. 444-448.
2. *Билалова Г.А., Казанчикова Л.М., Зефирова Т.Л., Ситдииков Ф.Г.* Инотропное действие дофамина на сердце крыс в постнатальном онтогенезе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. № 8. Т. 156. С. 136-139.

3. *Билалова Г.А., Казанчикова Л.М., Ситдииков Ф.Г., Дикопольская Н.Б., Шайхелисламова М.В.* Рецепторы сердца, ответственные за инотропное влияние дофамина на миокард растущих крыс // Биомедицинская радиоэлектроника. 2015. № 4. С. 16-18.
4. *Большакова О.О.* Роль антидепрессантов в современной кардиологии // Клиническая фармакология и терапия. 2012. № 4. Т. 21. С. 19-24.
5. *Вебер В.Р., Рубанова М.П., Жмайлова С.В.* Влияние дофамина на ремоделирование левого и правого желудочков сердца в эксперименте // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2009. № 1. Т. 5. С. 73-76.
6. *Корсунов В.А.* Влияние дофамина и добутамина на состояние систолической, диастолической функции левого желудочка и легочный кровоток при септическом шоке у детей // Украинский журнал экстремальной медицины імені Г.О. Можаяєва. 2010. № 1. Т. 11. С. 58-62.
7. *Серов В.В., Пауков В.С.* Воспаление. - Рук-во для врачей. - М.: Медицина. 1995. 640 с.
8. *Раевский К.С.* Функциональная роль и фармакологическая регуляция дофаминергических систем мозга // Вестн. Рос. АМН. 1998. С. 19-24.
9. *Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р.* Стероидная регуляция нейронной возбудимости в переднем кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга у крыс линии WAG/Rij // Биомедицина. 2014. № 2. С. 64-72.
10. *Burton Ch.J., Tomson Ch.R.V.* Can the use of low-dose dopamine for treatment of acute renal failure be justified? // Postgrad. Med. J. 1999. Vol. 75. P. 269-274.
11. *Cavallotti C., Nuti F., Bruzzone P., Mancone M.* Age-related changes in dopamine D2 receptors in rat heart and coronary vessels // Clin. exp. pharmacol. physiol. 2002. Vol. 29. P. 412-418.
12. *Chugh G., Pokkunuri I., Asghar M.* Renal dopamine and angiotensin II receptor signaling in age-related hypertension // Am J. Physiol. Renal. Physiol. 2013. Vol. 304. N. 1. F. 1-7.
13. *Coenen A.M., van Luijtelaar E.L.* Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats // Neurosci Lett. 1986. No. 70(3). P. 393-7.

14. *Harris R.C., Zhang M.* Dopamine, the Kidney, and Hypertension // *Curr Hypertens Rep.* 2012. Vol. 14. N. 2. P. 138-143.
15. *O'Leary M.J., Bihari D.J.* There are no magic bullets - just high quality intensive care // *British Med. J.* 2001. Vol. 322. P. 1437-1439.
16. *Ozono R., O'Connell D.P., Vaughan C., Botkin S.J., Walk S.F., Felder R.A., Carey R.M.* // *Hypertension.* 1996. 27(3 Pt 2). P. 693-703.
17. *Ricci A., Bronzetti E., Felici L., Greco S., Amenta F.* // *J. Neuroimmunol.* 1998. 1;92(1-2). P. 191-5.
18. *Wei C., Gao J., Li M., Li H., Wang Y., Li H., Xu C.* Dopamine D2 receptors contribute to cardioprotection of ischemic post-conditioning via activating autophagy in isolated rat hearts // *Int. J. Cardiol.* 2016. T. 203. P. 837-839.

The assessment of the morphological changes in a myocardium of WAG/Rij rats under the influence of dopamine

E.I. Sayranova, I.I. Sadrtdinova, Z.R. Khismatullina

Our research shows the results of morphological changes of the myocardium in WAG/Rij rats after they were administered the maximum dose of dopamine in a single injection (in dose 10 mcg/kg). One day after the injection hemostasis and lymphostasis were found in both large and small blood vessels. Inflammatory infiltrations of macrophages, lymphocytes and mast cells were observed to gather around the blood vessels. The unchanged cardiomyocytes structure and cross striation of the myofibrils testified to the cells maintaining their morphofunctional characteristics. In a month, as a result of the destruction of the myofilaments the cardiomyocytes cross striation disappeared. Moreover, strongly pronounced pathomorphological changes in the blood flow was observed, the main consequences thereof being ischemia of the myocardium and, consequently, the wax-like necrosis of the myofibrils leading to the death of cardiomyocytes and to a contractility disorder of the myocardium.

Key words: dopamine, WAG/Rij rats, myocardium.

Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола

И.А. Титович, В.Ц. Болотова

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург

Контактная информация: к.ф.н. Болотова Вера Цезаревна, vera.bolotova@pharminnotech.com

Изучена антигипоксическая активность нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) на моделях острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии. Антигипоксический эффект ФДЭС (доза 75 мг/кг) превосходил активность цитофлавина (дозы 75 и 600 мг/кг) и был сопоставим и действием амтизола (доза 50 мг/кг).

Ключевые слова: острая нормобарическая гипоксия, острая гемическая гипоксия, острая гистотоксическая гипоксия, гипоксикамера, цитофлавин, амтизол.

Введение

Гипоксия является сложным функционально-метаболическим нарушением, в основе которого лежит снижение доставки и утилизации кислорода в клетках организма, что может быть обусловлено нарушением функционирования дыхательной и сердечно-сосудистой систем, транспорта крови, митохондриальной дисфункцией [5]. К настоящему времени проведено множество исследований по экспериментальному и клиническому изучению препаратов с потенциальным антигипоксическим действием среди разных классов химических соединений природного и синтетического происхождения.

В медицинской практике широкое применение при различных гипоксических состояниях нашли антигипоксанты, которые способны поддерживать при гипоксии активность сукцинатоксидазного звена. Это FAD-зависимое звено цикла Кребса, позднее угнетающееся при гипоксии по сравнению с NAD-зависи-

мыми оксидазами, может определенное время поддерживать энергопродукцию в клетке при условии наличия в митохондриях субстрата окисления в данном звене – сукцината (янтарной кислоты) [10]. В последние годы установлено, что янтарная кислота реализует свои эффекты не только как интермедиат различных биохимических циклов, но и как лиганд специфических рецепторов (SUCNR1, GPR91), расположенных на цитоплазматической мембране клеток и сопряженных с G-белками [7, 15].

Целью исследования явилось изучение влияния нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) на устойчивость организма лабораторных животных к гипоксии.

Материалы и методы

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Россий-

ской Федерации [11], в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [14], согласно утвержденному письменному протоколу. Также исследования проводили в соответствии с СОП организации, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Тестируемые животные. Исследования выполнены на 312-ти белых беспородных мышах-самцах массой 17-25 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животные были рандомизированы по группам в соответствии с задачами эксперимента. Опытная группа включала 8 особей, контрольная – 16. Опытные и контрольные группы мышей были уравнены по массе, условиям кормления и содержания.

Условия кормления и содержания. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Все животные опытной и контрольной групп были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14-ти суток.

Объект исследования. В качестве объекта исследования было выбрано соединение аминоэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) в дозах 10, 25, 50 и 75 мг/кг.

Новое соединение синтезировано на кафедре органической химии СПХФА. В основе фармакологической концепции, реализованной при создании этой субстанции с антигипоксическим эффектом, лежит ее предполагаемая

направленность действия на энерго-продуцирующие системы нейронов и периферических тканей, как наиболее страдающие при гипоксии различного генеза. Ранее для соединений со сходным химическим строением была показана способность увеличивать количество и активность митохондрий, что может объяснять возможное антигипоксическое действие [1-3].

В качестве референсных средств применяли сукцинатсодержащий антигипоксикант цитофлавин (ООО «НТФФ Полисан», Россия) в дозах 10, 25, 50, 75 и 600 мг/кг (по янтарной кислоте), который хорошо изучен в качестве антигипоксического средства, и эталонный антигипоксикант поливалентного действия амтизол в дозах 25 и 50 мг/кг [4]. Препараты вводили перорально однократно за 1 ч до начала эксперимента. Животные контрольной группы получали очищенную воду в эквивалентных количествах.

Антигипоксическую активность препаратов изучали на трех моделях гипоксии: острой нормобарической (ОНГ), острой гемической (ОГемГ) и острой гистотоксической гипоксии (ОГТГ) [4].

Модель острой нормобарической гипоксии. Исследования проводили в гипоксикамере «БИО-НОВА-204» (горный воздух) (ООО «НТО Био-Нова», Россия). Окружающий воздух, очищенный фильтром, сжимается компрессором и подается на вход мембранного модуля. Полупроницаемые мембраны обладают свойством селективного пропускания молекул кислорода и азота воздуха. На выходе мембранного модуля получается воздух с уменьшенным содержанием кислорода. С выхода газоразделительного блока газ поступает по шлангу в камеру

(объем 75 л) нормобарической гипоксии. Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС – не менее 5 л/мин. Процентное содержание кислорода в ГГС, подаваемой животным, регулируется и устанавливается с помощью газоанализатора, который встроен в установку. В работе использована проба нарастающей гипоксии, в ходе которой на приборе выставлялось минимальное содержание кислорода в газовой смеси (3%), и животные подвергались гипоксическому воздействию в ходе вывода прибора на максимальный уровень гипоксии. В гипоксическую камеру помещали до 30-ти мышей одновременно контрольной и опытной групп. Для каждого животного регистрировали критический процент кислорода в ГГС, который вызывал его гибель.

Стандартизированные условия эксперимента в гипоксикамере представлены на рис.

Установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% до 3,4%.

Модель острой гемической гипоксии. Для создания модели ОГемГ животным вводили внутрибрюшинно натрия нитрит (300 мг/кг), предварительно растворив его в воде очищенной. Учитывали продолжительность жизни мышей в мин [4].

Модель острой гистотоксической гипоксии. Моделировали ОГтГ путем внутрибрюшинного введения мышам 0,4% водного раствора натрия нитропруссиды (20 мг/кг). Регистрировали продолжительность жизни животных после введения ингибитора тканевого дыхания [4].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа и методов вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение

На модели ОНГ было установлено, что животные, которым вводили ФДЭС в дозе 75 мг/кг, погибали при вдыхании воздушной смеси, содержащей на 16 и 11% кислорода меньше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,005$) и цитофлавина 600 мг/кг ($p < 0,05$) соответственно, также эта группа была сопоставимо

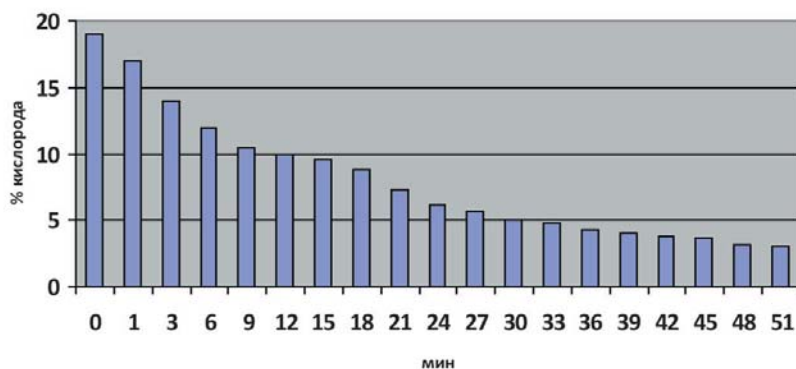


Рис. Динамика процентного содержания кислорода в гипоксической газовой смеси при выполнении гипоксической пробы.

с группой амтизола 25 мг/кг ($p < 0,05$). По убыванию антигипоксической активности препараты можно расположить в следующей последовательности: амтизол 50 мг/кг > ФДЭС 75 мг/кг = амтизол 25 мг/кг > цитофлавин 600 мг/кг. Результаты исследований представлены в таблице.

На модели ОГемГ ФДЭС (доза 75 мг/кг), цитофлавин (доза 75 мг/кг) и амтизол (доза 50 мг/кг) оказали наиболее выраженный антигипоксический эффект (табл.). У животных, которым вводили ФДЭС (доза 75 мг/кг), эффект превосходил группы цитофлавина (доза 75 мг/кг), амтизола (доза 50 мг/кг) и

Таблица
Влияние ФДЭС на переносимость животными различных видов гипоксии

Группа животных	Кол-во животных в группе	Острая гипоксическая гипоксия	Острая гемическая гипоксия	Острая гистотоксическая гипоксия
		Уровень кислорода во вдыхаемом воздухе, %	Время жизни, мин	Время жизни, мин
Контроль	16	4,21±0,18	15,47±1,95	9,74±1,59
Цитофлавин, 10 мг/кг	8	4,60±0,08 ^{1,3,8}	13,68±0,62 ^{10,12}	8,37±0,21 ^{3,6}
Цитофлавин, 25 мг/кг	8	4,54±0,14 ^{1,7}	14,63±0,63 ^{10,12}	10,27±0,80 ⁶
Цитофлавин, 50 мг/кг	8	4,14±0,13 ^{6,11,12}	14,26±1,17 ^{10,12}	7,32±0,66 ^{1,3,7,12}
Цитофлавин, 75 мг/кг	8	4,76±0,08 ^{2,3}	17,51±1,18 ^{2,9,12}	10,37±0,99 ^{1,3,12}
Цитофлавин, 600 мг/кг	8	4,05±0,18 ⁹	15,60±4,16	20,70±6,35 ¹
Амтизол, 25 мг/кг	8	3,61±0,14 ^{2,9}	16,90±1,71 ^{9,12}	15,14±1,61
Амтизол, 50 мг/кг	8	3,35±0,07 ^{3,4,6}	23,00±1,53 ^{2,3,6,12}	16,84±0,67 ^{1,3,12}
ФДЭС, 10 мг/кг	8	3,72±0,08 ^{1,9}	15,13±1,70 ^{10,12}	14,61±1,20 ^{1,3,9}
ФДЭС, 25 мг/кг	8	3,86±0,14 ⁹	16,88±2,22 ^{9,12}	14,12±2,09 ¹²
ФДЭС, 50 мг/кг	8	4,02±0,07 ^{11,12}	20,02±3,02	17,84±1,97 ²
ФДЭС, 75 мг/кг	8	3,62±0,07 ^{2,9}	27,27±3,25 ^{2,3,6,9}	16,97±3,09 ^{2,3,9}

Примечание: 1 – достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$); 2 – достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,005$); 3 – достоверное отличие от группы цитофлавина 600 мг/кг ($p < 0,05$); 4 – достоверное отличие от группы цитофлавина 600 мг/кг ($p < 0,005$); 5 – достоверное отличие от группы цитофлавина 600 мг/кг ($p < 0,0005$); 6 – достоверное отличие от группы амтизола 25 мг/кг ($p < 0,05$); 7 – достоверное отличие от группы амтизола 25 мг/кг ($p < 0,005$); 8 – достоверное отличие от группы амтизола 25 мг/кг ($p < 0,0005$); 9 – достоверное отличие от группы амтизола 50 мг/кг ($p < 0,05$); 10 – достоверное отличие от группы амтизола 50 мг/кг ($p < 0,005$); 11 – достоверное отличие от группы амтизола 50 мг/кг ($p < 0,0005$); 12 – достоверное отличие от группы ФДЭС 75 мг/кг ($p < 0,05$); 13 – достоверное отличие от группы ФДЭС 75 мг/кг ($p < 0,005$); 14 – достоверное отличие от группы ФДЭС 75 мг/кг ($p < 0,0005$).

контрольную группу мышей на 55%, 18% ($p < 0,05$) и 76% ($p < 0,005$) соответственно. По убыванию антигипоксической активности препараты можно расположить в следующей последовательности: ФДЭС 75 мг/кг > амтизол 50 мг/кг > ФДЭС 50 мг/кг > цитофлавин 75 мг/кг.

На модели ОГТГ установлено, что введение ФДЭС (дозы 50 и 75 мг/кг) способствовало выраженному увеличению продолжительности жизни мышей на 83,2 и 74,2% соответственно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,005$), эффект был сопоставим с амтизолом (доза 50 мг/кг) ($p < 0,05$), однако уступал цитофлавинову (доза 600 мг/кг) ($p < 0,05$). По убыванию антигипоксической активности препараты можно расположить в следующей последовательности: цитофлавин 600 мг/кг > ФДЭС 50 мг/кг > ФДЭС 75 мг/кг = амтизол 50 мг/кг > амтизол 25 мг/кг.

Известно, что метаболическая энергокоррекция и антигипоксическая активность цитофлавина обусловлена взаимодействующим действием янтарной кислоты, инозина, никотинамида и рибофлавина. Янтарная кислота не только является субстратным антигипоксантом – интермедиатом цикла трикарбоновых кислот, но и активирует специфические рецепторы (SUCNR1), сопряженные с G-белками, запуская каскад внутриклеточных адаптационных изменений. Рибофлавин за счет своих коферментных свойств увеличивает активность сукцинатдегидрогеназы и оказывает не прямое антиоксидантное действие (за счет восстановления окисленного глутатиона). Предполагается, что входящий в состав никотинамид активирует NAD-зависимые ферменты

системы, однако этот эффект менее выражен, чем у NAD. За счет инозина достигается увеличение содержания общего пула пуриновых нуклеотидов, необходимых не только для ресинтеза макроэргов (АТФ и ГТФ), но и вторичных мессенджеров (цАМФ и цГМФ), а также нуклеиновых кислот. Определенную роль может играть способность инозина несколько подавлять активность ксантиноксидазы, уменьшая тем самым продукцию высокоактивных форм и соединений кислорода [1, 7, 8, 10].

Полученные в исследовании данные по фармакологической активности цитофлавина на различных моделях гипоксии подтвердили ранее проведенные исследования по изучению антигипоксической активности раствора цитофлавина. Так, внутрибрюшинное введение препарата мышам в дозе 1 мл/кг показало его антигипоксическое действие только в баро- и гермокамере у мышей, в то время как на моделях острой гемической и гистотоксической гипоксии оно было незначительным [13]. Очевидно, на этих, наиболее «жестких» моделях гипоксии, действие сукцината как интермедиата цикла трикарбоновых кислот не успевает развиваться из-за подавления и ФАД-зависимых ферментов в условиях очень жесткого дефицита кислорода или блокады электрон-транспортной цепи.

Амтизол активно проникает в митохондрии, уменьшает угнетение дегидрогеназ цикла Кребса, предотвращает разобщение окисления и фосфорилирования, увеличивает продукцию АТФ. Кроме того, препарат снижает кислородный запрос тканей за счет ингибирования митохондриального и свободно-

радикального окисления и увеличивает использование кислорода в энергопродуцирующих окислительных реакциях в митохондриях. Амтизол активирует гликолиз с увеличением анаэробного образования АТФ, уменьшает образование лактата и увеличивает его утилизацию в реакциях глюконеогенеза, обеспечивает ресинтез углеводов, ослабляя проявления метаболического ацидоза [1, 6].

Новое фармакологическое средство состоит из этилового производного аминокэтанола, к которому присоединены молекулы бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислот. Аминокэтанола, являясь прекурсором холина, обеспечивает синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран и повышает биодоступность кислот в клетку [3].

Бутандиовая и транс-этилен-1,2-дикарбоновая кислоты реализуют свои эффекты через специфические орфаные рецепторы (SUCNR1, HCA2) на глиальных клетках, а также повышают устойчивость нейронов к гипоксии через метаболические пути – в первую очередь, энергопродуцирующие. Кроме того, бутандиовая и транс-этилен-1,2-дикарбоновая кислоты способствуют восполнению фонда сукцината и фумарата соответственно в цикле Кребса и увеличению образования АТФ в клетках. Однако в условиях «жесткой» гипоксии дефицит кислорода, лимитирующий скорость окисления всех субстратов, снижает ценность сукцината. В этих условиях инверсивные превращения фумарата выполняют роль триггера, который, в зависимости от концентрации кислорода, регулирует течение

конечных реакций цикла Кребса в прямом «сукцинат-фумарат-малат» либо в обратном «малат-фумарат-сукцинат» направлениях, и сопровождаются синтезом АТФ. При дефиците кислорода фумарат, восстанавливаясь ФАД·Н₂-группой сукцинатдегидрогеназы, превращается в сукцинат и освобождает новые порции окисленной формы ФАД. Принимая восстановительные эквиваленты от НАД-Н, ФАД способствует снятию гипертонности НАД-звена дыхательной цепи и синтезу АТФ в бескислородной среде. К тому же, образование в этих реакциях окисленной формы НАД запускает также и механизм гликолитической продукции АТФ [9].

В реализации антигипоксической активности нового соединения аминокэтанола существенную и достоверную роль играют как анионная часть (кислотный остаток), так и эфирное производное аминокэтанола и дикарбоновые кислоты, что было показано ранее для соединений сходной структуры [12].

Выводы

1. Установлена эффективная антигипоксическая доза нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновыми кислотами, которая при пероральном однократном введении составляет 75 мг/кг.

2. По своему антигипоксическому действию новое производное аминокэтанола с дикарбоновыми кислотами (доза 75 мг/кг) на моделях острой гипоксической, гемической и гистотоксической гипоксии превосходит референсный препарат цитофлавин (доза 600 мг/кг) и сопоставимо с эффектом амтизола (доза 50 мг/кг).

Список литературы

1. *Афанасьев В.В., Лукьянова И.Ю.* Особенности применения цитофлавина в современной клинической практике. – СПб. 2010. 80 с.
2. *Гайворонская В.В., Оковитый С.В., Колышев И.Ю., Шустов Е.Б., Болотова В.Ц.* Влияние бемитила, этомерзола и яктона на процессы регенерации после частичной гепатэктомии // Биомедицина. 2013. № 1. С. 16-21.
3. *Каркищенко В.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н. Шустов Е.Б., Котенко К.В., Оковитый С.В.* Очерки спортивной фармакологии. Т. 2. Векторы фармакопротекции / Под ред. Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба. - СПб: Изд-во Айсинг. 2014. 448 с.
4. *Лукьянова Л.Д.* Методические рекомендации к экспериментальному изучению препаратов, предназначенных для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. - М., Б.и. 1990. 18 с.
5. *Лукьянова Л.Д.* Современные представления о биоэнергетических механизмах адаптации к гипоксии // Нур. Med. J. 2002. Т. 10. № 3-4. С.30-43.
6. *Оковитый С.В.* Клиническая фармакология антигипоксантов. Ч. 1. Вып. 6. 2004. «ФАРМ-индекс-Практик». С. 30-39.
7. *Оковитый С.В., Радько С.В., Шустов Е.Б.* Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 9. С. 24-28.
8. *Саватеева-Любимова Т.Н., Лесиовская Е.Е., Сивак К.В.* Гемато-, нефро- и гепатопротективные эффекты цитофлавина и настойки семян лимонника при интоксикации аминокэтанола // Медицина экстремальных ситуаций. 2008. № 3(25). С.68-75.
9. *Слепнева Л.В., Хмылова Г.А.* Механизм повреждения энергетического обмена при гипоксии и возможные пути его коррекции фумаратсодержащими растворами // Трансфузиология. 2013. Т. 14. № 2. С. 49-65.
10. *Суханов Д.С., Запутанов В.А., Смагина А.Н.* Антигипоксанты в современной клинической практике // Клиническая медицина. 2012. № 9. С. 63-68.
11. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
12. *Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Оковитый С.В., Болотова В.Ц., Юсковец В.Н.* Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием // Биомедицина. 2015. № 1. С. 18-23.
13. *Яснецов В.В., Просвирова Е.П., Цублова Е.Г., Яснецов Вик.В., Мотин В.Г., Карсанова С.К.* Сравнительное исследование противогипоксического, нейропротекторного и обезболивающего действия сукцинатсодержащих препаратов // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2012. Т. 46. № 6. С. 41-45.
14. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg, 1986.
15. *Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., et al.* G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery // Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 2014. Vol. 34. No. 2. P. 285-293.

Experimental study of antihypoxic activity of a new derivative aminoethanol

I.A. Titovich, V.Ts. Bolotova

Antihypoxic activity was studied of new compounds of aminoethanol with butanediol and trans-ethylene-1,2-dicarboxylic acids (FDES) on the model of acute normobaric, hemic and histotoxic hypoxia. Antihypoxic effect FDES (dose 50 mg/kg and 75 mg/kg) was superior to the effect of citoflavin (dose 75 mg/kg and 600 mg/kg) and was comparable the effect of amtizol (dose 50 mg/kg).

Key words: acute normobaric hypoxia, acute hemic hypoxia, acute histotoxic hypoxia, hypoxic chamber, cytoflavin, amtizol.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

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

Рубрикация журнала

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

Общие требования к оформлению

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

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

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

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

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

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

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

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

Все рукописи направляются на внешнее рецензирование.

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

Рукописи направлять по адресу:

143442 Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые Горы, вл. 1. ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, редакция журнала «Биомедицина».

Электронный адрес для переписки с редакцией:

sinayva@yandex.ru или scbmt@yandex.ru

Телефон редакции: 8 (495) 561-52-64.

Подробные требования к оформлению статей и электронную версию журнала можно посмотреть на сайте www.scbmt.ru.

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»
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. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируруемыми по генетическим, физиологическим, морфологическим показате-

лям 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-коричневый окрас шерсти, используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях, для изучения нарушений вестибулярного и слухового аппаратов;

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

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

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

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

– крысы **W1STAR** – белого окраса, 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 р-н, 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

