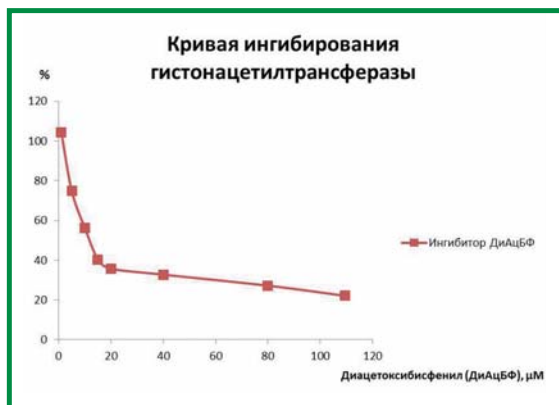


БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ



Уважаемые коллеги!
Сердечно поздравляю Вас
с Новым годом и Рождеством!

Мы рады сообщить о результатах проведенных выборов в Российскую академию наук. Поздравляем ВОЕВОДУ Михаила Ивановича с избранием в действительные члены РАН, СЫЧЕВА Дмитрия Алексеевича и ЦЫГАНКОВА Бориса Дмитриевича с избранием в члены-корреспонденты РАН.

В 2016 году мы публиковали статьи, соответствующие основным рубрикам журнала: новые биомедицинские технологии, методы биомедицинских исследований, релевантное и альтернативное биомоделирование, доклинические исследования. Как обычно, мы уделяли особое внимание статьям молодых ученых, а также работам, результаты которых были представлены на ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», проходящей в НЦБМТ ФМБА России. В журнале были опубликованы материалы исследований, выполненных при поддержке грантов РФФИ.

Желаю всем крепкого здоровья, новых ярких статей, успехов в научной работе.

Главный редактор
журнала «Биомедицина»
академик Н.Н.Каркищенко

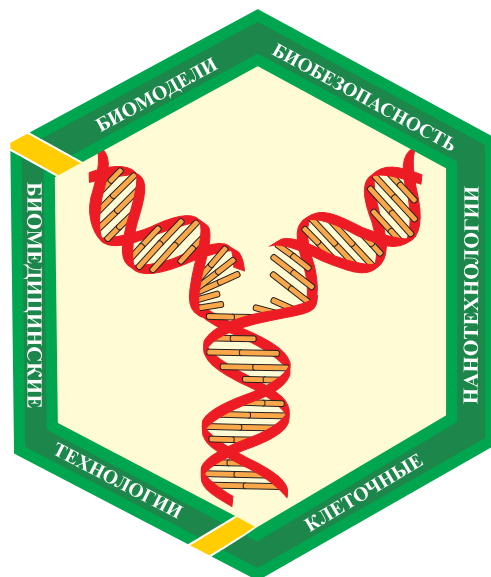
Научный журнал.

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. Матвеев, Светлые горы МО, **А.Н. Мурашѐв**, Пушкино 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. Влах**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск,
А.М. Дыгай, Томск, **А.Л. Зефир**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан,
В.Г. Кукес, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **Ю.С. Макляков**, Ростов-на-Дону,
А.И. Мирошников, Пушкино 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 13.12.2016
Тираж 3 000 экз.

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

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

- В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Д.В. Хвостов, Н.В. Петрова, Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.О. Ревякин**
 Регуляция активности систем ацетилирования в процессах канцерогенеза: от фенотипа к эпигенетике4
- А.В. Моргун, В.В. Салмин, Ю.А. Успенская, Е.А. Тепляшина, А.Б. Салмина**
 Микрофлюидные технологии в изучении и моделировании гематоэнцефалического барьера.....22

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

- В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, И.А. Берзин, Ю.В. Фокин, О.В. Алимкина**
 Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой34
- А.Г. Берзина, Н.В. Станкова, Л.И. Ульянова, Н.Б. Гамалея, Г.Д. Капанадзе**
 Использование мини-свиней светлогорской популяции в качестве биомодели для изучения иммунного ответа на введение иммуноглобулина G лошади.....47
- Я.В. Русских, Е.Н. Чернова, Е.И. Афонина, З.А. Жаковская, Е.В. Федорова, В.А. Островский**
 Метаболиты цианобактерий: компьютерный прогноз биологической активности неосакситоксина, гониатоксина II и аэругинозида 126A.....54

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- И.Р. Гарипова, З.Р. Хисматуллина**
 Анализ морфометрических параметров в ядрах переднего отдела миндалевидного комплекса мозга с учетом гендерных особенностей65
- И.А. Дьяченко, В.А. Паликов, Ю.А. Паликова, Г.И. Белоус, Е.А. Калабина, Е.С. Садовникова, Е.А. Рассказова, И.Н. Кравченко, Т.Ю. Жармухамедова, А.Н. Мурашев**
 Изучение эффективности природных лигандов протоноактивируемых рецепторов на биомодели соматической боли.....69
- А.М. Зыбина, К.Н. Куличенкова, В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина, К.Р. Аббасова**
 Влияние Р-гликопротеина на транспорт противосудорожных средств в головной мозг77
- О.В. Остапенко**
 Влияние омега-3-полиненасыщенных жирных кислот на ультраструктуру гепатоцитов крыс с послеоперационным гипотиреозом и заместительной гормональной терапией.....86
- Н.С. Тропская, И.Г. Шашкова, Т.В. Черненькая, Т.С. Попова, Г.Д. Капанадзе**
 Влияние кислотности желудочного сока на микрофлору кишечника92

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, D.V. Khvostov, N.V. Petrova, G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin**
Regulation of acetylation systems in carcinogenesis processes: from phenotype to epigenetics.....4
- A.V. Morgun, V.V. Salmin, Y.A. Uspenskaya, E.A. Teplyashina, A.B. Salmina**
Microfluidic technologies in studying and modelling the blood-brain barrier22

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, I.A. Berzin, Yu.V. Fokin, O.V. Alimkina**
Features interpretation of laboratory animal health indicators in swimming tests with load34
- A.G. Berzina, N.V. Stankova, L.I. Ul'yanova, N.B. Gamaleyа, G.D. Kapanadze**
Svetlogorsk mini-pigs as a biomodel for studying the immune response of the horse immunoglobulin G....47
- Ya.V. Russkikh, E.N. Chernova, E.I. Afonina, Z.A. Zhakovskaya, E.V. Fedorova, V.A. Ostrovskiy**
Cyanobacterial metabolites: computer-aided prediction of biological activity spectra of neosaxitoxin, gonyautoxin II and aeruginoside 126A54

BIOMEDICAL METHODS

- I.R. Garipova, Z.R. Khismatullina**
Analysis of morphometric parameters in the nuclei of the anterior amygdala complex account with gender specific.....65
- I.A. Dyachenko, V.A. Palikov, Yu.A. Palikova, G.I. Belous, E.A. Kalabina, E.S. Sadovnikova, E.A. Rasskazova, I.N. Kravchenko, T.Yu. Zharmukhamedova, A.N. Murashev**
Study the efficiency of a natural ligand of a protono-activated receptors on biomodels of somatic pain69
- A.M. Zybina, K.N. Kulichenkova, V.Yu. Balaban`yan, S.E. Gel`perina, K.R. Abbasova**
The influence of P-glycoprotein on the transport of anticonvulsants in the brain77
- O.V. Ostapenko**
The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the ultrastructure of hepatocytes of rats with postoperative hypothyroidism and hormone replacement therapy86
- N.S. Tropkaya, I.G. Shashkova, T.V. Chernen`kaya, T.S. Popova, G.D. Kapanadze**
Influence of gastric acidity on intestinal microflora92



Регуляция активности систем ацетилирования в процессах канцерогенеза: от фенотипа к эпигенетике

В.Н. Каркищенко¹, М.С. Дуля¹, Д.В. Хвостов¹, Н.В. Петрова¹,
Г.И. Пронина^{1,2}, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹

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

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

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

Изучена роль процессов ацетилирования в фенотипических и эпигенетических механизмах экспрессии генов, не влияющих на исходную последовательность, при действии проканцерогенов и антибластомных средств.

На основе полученных данных *in vitro* эксперимента по ферментативной активности, экспрессии гена *NAT2^{hot}* и эпигенетического фактора действия установлено эффективное ингибирующее действие производных бисфенила (нитрозобисфенила и диацетоксибисфенила), а также цисплатина по ферменту N-ацетилтрансферазы NAT2 человека. Для выбранных ингибиторов изучена концентрационная зависимость ферментативной активности и определено значение концентрации полумаксимального ингибирования IC₅₀. Создана новая модель *in vitro* оценки ацетилирующей способности, а также определения кинетических параметров ацетилирования субстратов, активаторов и ингибиторов NAT. Модель предлагается для скрининга веществ, влияющих на процесс ацетилирования. С её помощью, а также на моделях трансгенных мышей, несущих *NAT2*-ген человека и аксолотлей, установлен характер взаимодействия в системе «ингибитор – активность фермента», «ингибитор – экспрессия гена» и предсказан уровень токсических эффектов ингибиторов NAT на ферментативном, генетическом и эпигенетическом уровнях.

Экспериментально на примере молекул-токсикантов представлена модель изучения эпигенетических факторов воздействия производных бисфенила и цисплатина в регуляции эпигенетических программ нарушения регенерации удаленных конечностей аксолотлей, выражающихся в замедлении роста и изменениях в формировании пальцев. Наблюдается замедление эритропоэза и усиление лейкопоэза. Цисплатин и производные бисфенила вызывают увеличение доли эозинофилов и содержания лизосомального катионного белка в нейтрофилах и значительное увеличение процента моноцитов, что в целом подтверждает развитие онкологических процессов любой локализации.

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза (NAT), трансгенные гуманизированные мыши по гену *NAT2* и *NAT1* человека, экспрессия гена *NAT2*, эпигенетика, ацетилирование, канцерогенез, ингибиторы NAT, аксолотли, регенерация, эритропоэз, лейкоцитарная формула.

Введение

Химические канцерогены ответственны за возникновение до 90% всех злокачественных опухолей человека. Канцерогенез в настоящее время большинством исследователей рассматривается как многостадийный эпигенетический процесс, в котором следует различать 3 главные стадии: инициацию, промоцию и прогрессию. Принято считать, что существуют 2 типа воздействующих агентов, различающихся по механизмам своего действия, – инициаторы и промоторы [1].

Эпигенетические модификации обеспечивают контроль существования и развития дифференцированных клеток организма. Под влиянием ксенобиотиков и токсикантов нарушается процесс нормального регулирования развития клеток, которые малигнизируются и превращаются в недифференцированные и, на крайней стадии, раковые клетки. Существующие противоопухолевые препараты направляют свое действие на подавление неправильных эпигенетических программ.

Большинство выраженных канцерогенов метаболизируются с участием ферментов I и II фазы биотрансформации и обладают как иницирующими, так и промоторными свойствами [2, 3, 22]. Многие промоторы проявляют канцерогенную активность, если их применять в высоких дозах и достаточно долго. К соединениям, канцерогенное действие которых обусловлено наличием в структуре аминогруппы, относится широкий ряд химических веществ: ароматические амины, аминоазосоединения, нитроарены. Многие противоопухолевые препараты, включая цисплатин и его аналоги, вмешиваются в процессы ацетилирования на всех уровнях регуляции (активности ферментов, экспрессии генов и эпигенетическом) и являются ингибиторами N-ацетилтрансфераз.

Цисплатин и его аналоги (рис. 1) – широко используемая в клинической практике группа противоопухолевых фармакологических средств [23].

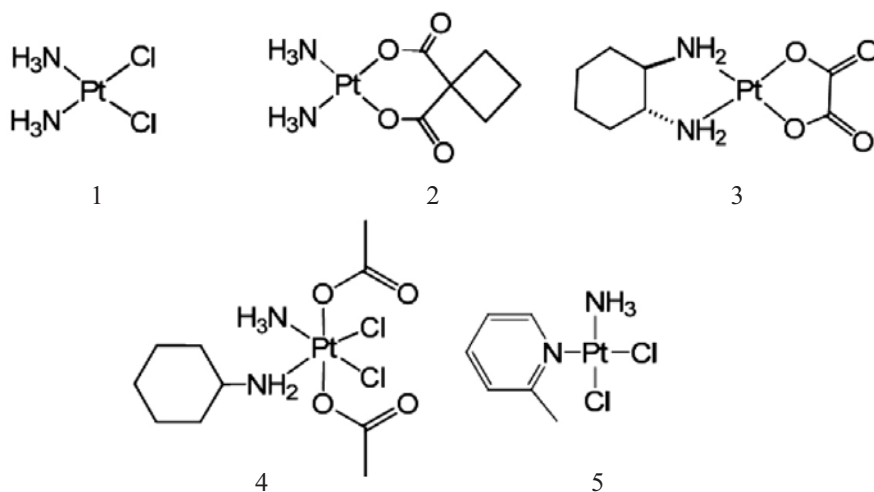


Рис. 1. Цисплатин (1) и его производные: карбоплатин (2), оксалиплатин (3), саграплатин JM216 (4), пикоплатин (5).

Их действие основано на повреждении ДНК, индуцированных им функциональных нарушениях, в конечном итоге приводящих к апоптозу.

Успешное применение цисплатина в клинике, с одной стороны, и высокая токсичность соединений платиновой группы, с другой стороны, послужили основой для развития ряда работ, посвященных разработке платиновых комплексов и исследованию их противоопухолевых свойств.

К настоящему времени синтезированы тысячи платиновых комплексов различной структуры, но из них только пять соединений внедрены в клиническую практику. Несколько соединений проходят клинические испытания, в т.ч. первый платиновый комплекс перорального применения – JM216 (сатраплатин) [23].

Ранее в работе [19] установлено проонкогенное действие бисфенила и, особенно, его хлорированных производных. Полихлорированные бисфенилы (ПХБ) относятся к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ), мониторинг которых в воздухе, воде и

почве является обязательным вследствие их высокой токсичности для окружающей среды и здоровья человека. Доказано многогранное повреждающее действие этих веществ на ряд органов и систем вместе со способностью к длительному накоплению в жировой ткани.

Опасность производных бисфенила для здоровья человека заключается, прежде всего, в том, что они являются мощными факторами подавления иммунитета. Кроме того, поступление ПХБ в организм провоцирует развитие рака, поражений печени, почек, нервной системы, кожи (нейродермиты, экземы, сыпи). Самое опасное влияние ПХБ на человека заключается в их мутагенном действии, что негативно сказывается на здоровье последующих поколений людей.

Помимо этого, наше внимание к выбору цисплатина как молекулы-ингибитора N-ацетилтрансферазы вызвано высоким сродством и реакционной способностью металлокомплексов к трансферазам с образованием дезактивированных белковых аддуктов (рис. 2).



Рис. 2. Биохимические взаимодействия ингибитора цисплатина в клетке.

Таким образом, **цель** исследования состояла в изучении механизмов влияния антибластомных и проонкогенных соединений на активность систем ацетилирования в процессах канцерогенеза на ферментативном, генетическом и эпигенетическом уровнях.

Материалы и методы

Нами был выбран ряд наиболее реакционноспособных соединений в качестве молекул-кандидатов в ингибиторы активности NAT2: 1. Цисплатин (ЦП); 2. Нитрозобисфенил (НОБФ); 3. Диацетоксибисфенил (ДиАцБФ) (рис. 3).

Синтез производных бисфенила проводили в соответствии с разработанной нами ранее методологией.

Задачи *in vitro* экспериментов заключались в оценке фенотипа ацетилирующей способности (активности ферментов N-ацетилтрансфераз испытуемых животных) и оценке ингибирующего действия активных молекул-кандидатов на ткани печени трансгенных линий NAT2^{hom} и NAT1^{hom} (НЦБМТ ФМБА России) лабораторных мышей, а также в формировании основных аспектов биомоделирования процессов II фазы биотрансформации на трансгенных линиях мышей различного типа ацетилирования.

Объектом исследований служили биоматериалы печени мышей трансгенных линий NAT2^{hom} и NAT1^{hom} (НЦБМТ ФМБА России), чувствительных к факторам канцерогенеза в целом и воздействию ксенобиотиков (ацетилированию), в частности.

Биологический материал тканей лабораторных животных (печень) подвергался дальнейшей пробоподготовке, выделению белковой фракции и фракции, содержащей РНК, для последующей оценки генной экспрессии.

Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля согласно протоколу производителя к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Москва). Синтез первой цепи кДНК проводили согласно указаниям инструкции «Комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК РЕВЕРТА-L» («ИнтерЛабСервис», Москва). Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии гена NAT2 человека у трансгенных мышей проводили методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR, США) с помощью детектирующего ам-

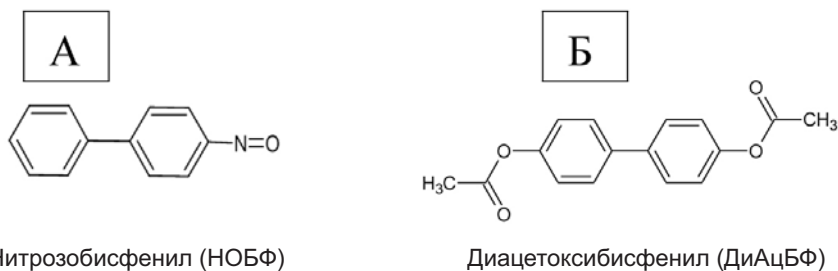


Рис. 3. Структурные формулы молекул ингибиторов – производных бисфенила: нитрозобисфенил (А) и диацетоксибисфенил (Б). Синтез произведен в НЦБМТ ФМБА России.

плификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) и специфических праймеров и зондов к гену *NAT2* человека у трансгенных мышей (далее – *NAT2hom*) («Синтол», Россия). Праймеры для последовательностей *NAT2hom* и *GAPDH* (гену «домашнего хозяйства») были подобраны с помощью программы Vector NTI. Последовательности мРНК *NAT2hom* и *GAPDH* были взяты в базе данных NCBI GenBank и синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва).

Основное лабораторное оборудование, применяемое при определении активности и экспрессии N-ацетилтрансферазы, дало возможность выполнять все необходимые этапы: введение испытуемых молекул-кандидатов лабораторным животным, забор и подготовку биоматериалов (печени) к исследованию, пробоподготовку гомогенатов всех тканей образцов в буфере для гомогенизации, определение общего содержания белка в полученных гомогенатах печени. Дополнительным является анализ ПААГ гель-электрофореза на общее профилирование по молекулярной массе белковых фракций гомогената и подтверждение содержания диапазона молекулярных масс NAT.

Основное оборудование и материалы: спектрофотометр 96-луночный Multiscan GO («Thermo Scientific»), амплификатор в реальном времени Real-Time CFX96 Touch («Bio-Rad»), высокоскоростной гомогенизатор SilentCrusher («Heidolph»), камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra («Bio-Rad»), холодильное оборудование (-80°C).

Введение рассчитанного количества растворов ингибиторов и деионизованной воды в качестве контроля выполня-

ли для каждой испытуемой группы (линии) животных (5-10 особей в группе).

Далее определяли уровни ферментативной ацетилирующей способности N-ацетилтрансферазы и экспрессии гена *NAT2hom* у всех испытуемых животных в ответ на токсическое воздействие ингибиторов.

Дозировка ингибиторов составляла 1/5-1/10 ЛД₅₀ в диапазоне концентраций 5-50 мг/кг. В качестве контроля использовалось введение деионизованной воды.

Для определения эпигенетического эффекта ингибиторов использовали набор Histone Acetyltransferase Inhibitor Screening (Abcam, ab133099). Для выделения из ткани печени испытуемых животных обогащенной белковой фракции гистонов использовали набор Histone Extraction Kit (Abcam, ab113476).

В серии последующих экспериментов определяли остаточную ферментативную активность N-ацетилтрансферазы NAT2 и NAT1 методом прямой УФ-спектрофотометрии по Элману с использованием в качестве детектирующего агента 4-нитрофенилацетата (PNPA), выступающего в качестве донора ацетильной группы. Избирательными по NAT2 субстратами в *in vitro* определениях использовали водные растворы селективного NAT2 специфического субстрата сульфаметазина с концентрацией 5 мМ. Избирательными по NAT1 субстратам в *in vitro* определениях использовали водные растворы селективного NAT1 специфического субстрата пара-аминобензойной кислоты (ПАБК) с концентрацией 5 мМ.

Аликвоту субстрата объемом 100 мкл вносили в каждую измерительную лунку 96-луночного планшета, кроме

контрольных лунок. Контрольные измерения проводили без добавок субстрата и фермента. Источник ацетильной группы (4-нитрофенилацетат, PNPA) концентрацией 5 мМ (сток) объемом 50 мкл вносили последним после предварительной преинкубации фермента и субстрата. Планшеты закрывали пленкой и инкубировали в измерительной части спектрофотометра при 37°C 5 мин.

Измерение проводили в соответствии с методикой спектрофотометрического кинетического метода (по Эллману). После инкубации в течение 5 мин при 37°C проводили серию считываний с интервалом в 30 с на протяжении 60 мин. Результаты реакции учитывали, измеряя светопоглощение при 405 и 412 нм. Дальнейшую обработку данных выполняли в пакете Microsoft Excel.

Оценку активности проводили исходя из полученных значений оптической плотности за вычетом бланковых значений (без кофермента 4-нитрофенилацетата PNPA, субстрата и гомогената в соответствующих лунках при дизайне 96-луночного планшета).

Для определения удельной ферментативной активности величину, выраженную в мкМ/мин, соотносили с долей белка (мг) в каждом из изучаемых образцов (растворах белковых гомогенатов).

Объектами исследования *in vivo* эксперимента являлись аксолотли, т.к. у них относительно быстро происходит регенерация утраченных конечностей. Аксолотли массой 15-16 г длиной 12,0-12,5 см содержались в 160-литровых аквариумах с водоочисткой и принудительной аэрацией. Кормление осуществлялось личинками хирономид по поедаемости.

У экспериментальных объектов удалялись передние конечности до плечевого сустава (рис. 4).

Аксолотлям опытных групп вызывали медикаментозное нарушение регенерации введением растворов молекул-ингибиторов в концентрации 0,5 мг/мл.

У экспериментальных объектов после удаления передних конечностей до плечевого сустава процесс регенерации оценивали по скорости роста культы ампутированной конечности по стадиям (рис. 4).

У экспериментальных гидробионтов делали мазки крови (по 2 шт. от каждого): один для лейкограммы, второй для цитохимической реакции определения катионного белка [8].

Анализ показателей эритропоза и дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови осуществлялись микроскопически на



Здоровая передняя конечность



Культя конечности после ампутации

Рис. 4. Удаление конечности аксолотля в эксперименте.

цифровом микроскопе Optika DM 15. Уровень гемопоэза оценивался по доле незрелых форм эритроцитов.

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась цитохимическим методом в реакции с бромфеноловым синим [10], адаптированным для гидробионтов [7, 8]. Определялся средний цитохимический коэффициент (СЦК) содержания неферментного катионного белка в нейтрофилах крови.

При определении неферментного лизосомального катионного белка в нейтрофилах исследуемые клетки делили на четыре группы (0–3 балла) по степени их фагоцитарной активности: 0 – гранулы катионного белка отсутствуют, 1 – единичные гранулы, 2 – гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы, 3 – гранулы занимают 1/2 цитоплазмы и более.

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) [17] рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \times \text{N}_0 + 1 \times \text{N}_1 + 2 \times \text{N}_2 + 3 \times \text{N}_3) / 100,$$
 где $\text{N}_0, \text{N}_1, \text{N}_2, \text{N}_3$ – число нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

Результаты и их обсуждение

Реакции N-ацетилирования посредством ферментов N-ацетилтрансфераз являются одной из ключевых стадий детоксикации, тогда как O-ацетилирование из N-гидроксилированных ариламинов или внутримолекулярного N,O-переноса ацильной группы N-арилгидроксилированных кислот приводит к биоактивации. Получающиеся ацетилированные сложные эфиры нестабильны и спонтанно деградируют в форму арилнитроний ионов, которые являются высокоэлектрофильными соединениями и способны сформировать ковалентные аддукты с ДНК и инициировать канцерогенез (рис. 5).

Регуляция активности ферментов осуществляется путём их взаимодействия с различными биологическими компонентами или чужеродными соединениями, которые выступают регуляторами ферментов. Они могут либо ускорять (активировать), либо замедлять (ингибировать) ферментативную реакцию ацетилирования [6].

В дополнение к O-ацетилированию метаболиты N-гидроксиариламинов мо-

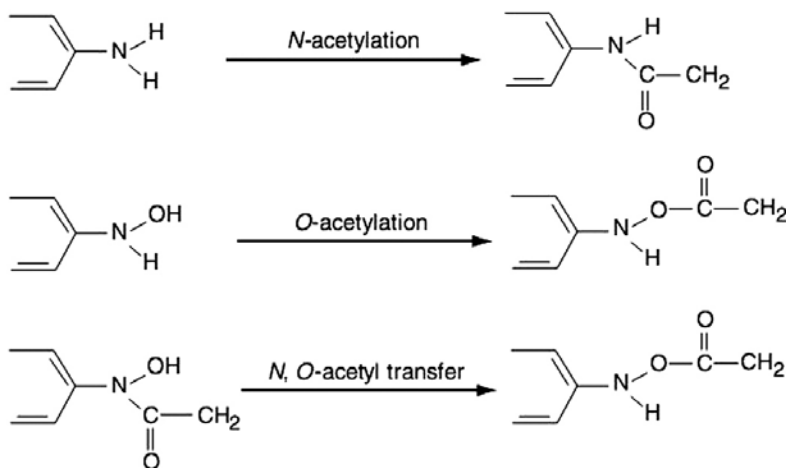


Рис. 5. Направления реакций, катализируемые N-ацетилтрансферазой (NAT).

гут также подвергнуться окислению в форму нитрозоаренов, которые способны вступать в реакции с нуклеофильными тиольными группами в белках. Известно, что реактивные ариламинметаболиты могут действовать как необратимые ингибиторы NAT1 [14].

Ранние исследования продемонстрировали, что под воздействием субстратов N-ариламингидрокси-производных (на примере N-гидрокси-4-аминобисфенила, а также ряде других структурно подобных N-арилгидроксимов) ферментативная система дезактивируется и функционирует в связанном с необратимыми субстратами состоянии, т.е. практически ингибирована.

Деление на инициаторы и промоторы канцерогенеза в определенной степени соответствует делению канцерогенов на генотоксические и негенотоксические [16].

Соединения генотоксического класса взаимодействуют с компонентами генома клетки, вызывая мутации ДНК. Генотоксические вещества могут быть разделены на две группы: прямодействующие канцерогены и соединения, не канцерогенные в исходной форме, но активирующиеся в клетке под действием соответствующих ферментов (непрямые канцерогены).

Канцерогены прямого действия при растворении (в первую очередь, в воде) распадаются с образованием высокоактивных производных, содержащих избыточный положительный заряд. Электрофильная группа взаимодействует с отрицательно заряженными (нуклеофильными) группами молекулы ДНК, образуя стабильную ковалентную связь. При репликации нуклеотид, связанный с остатком канцерогена, может быть не-

правильно считан ДНК-полимеразой, что приводит к мутации.

Канцерогены непрямого действия являются малореакционноспособными соединениями. В процессе метаболизма они подвергаются ферментативной активации с образованием высокоактивных электрофильных метаболитов, способных взаимодействовать с нуклеофильными группами ДНК.

Канцерогены непрямого действия метаболизируются в клетке специальными ферментными системами. Большинство проканцерогенов гидрофобны, поэтому способ их выведения из клетки сводится, в основном, к повышению водорастворимости. При этом первым событием в цепи метаболических превращений является окисление исходной молекулы. Эта реакция осуществляется, в основном, изоформами цитохрома P450. Продукты окисления подвергаются дальнейшему превращению с образованием соединений, которые еще легче выводятся из клетки и организма. Этот этап осуществляется эпоксидгидролазами, глутатион-S-трансферазами, N,O-ацетилтрансферазами, глюкуронилтрансферазами и др. ферментами II фазы биотрансформации [15].

Наряду с основным процессом детоксикации некоторые соединения в ходе этих реакций активируются, превращаясь в непосредственные канцерогены – высокореактивные производные, ковалентно связывающиеся с клеточными белками и нуклеиновыми кислотами.

Как правило, электрофильные метаболиты образуются на первом этапе окисления проканцерогена микросомными монооксигеназами, которые локализованы, главным образом, в эндоплазматическом ретикулуме и имеют в

качестве терминального звена цитохром P450 [22].

Следует заметить, что канцерогенное действие одного и того же соединения могут обеспечивать несколько механизмов.

Фенотип ацетилирования биоматериалов тканей неодинаков и демонстрирует различную остаточную активность после воздействия изучаемыми молекулами-ингибиторами.

Данные кинетического эксперимента автоматически пересчитывали в активность А (мкмоль/мин/мг) с учетом доли общего белка для каждой пробы.

В группе исследуемых образцов, отвечающих в *in vitro* эксперименте на введение ряда препаратов (ЦП, НОБФ, ДиАцБФ) трансгенным мышам (NAT2hom и NAT1hom) установлено ингибирующее действие на характер ацетилирования (активность). Высокий интактный уровень активности ацетилирования у трансгенных мышей NAT2hom и NAT1hom, отличающий их от животных инбредных линий, коррелирует с максимально выраженным

эффектом ингибирования активности NAT2 под воздействием ингибиторов-производных бисфенила. В ходе исследования установлено максимальное ингибирующее действие (82,3%) для диацетоксибисфенила (0,1 мМ) (рис. 6).

Нами предложен термин «сверхбыстрого» типа ацетилирования для линии животных NAT2hom с повышенной устойчивостью к токсикантам (в рамках выбранных ингибиторов) и резко выраженным характером фенотипа ацетилирования (*in vitro*), превышающим активность ацетилирования у сравниваемых групп животных в 4 и более раз.

Для оценки ингибирующего действия цисплатина в качестве показателя эффективности лиганда при ингибирующем биохимическом или биологическом взаимодействии нами выбрана концентрация полумаксимального ингибирования IC_{50} . IC_{50} является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 50%. Этот показатель используется

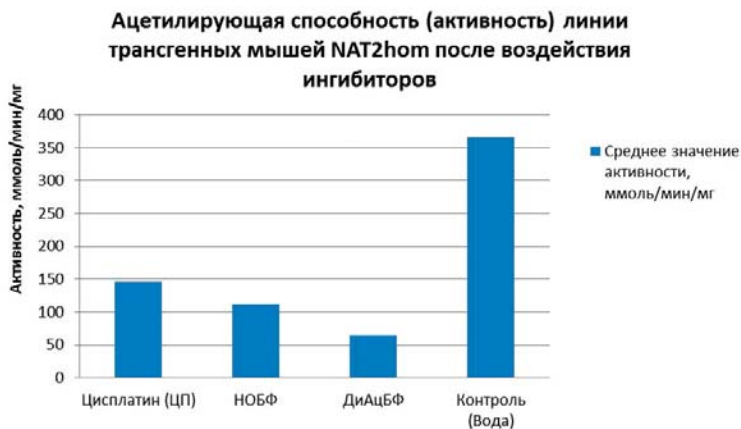


Рис. 6. Сравнительный анализ активности ацетилирования линии мышей NAT2hom («сверхбыстрого» типа ацетилирования) под воздействием ингибиторов (цисплатина, 5 мг/кг; нитрозобисфенила, 0,1 мМ; диацетоксибисфенила, 0,1 мМ) по сравнению с интактным уровнем активности контрольных животных (вода) для гомогената печени.

нами в качестве индикатора активности вещества-кандидата в фармакологических исследованиях. IC_{50} является показателем концентрации лекарственного вещества, необходимой для 50% ингибирования тестовой реакции *in vitro*. Показатель IC_{50} не является непосредственным индикатором аффинности, но является связанной с ней величиной.

В определениях ингибирующей способности цисплатина установлено, что с ростом концентрации цисплатина в индивидуальном введении в постановках на активность NAT2 наблюдается равномерный спад удельной активности во всей области изучаемых концентраций (0,10-0,50 мМ).

Регрессионный анализ экспериментальных данных позволяет использовать логарифмическую зависимость в динамике возрастания ингибирующей способности (рис. 7). Значение IC_{50} , установленное для индивидуального цисплатина, специфично на NAT2 и составило 0,25 мМ (0,075 мг/лунку).

В ходе эксперимента у линии мышей NAT2^{hom} выявлено, что молекула-кандидат ДиАцБФ (50 мг/кг) индуцирует активную экспрессию гена NAT2^{hom}, которая коррелирует со спадом ферментативной активности NAT2, а линия выбранных животных обладает выраженным фенотипом «сверхбыстрого» активного ацетилирования (рис. 6, 8).



Рис. 7. Динамика спада активности NAT2 (линия NAT2^{hom}, печень) с ростом концентрации цисплатина в индивидуальном введении в тестовой модели *in vitro*.

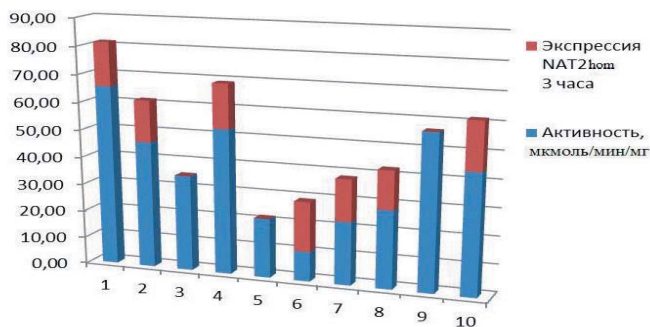


Рис. 8. Сопоставление уровня остаточной ацетилирующей способности «сверхбыстрого» фенотипа ацетилирования линии NAT2^{hom} с нормированной экспрессией гена NAT2^{hom}, индивидуально для животных, через 3 ч после введения ДиАцБФ (50 мг/кг).

Установлено, что фенотип ацетилирования биоматериалов печени испытываемых животных различен и демонстрирует различную остаточную активность после воздействия изучаемых молекул-ингибиторов.

При определении эпигенетического механизма действия выбранных молекул-токсикантов нами установлено ингибирующее влияние в широком диапазоне концентраций ингибиторов.

Типичный вид электрофореграммы для гистоновой белковой фракции после пробоподготовки приведен на рис. 9. На электрофореграмме отражена обогащенная гистоновая фракция с диапазоном молекулярной массы 12-14 кДа.

На примере диацетоксибисфенила на рис. 6 в диапазоне концентраций 10-120 мкМ отчетливо выражено ингибирующее действие производных бисфенила (рис. 10). Общее ингибирующее действие на гистонацетилтрансферазы трансгенной линии мышей NAT2^{hom} достигает 82% при концентрации ингибитора 110 мкМ.

Изучение аспектов регенерации является одной из фундаментальных задач биологии и медицины в части выявления и определения их эпигенетических механизмов [4].

Под регенерацией (в патологии) понимают восстановление целостности тканей, нарушенной каким-либо болезненным

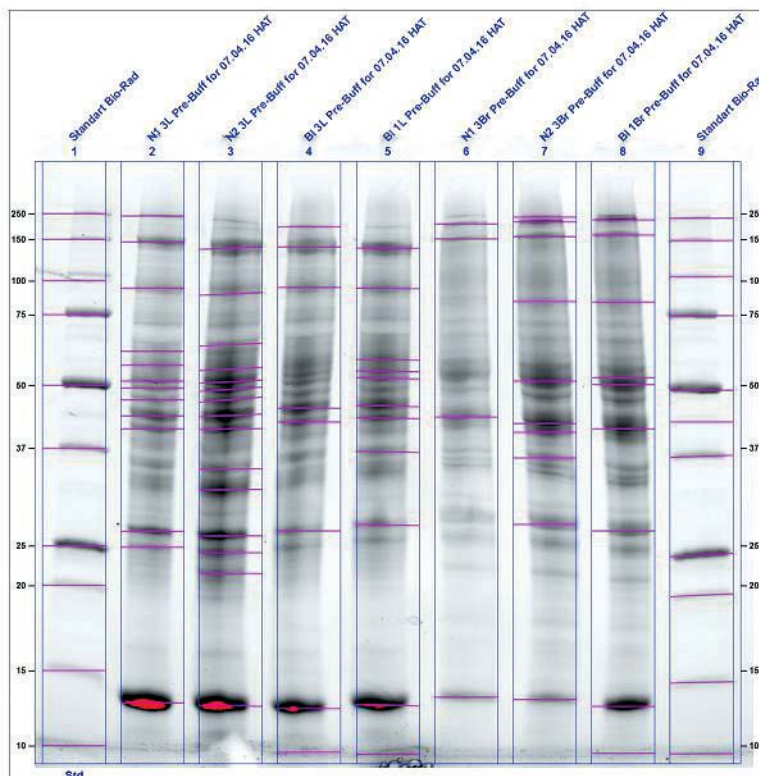


Рис. 9. Электрофореграмма белковых гомогенатов печени после выделения гистоновой фракции для определения эпигенетического фактора ацетилирования (линия мышей NAT2^{hom}).

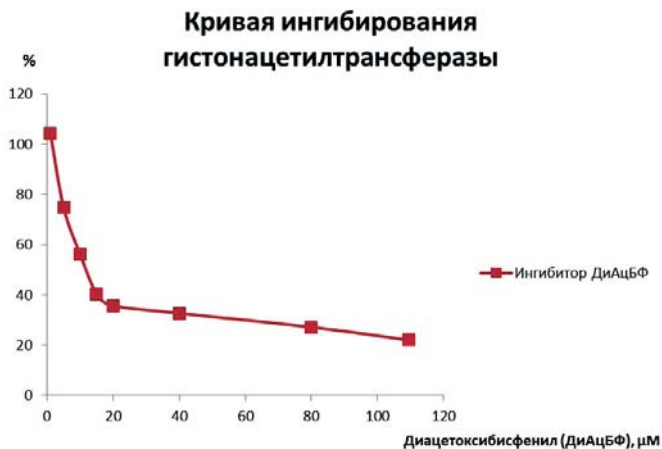


Рис. 10. Ингибирующее действие производных бисфенила на эпигенетические механизмы ацетилирования у мышей линии NAT2^{hom} (печень) в *in vitro* эксперименте.

процессом или внешним травмирующим воздействием. Восстановление происходит за счет размножения соседних клеток, заполнения молодыми клетками дефекта и последующего превращения их в зрелую ткань. Такая форма носит название репаративной (возмещающей) регенерации. При этом возможны два варианта регенерации:

1) убыль возмещается тканью того же вида, что и погибшая (полная регенерация);

2) убыль замещается молодой соединительной (грануляционной) тканью, превращающейся в рубцовую (неполная регенерация), что является не регенерацией в собственном смысле, а заживлением тканевого дефекта [13, 20].

Ранее основные стадии регенерации на примере конечности личинки мексиканской амбистомы изучены в работах [26, 4, 5]. Первой стадией является заживление раны. Наружный слой составляют клетки эпидермиса – поверхностного слоя кожи. И определенная часть клеток начинает перемещаться с культи

на поверхность раны, постепенно закрывая ее. После нескольких делений на поверхности возникает образование, которое состоит из многих слоев и именуется апикальной шапочкой. Вторая стадия – «демонтажное». Постепенно рассасываются ткани, непосредственно прилежащие к поверхности раны. Конец культи становится отеком и выпячивается наружу. Третья стадия: под апикальной шапочкой начинают накапливаться клетки, утратившие свою специализацию. На поверхности культи образуется холмик. Четвертая стадия – «рост». Лапа начинает интенсивно расти. Образуются пальцы. К концу стадии формируется уменьшенная копия нормальной лапы.

Регенерации предшествует освобождение данного участка от погибших клеток путем ферментативного их расплавления и всасывания в лимфу, кровь или путем фагоцитоза. В воспалении и регенерации поврежденных тканей ведущую роль играют макрофаги. Они, секретировав различные цитокины, регулируют скорость размножения и харак-

тер дифференцировки клеток. Установлено, что при вялотекущем заживлении ран и фиброзе количество и активность макрофагов значительно снижаются и повышается экспрессия трансформирующего фактора роста TGF- β_1 , что способствует быстрому развитию фибропластических процессов [7-11].

Способностью к регенерации обладают далеко не все ткани и не в одинаковой степени. Иногда возникающая при регенерации ткань по строению отличается от исходной (атипическая регенерация), или объем ее превышает объем погибшей ткани (гиперрегенерация). Такое течение регенерационного процесса может привести к возникновению опухолевого роста [12, 13, 17, 18, 20, 21, 24, 25].

Ранее в работе [18] показано, что регенерация конечностей у позвоночных регулируется теми же ключевыми регуляторными белками, которые управля-

ют развитием конечностей у эмбриона человека. Эти белки образуют два сигнально-регуляторных каскада, или пути (pathways), которые называются Wnt/ β -catenin и BMP – по названию ключевого участника каскада – белка BMP (bone morphogenetic protein) [18, 20].

Авторами был сконструирован вирус, в геном которого встроен ген белка Axin1. Этот белок блокирует работу Wnt-каскада. Введение вируса аксолотлю снизило способность к регенерации. У аксолотля в норме отрезанные конечности восстанавливаются полностью, однако у зараженных искусственным вирусом аксолотлей вместо лапы вырастала лишь заостренная культя без пальцев [26, 25, 11].

Наши наблюдения в экспериментах *in vivo* на аксолотлях показали, что регенерация конечностей после ампутации в опытной и контрольной группах происходила неодинаково. Динамика роста конечностей представлена в табл. 1.

Таблица 1

Динамика роста отсеченной конечности (длина, мм)

Группы	Сроки (этапы) эксперимента (наблюдений)											
	начало		Через 2 недели		Через 3 недели		Через 4 недели		Через 6 недель		Через 7 недель	
	конечность	культия	культия	апикальная часть	культия	апикальная часть	культия	апикальная часть	культия	апикальная часть	культия	апикальная часть
контроль	23	10	13	1	12	2	13	3	16	5	16	5
Цисплатин												
1 доза	20	10	11	1	12	2	14	4	15	4	16	5
2 доза	26	10	11	1	11	2	11	3	15	4	14	4
3 доза	22	10	12	2	10	1	11	2	12	3	12	4
ДиАцБФ												
1 доза	20	10	12	1	13	3	13	3	12	4	14	4
2 доза	21	10	10	1	11	2	12	2	15	4	16	5
3 доза	21	8	8	1	9	1	12	3	15	5	15	4

Различия репаративной регенерации становятся заметными уже в первые три недели после ампутации (1-2 стадии); степень изменения зависела от дозы препаратов. У опытных аксолотлей, в отличие от контроля (рис. 11А), практически не разделены базовая часть конечности и зона роста; у особей с введенным ЦП слабо гиперемирована апикальная часть (рис. 11Б); с ДиАцБФ – она прозрачная (рис. 11В).

Через 7 дней после ампутации у контрольных особей происходит отрастание нормальной конечности (рис. 11Г). В обоих вариантах опыта вместо четырех формируется только три пальца (рис. 11Д, Е).

У опытных аксолотлей замедляется эритропоэз и усиливается лейкопоэз (табл. 2). В группе животных, кото-

рым вводился ЦП, велика доля эозинофилов в лейкограмме. Происходит компенсация действия препарата, который, вероятно, вызвал активацию апоптоза. В группе с ДиАцБФ значительно увеличен процент моноцитов, что, очевидно, связано с усилением фагоцитарной активности макрофагов в процессе регенерации. Однако цитотоксичность макрофагов (нейтрофилов), судя по накоплению лизосомального катионного белка, изменилась незначительно по сравнению с контролем. Исключение составляет группа животных, у которых показатель уменьшился (вводилась небольшая доза препарата). В группах с ЦП, напротив, усиливается микробицидная система нейтрофила (по СЦК катионного белка в лизосомах).



Рис. 11. Регенерация конечности аксолотлей в процессе эксперимента.

Таблица 2

Гематологические и цитохимические показатели экспериментальных аксолотлей через 7 недель после ампутации

Показатель	Контроль	ЦП			ДиАцБФ		
		1-я доза	2-я доза	3-я доза	1-я доза	2-я доза	3-я доза
Эритропоз, %							
Гемоцитобласты, эритробласты	7	2	7	8	5	7	9
Нормобласты	3	4	1	4	7		3
Базофильные эритроциты	38	15	10	18	15	12	13
Зрелые эритроциты	52	79	82	70	73	81	75
Лейкоцитарная формула, %							
Миелобласты	8	4	10	12	8	18	5
Промиелоциты	3	3	4	2	-	5	-
Миелоциты	-	-	2	-	-	-	-
Метамиелоциты	-	-	-	-	-	-	-
Палочкоядерные нейтрофилы	-	-	-	-	-	-	1
Сегментоядерные	-	-	4	5	-	-	4
Эозинофилы	10	35	32	24	6	1	2
Базофилы	1	1	2	1	-	-	-
Моноциты	2	1	-	-	6	8	5
Лимфоциты	76	56	46	56	80	68	83
Фагоцитарная активность							
СЦК, ед.	1,93	2,41	2,12	2,40	1,49	1,92	2,01

По нашим наблюдениям, изменения происходят также в морфологии клеток крови (рис. 12). В группе с введенным ЦП наблюдается фрагментация цитоплазмы и цитоллиз эозинофилов.

Под действием ДиАцБФ появляются полиморфноядерные нейтрофилы в крови аксолотлей, незрелые клетки (гемоцитобласты) подвергаются разрушениям разного рода. При этом за-

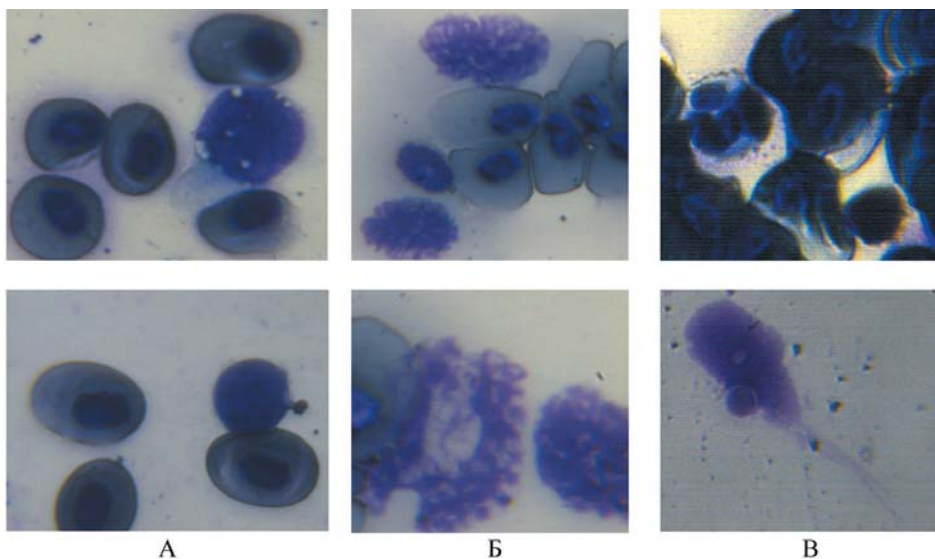


Рис. 12. Картина крови аксолотлей через 7 недель после ампутации: А – нормальные клетки крови в контроле; Б – фрагментация цитоплазмы эозинофилов, цитоллиз; В – появление полиморфноядерных нейтрофилов, выпадение ядра гемоцитобласта.

медляется эритропоэз и усиливается лейкопоэз.

ЦП в эксперименте вызвал активацию микробицидной системы (судя по увеличению процента эозинофилов и потенциала фагоцитарной активности – содержанию высокоцитотоксичного катионного белка в лизосомах нейтрофилов). В группе с ДиАцБФм значительно усилилась фагоцитарная активность макрофагов.

Таким образом, активация цисплатином и производными бисфенила катионных белков и механизмов с участием реактивных метаболитов нарушает трансмембранные процессы организма, что за счет свободнорадикальных реакций в итоге приводит к лизису мембран. Этому же способствует и активация препаратами макрофагальной активности.

Выводы

1. Впервые нами установлен особый характер интенсивной ацетилирующей способности трансгенных линий мышей (NAT2^{hom} и NAT1^{hom}), выраженной в высоком уровне активности ферментов ацетилирования, и замечена корреляция устойчивости лабораторных трансгенных животных после воздействия токсичными соединениями (ЦП, НОБФ, ДиАцБФ) с фенотипом ацетилирования. Нами предложен термин «сверхбыстрого» фенотипа ацетилирования для сочетания эффекта устойчивости лабораторных животных к токсикантам с повышенным уровнем экспрессии генов NAT и резко выраженной интенсивностью ацетилирования – ацетилирующей способностью.

2. Также установлен ингибирующий характер всех молекул-кандидатов (цисплатин и производные бисфенила)

и выявлена взаимосвязь между ферментативной активностью с уровнем ацетилирования гистонов (гистонацетиленотрансфераза, NAT) и экспрессией генов семейства N-ацетилтрансфераз человека (NAT1, NAT2).

3. Эффект дозозависимости фенотипа ацетилирования от токсичного воздействия соединениями – ингибиторами NAT позволяет применять данные методические подходы в поиске селективных молекул-кандидатов в ингибиторы NAT человека и имеет возможность использования для создания перспективных фармакологических средств.

4. Наблюдаемые эффекты имеют все предпосылки и взаимосвязи с механизмами регуляции активности ферментов семейства NAT и основания к эпигенетическому фактору воздействия выбранной группы токсикантов.

5. На модели регенеративной функции аксолотлей под действием изучаемых препаратов (цисплатин и производные бисфенила) происходят нарушения регенерации удаленных конечностей аксолотлей, выражающиеся в замедлении роста и изменениях в формировании пальцев.

6. Полученные с помощью полиметодических подходов данные иллюстрируют, что ингибиторы NAT, включая собственно и противоопухолевые средства, такие как цисплатин, обладают проканцерогенным действием.

7. Созданы модели с выраженным механизмом развития проопухолевого процесса, на основе которых возможно испытание, исследование и конструирование противоопухолевых средств и средств регенеративно-репаративного действия.

Список литературы

1. **Белицкий Г.А.** Прогноз канцерогенности фармакологических средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах // Ведомости фармкомитета. 1999. № 1. С. 18-31.
2. **Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.** Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина. 2006. № 4. С. 85-87.
3. **Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П.** Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека // Биомедицина. 2016. № 1. С. 4-16.
4. **Карлсон Б.М.** Регенерация. - М.: Наука. 1986. 191 с.
5. **Короткова Г.П.** Регенерация животных. - СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета. 1997. 480 с.
6. **Кэрри Н.** Эпигенетика: как современная биология переписывает наши представления о генетике, заболеваниях и наследственности. - Р-н-Д. 2012. 349 с.
7. **Пронина Г.И.** Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья // Известия ОГАУ. 2008. №4(20). С. 160-163.
8. **Пронина Г.И., Ревякин А.О., Корягина Н.Ю., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Курищенко Ж.О.** Регенерация патологически измененной печени карпа после межвидовой трансплантации стволовых клеток // Биомедицина. 2015. № 1. С. 85-89.
9. **Шехтер А.Б., Серов В.В.** Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) // Архив патологии. 1991. Т. 53. № 7. С. 7-15.
10. **Шубич М.Г.** Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. 1974. № 10. С. 1321-1322.
11. **Bischoff M., Schnabel R.** A posterior centre establishes and maintains polarity of the *Caenorhabditis elegans* embryo by a Wnt-dependent relay mechanism // PLOS Biology. 2006. No. 4(12). P. 396.
12. **Curti A., Fogli M., Ratta M., Biasco G., Tura S., Lemoli R.M.** Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34+ progenitor cells // J. Biol. regul. homeost. agents. 2001. Vol. 15. No. 7. P. 49-52.
13. **Gardiner D.M., Blumberg B., Komine Y., Bryant S.V.** Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs // Development. 1995. No. 121(6). P. 1731-41.
14. **Hanna P.E.** N-acetyltransferases, O-acetyltransferases, and N,O-acetyltransferases: enzymology and bioactivation // Adv. Pharmacol. 1994. No. 27. P. 401-430.
15. **Hein D.W.** Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis // Biochim. Biophys. Acta. 1998. No. 948. P. 37-66.
16. **Hein D.W.** Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis // Mutation Research. 2002. No. 506-507. P. 65-77.
17. **Kaplow L.S.** A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow // Blood. 1955. Vol. 10. P. 1023-1029.
18. **Kawakami Y., Esteban C.R., Matsui T., Rodríguez-León J., Kato S., Izpisua Belmonte J.C.** Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration // Genes&Development. 2006. Vol. 20. P. 3232-3237.
19. **Li Z. (J.), Gwinn M.** Toxicological review of biphenyl. In: Support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). - 2011.
20. **Nye H.L., Cameron J.A., Chernoff E.A., Stocum D.L.** Regeneration of the urodele limb: a review // Dev. Dyn. 2003. No. 226(2). P. 280-94.

21. **Pronina G.I., Revyakin A.O.** Changes of the morphophysiological parameters of carp *Cyprinus carpio* at food limitation in aquaculture conditions // J. of Ichthyology. 2015. Vol. 55. No. 2. P. 297-301.
22. **Ragunathan N., Dairou J., Pluvinage B., Martins M., Petit E., Janel N., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** Identification of the xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase I as a new target of cisplatin in breast cancer cells: molecular and cellular mechanisms of inhibition // Mol. Pharmacol. 2008. No. 73. P. 1761-1768.
23. **Reedijk J., Teuben J.M.** In cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug / Lippert B., ed. Wiley V.C.H. - Weinheim. Germany. 1999. P. 339-362.
24. **Sutherland J., Denyer M., Britland S.** Mitogenic substrata and chemokinetic growth factors for human skin cells // J. Anat. 2005. Vol. 207. No. 1. P. 67-78.
25. **Tanaka E.M.** Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration // Curr. Opin. Genet. Dev. 2003. No. 13(5). P. 497-501.
26. **Tank P.W., Carlson B.M., Connelly T.G.** A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum* // II J. Morph. 1976. Vol. 150. P. 117-128.

Regulation of acetylation systems in carcinogenesis processes: from phenotype to epigenetics

V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, D.V. Khvostov, N.V. Petrova, G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin

The study examined the role of acetylation in phenotypic and epigenetic mechanisms of gene expression that do not affect the original sequence by the action of procancerogenic and antineoplastic drugs.

Based on the data obtained *in vitro* experiment on enzymatic activity, gene expression and epigenetic *NAT2hom* factor of action with an effective inhibitory effect bisphenol substances (nitrosobenzene and diacetoxybiphenyl) and cisplatin for the enzyme N-acetyltransferase NAT2 human. For selected inhibitors studied concentration dependence of the enzymatic activity and determined the concentration value premaxillae inhibition IC_{50} . Create a new model of *in vitro* evaluation acetylation ability as well as determination of the kinetic parameters of the acetylation of substrates, activators and inhibitors, NAT. The model proposed for the screening of substances that affect the process of acetylation. With its help, as well as on models of transgenic mice carrying the *NAT2* gene of the person and the axolotl the nature of the interaction in the “inhibitor – enzyme activity”, “inhibitor of expression of a gene” and the predicted level of toxic effects of NAT inhibitors on enzymatic, genetic and epigenetic levels.

Experimentally on the example of the impact of the molecules of the toxicants presents a model study of epigenetic factors derived bisphenol and cisplatin in the regulation of epigenetic programs violations regeneration remote extremities of the axolotl, which is expressed in slower growth and changes in the formation of the fingers. There was deceleration of erythropoiesis and increased blood. Cisplatin and derivatives bisphenol cause an increase in the proportion of eosinophils and content of lysosomal cationic protein in neutrophils and a significant increase in the percentage of monocytes, which as a whole confirms the development of oncological processes of any localization.

Key words: N-acetyltransferase (NAT), transgenic humanized mice by human gene *NAT2* and *NAT1*, *NAT2* gene expression, epigenetics, acetylation, carcinogenesis, inhibitors of NAT, axolotl, regeneration, erythropoiesis, leukocyte formula.

Микрофлюидные технологии в изучении и моделировании гематоэнцефалического барьера

А.В. Моргун, В.В. Салмин, Ю.А. Успенская, Е.А. Тепляшина,
А.Б. Салмина

НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

Контактная информация: д.м.н. Салмина Алла Борисовна, allasalmina@mail.ru

Разработка моделей гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) *in vitro* является актуальной задачей нейробиологии и нейрофармакологии. Все большее значение приобретают модели с использованием технологии микрофлюидики, позволяющие изучать и воспроизводить ключевые события церебрального ангиогенеза, барьерогенеза, механизмы поддержания структурно-функциональной целостности ГЭБ, тестировать препараты с потенциальной нейротропной активностью. В обзоре анализируются современные достижения в разработке микрофлюидных моделей ГЭБ, а также наиболее перспективные технологические решения, обеспечивающие качественно новые возможности в создании и применении моделей *in vitro*.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, микрофлюидика, модель *in vitro*.

Введение

Моделирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) – одна из важных задач нейробиологии и нейрофармакологии. Применение моделей ГЭБ *in vitro* обеспечивает возможность изучения механизмов поддержания структурно-функциональной целостности барьера, особенностей его повреждения, а также тестирования новых лекарственных соединений с потенциальной нейротропной активностью [2].

В настоящее время у исследователей, которые изучают ГЭБ, в распоряжении есть методики *in vivo*, *in vitro*, *in silico*. У каждой из существующих методик имеются преимущества и недостатки. Модели ГЭБ на экспериментальных животных, несмотря на высокую информативность, являются дорогостоя-

щими, трудоемкими и этически спорными. Не всегда данные, полученные с их помощью, могут быть экстраполированы на человека. Более 80% кандидатов лекарственных средств, которые были успешно испытаны в моделях на животных, потерпели неудачу при клинических испытаниях [18]. Несмотря на это, до настоящего времени модели на экспериментальных животных остаются «золотым стандартом» для нейрофармакологических исследований [29]. В фармацевтической промышленности тестирование лекарств-кандидатов, как правило, всегда проводят на животных, прежде чем они будут испытаны в организме человека. Компьютерные модели ГЭБ используются только для прогнозирования проницаемости на основе базовых знаний, т.е. хорошо изученных

механизмах для определенной лекарственной структуры. Таким образом, получить информацию об эффективности новых препаратов с неизвестными механизмами проницаемости или о том, как сам препарат влияет на проницаемость или активность клеток ГЭБ, с использованием моделей *in silico* практически невозможно [15].

Традиционные методы культивирования имеют преимущество в возможности использования человеческих клеток, но было показано, что некоторые типы клеток, используемых в таких статичных экспериментах, не всегда достигают полной функциональной зрелости и активности. Одновременно с этим отмечается проблема замены питательных сред, которая сама по себе не является физиологическим процессом [12].

Становится очевидной привлекательность методов *in vitro*, которые могут подробно описывать нормальную и патологическую активность изучаемых клеток на молекулярном уровне в условиях имитации кровотока и взаимодействия клеток, которые наблюдаются в организме. В связи с этим открываются широкие перспективы при использовании модельных систем на основе микрофлюидных технологий, т.к. имеется возможность создания благоприятных (и максимально близких к физиологическим) условий окружающей среды для культивирования клеток, поступления химических веществ в строго контролируемых концентрациях.

Микрофлюидные технологии

Физическая основа микрофлюидики – это классические уравнения гидродинамики. Особенности течения жидкости в микроканалах под действи-

ем внешних сил накладывают существенный отпечаток на поведение жидкости: течение зависит от взаимодействия жидкости со стенками канала, потому так актуальны поверхностные явления на границе фаз. Большое значение в тонких каналах имеют поверхностные эффекты, которые в более широких каналах можно было бы практически не учитывать [1]. Возможно, ключевым моментом к проблеме регулирования течений внутри тонких каналов выступает управление поверхностными эффектами. Следовательно, изучение топологии и химического состава поверхностей, используемых для стенок тонких каналов, является одним из приоритетных и не в полной мере изученных направлений микрофлюидики. Это определяет потребность в поиске наиболее соответствующих используемым типам клеток перфузируемых жидкостей и материалов для изготовления микрофлюидных камер. В целом, именно принципы микрогидродинамики, описывающей поведение жидкостей в микро- и наноразмерных системах, составляют основу функционирования микро(нано)флюидных чипов. Необходимо отметить, что к нанофлюидным чипам относят чипы, размеры функциональных элементов которых составляют менее 100 нм, а если переходная область составляет 100 нм – 1 мкм, то такие процессы отражают закономерности классической микрогидродинамики, но с некоторыми особенностями наноразмерных процессов [33].

Проведение некоторых или всех этапов экспериментального исследования в автономном режиме может обеспечить камера, состоящая из комплекса микроили наноразмерных функциональных и объединенных элементов. Именно свой-

ства подвергаемых анализу биологических объектов и особенности протекающих в нем реакций определяют специфику и даже уникальность конструктивных качеств микрочипа. Например, для моделирования процессов ангиогенеза необходимо сформировать взаимодействующие каналы и камеры-резервуары для клеток-предшественников или для гуморальных факторов с проангиогенной активностью, а для моделирования процесса нейрогенеза наиболее актуальным является создание такой микроархитектоники чипа, которая бы наилучшим образом воспроизводила сосудистое микроокружение в нейрогенных нишах головного мозга с соответствующими специфическими свойствами клеток эндотелия (транселлюлярный и параселлюлярный транспорт).

Разветвленная сеть микроструктур – микроканалов и микрореакторов – способствует осуществлению реакций в микрофлюидных потоках жидкости, обеспечивает полноценное взаимодействие различных компонентов системы. В связи с этим, формирование сети микроструктур с заданной микроархитектоникой и упорядоченными взаимодействиями позволяет проводить исследования в небольшом объеме, с чередованием разных по содержанию экспериментальных воздействий, с отбором проб в динамике эксперимента [22]. Ограниченность объема взаимодействующих компонентов в микрофлюидной системе определяет возможность регистрации таких маркеров, которые могут остаться не идентифицированными в статических моделях *in vitro* (например, экзосом) [24], либо создание (благодаря заданной конструкции каналов) градиента концентрации веществ, влияющих

на ключевые функции клеток в системе (например, стимулирующих пролиферацию или миграцию клеток) [28]. В этом контексте микрофлюидика смыкается по потенциалу технологических приемов с методами формирования внеклеточного матрикса с заданными свойствами (структурирование и функционализация).

По своей сути микрофлюидная технология в определенной степени объединяет методы *in vivo* и *in vitro*. Для такого нового класса моделей недавно было введено понятие «organ-on-chip» (орган на чипе) [5]. Фактически, речь идет о максимально полном воспроизведении естественного для любой ткани взаимодействия клеток в условиях (микро)потока внеклеточной жидкости, имитирующего доставку питательных веществ и ксенобиотиков к клеткам, а также эффективное отведение продуктов метаболизма. В контексте ГЭБ это еще означает и возможность достижения большего, по сравнению со статическими моделями, уровня трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER), которое характеризует структурную и функциональную целостность барьера: в динамической модели TEER достигает 2000-4000 Ом/см², а в такой же, но статической модели – всего 100-125 Ом/см² [31]. Однако необходимо учитывать, что максимально близкое соответствие условиям *in vivo* может быть достигнуто только при воспроизведении механизмов саморегуляции и обратной связи. Поэтому важен контроль параметров системы и, соответственно, наличие механизмов управления этими параметрами.

Еще одним преимуществом рассматриваемой технологии является возмож-

ность ее использования для решения задач персонализации терапии заболеваний головного мозга при условии использования клеток конкретного донора. Применительно к моделям ГЭБ это означает подход с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), с последующей их дифференцировкой в клетки эндотелия, способные формировать в микрофлюидных каналах капиллярную сеть в полном соответствии с принципами васкулогенеза [35]. В более общем смысле это дает возможность создания и использования персонализированного (характерного для данного конкретного пациента) ГЭБ на микрофлюидном чипе для тестирования эффективности преодоления барьера соединениями, ориентированными на забарьерные молекулы-мишени в ткани головного мозга.

Кроме этого, технология «organ-on-chip» может имитировать функции на уровне взаимодействующих тканей, что составляет основу т.н. «микрофизиологических систем» (табл.).

При оценке возможности и целесообразности применения микропоточковых технологий в моделировании ГЭБ необходимо помнить о том, что в естественных условиях эндотелий церебральных микрососудов находится под постоянным влиянием движущегося потока жидкости (кровь), что существенно модулирует ответ клеток на действие гуморальных регуляторов или контакт с др. клетками сосудистой стенки или крови. В частности, гемодинамика в условиях *in vivo* определяет развитие в клетках эндотелия стресса сдвига и напряжения, который влияет на экспрессию генов, активность ионных каналов, метаболизм клеток, процессы пролиферации и дифференцировки, апоптоз [4]. Воспроизведение таких механобиологических факторов – одна из ключевых задач биоинженерных работ при создании новых моделей ГЭБ *in vitro*. Более того, применение моделей, основанных на технологиях микрофлюидики, позволяет сделать качественно новый шаг в изучении механизмов развития ГЭБ или

Таблица

Сравнение микрофлюидной технологии «organ-on-chip» с моделями *in vivo* и *in vitro*

Показатель	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	Organ-on-chips	Ссылки
Человеческая ткань	Нет	Да	Да	[2]
Персонализированная медицина	Нет	Да	Да	[2]
Реалистичное микроокружение	Да	Нет	Да	[20]
Контроль микросреды	Нет	Да	Да	[17]
Функционирование на уровне органов	Да	Ограниченно	Да	[32]
Получение результатов в реальном времени	Нет	Ограниченно	Да	[8]
Высокая пропускная способность, распараллеливание тестирования	Нет	Да	Да	[21]
Параллельные исследования	Нет	Да	Да	[10]
Исследование фармакодинамики / фармакокинетики	Да	Нет	Да	[9]

его восстановления после повреждения, роль скоро именно гемодинамические параметры во многом определяют эффективность миграции и хоминга эндотелиальных прогениторных клеток, а также миграции и дифференцировки резидентных клеток эндотелия в составе ГЭБ [14]. В целом, использование микрофлюидики для моделирования ГЭБ позволяет имитировать физиологическое течение жидкости, которое влияет на функциональную активность церебральных эндотелиоцитов.

Несмотря на то, что проницаемость ГЭБ в настоящее время обычно изучается в клеточных моделях ГЭБ *in vitro*, использование микрофлюидной технологии в формате «organ-on-chip» позволяет провести изучение функциональной активности ГЭБ в целом (или клеток-компонентов барьера в отдельности) в режиме реального времени путем подключения разнообразных датчиков и анализаторов непосредственно к модели.

Примером исследования, которое не может быть проведено на клеточной культуре в полном объеме, является сложный, специализированный механизм активации лейкоцитов в непосредственном контакте с ГЭБ при бактериальных инфекциях [17]. В реализации этого механизма существенную роль играют движение лейкоцитов вдоль эндотелиального слоя, а также процесс трансмиграции, опосредованный взаимодействием большого числа факторов на поверхности эндотелиоцитов и лейкоцитов. Аналогичным образом, применение микропотоковых технологий актуально для изучения процессов тромбообразования в церебральных микрососудах для моделирования изме-

нения эффектов взаимодействия клеток эндотелия и активированных тромбоцитов в динамически меняющемся микроокружении. Еще одним перспективным применением микрофлюидной модели ГЭБ является исследование механизмов поступления эндогенных и экзогенных веществ (в т.ч. лекарственных средств) и процессов выведения метаболитов из ткани мозга. Известно, что контролируемое увеличение проницаемости ГЭБ определяет эффективность таких механизмов, однако не менее существенным фактором является наличие адекватной перфузии в микрососудах головного мозга [16]. Воспроизвести близкие к естественным условия (соответствующее давление перфузирующего раствора, скорость потока и состав перфузата) позволяет использование микропотоковых технологий для моделирования ГЭБ [23].

Таким образом, модель ГЭБ-on-chip с использованием микрофлюидики является дополнительным инструментом для изучения ГЭБ, наряду с классическим культивированием и исследованиями на экспериментальных животных. В зависимости от поставленных задач можно выбрать наиболее подходящую модель ГЭБ-on-chip, учитывая, что в последние годы появился достаточно широкий выбор моделей, а количество публикаций, посвященных указанной проблеме, резко увеличилось.

Каким образом эволюционировали подходы к созданию моделей ГЭБ с использованием микропотоковых технологий?

В 2012 г. в работе R. Booth [8] была опубликована информация о создании микромоделей ГЭБ с использованием микрофлюидной технологии. Устройст-

во из полидиметилсилоксана (PDMS), помещенного между двумя стеклянными пластинками, которое предлагали авторы, представляло собой два канала, которые были отделены друг от друга мембраной из поликарбоната (толщина 10 мкм, поры 0,4 мкм). К верхней и нижней части были подведены электроды, что позволяло регистрировать трансэндотелиальное сопротивление в режиме реального времени, которое составило 180-280 Ом/см², что указывает на наличие полноценного функционального барьера *in vitro*.

В указанной модели использовались астроциты и эндотелиоциты мышей, которые культивировались на разных сторонах мембраны. Скорость потока составляла 2,6 мкл/мин, при этом давление на эндотелиоциты составило 2 мПа и, в принципе, не являлось физиологическим, т.к. в норме давление в капиллярах головного мозга достигает 0,3-2 Па. На собственной модели авторы провели исследования, посвященные регистрации белков плотных контактов, проницаемости ГЭБ, в т.ч. и при изменении pH среды, а также при повышении концентрации гистамина в составе перфузата. Авторами была убедительно показана более высокая эффективность микрофлюидной модели по сравнению с классическим сокультивированием астроцитов и эндотелиоцитов.

Дальнейшее развитие модели R. Booth шло по пути изменения глубины и ширины каналов, смены адгезива (коллаген, фибронектин, полилизин), изменения скорости потока до 2 мл/мин и повышения давления до 1,5 Па. Трансэндотелиальное сопротивление оставалось в пределах 150 Ом/см² [9]. Используя собственную модель ГЭБ-on-chip,

авторы изучили токсичность семи лекарственных препаратов и показали, что измеренные коэффициенты проницаемости в их микрофлюидной модели хорошо коррелируют с результатами, полученными в экспериментах *in vivo*, что демонстрирует высокий потенциал указанной модели для фармакологических исследований.

Также в 2012 г. была опубликована работа [34] о системе для анализа проницаемости микрососудов мозга. Устройство, как и предыдущее, было смонтировано из PDMS на стекле и содержало два параллельных канала диаметром 25 мкм, которые соединялись микроотверстиями диаметром 3-5 мкм. В модели использовали эндотелиоциты пупочной вены человека (HUVEC) и астроцит-кондиционированная среда (ACM). Авторы изучили проницаемость для FITC-меченых декстранов (4, 40, 70 кДа), некоторых лекарственных препаратов с помощью флуоресцентной микроскопии (в реальном времени) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В 2013 г. была опубликована работа [3], описывающая интересное модульное микрофлюидное устройство, моделирующее нейроваскулярную единицу на чипе. Предлагаемое устройство состоит из двух модулей на основе PDMS, которые могут быть изготовлены и использованы для культивирования различных видов клеток по отдельности и собраны вместе на более позднем этапе. Скорость потока составляет 1 мл/ч. Один модуль содержит покрытую полилизином лунку диаметром 8 мм и глубиной 0,1 мм и используется для культивирования кортикальных клеток (нейрональный модуль). Второй

модуль (сосудистый) шириной 10 мм с каналами длиной 0,1 мм с поликарбонатной мембраной (толщина 7 мкм, поры 8 мкм), покрытой фибронектином, предназначен для культивирования церебрального эндотелия. Авторами была показана высокая жизнеспособность клеток, адекватная дифференцировка нейронов и стабильное функционирование эндотелия, экспрессия белков плотных контактов. На этой модели авторы исследовали изменение проницаемости ГЭБ под действием TNF α .

В 2013 г. было представлено устройство «SYM-BBB» на основе PDMS на предметном стекле. Архитектура устройства была представлена в виде двух кольцевых каналов и предназначена для обеспечения одновременной визуализации при микроскопии. Наружное кольцо (ширина 200 мкм, глубина 100 мкм) – сосудистая часть. Внутреннее кольцо – нейроглиальная часть (ширина 200 мкм, глубина 100 мкм). Каналы соединялись между собой микрозазорами (длина 50 мкм; ширина и глубина – по 3 мкм). В качестве адгезива использовался фибронектин. Во время культивирования клеток скорость потока составила всего 0,1 мкл/мин, что соответствует напряжению сдвига приблизительно 3 мПа и является более низким по сравнению с физиологическим уровнем. На этой модели авторами изучены особенности проницаемости ГЭБ с участием Р-гликопротеина эндотелиоцитов, обеспечивающего экструзию ксенобиотиков, а в качестве контроля авторами использовались стандартные клеточные культуры [25].

В 2015 г. была представлена трехмерная модель ГЭБ с использованием микрофлюидной технологии. Устройство

представляет собой конструкцию на стекле из PDMS, на поверхности которого располагаются продольные и поперечные каналы (ширина и глубина – 5 мкм). Внутри PDMS формируется 2 канала – эндотелиальный и нейроглиальный (диаметр – по 50 мкм), и маленькие перпендикулярные соединительные каналы (5 мкм). Вся конструкция помещается в акриловый планшет с культуральной средой. После покрытия каналов поли-D-лизином они заполняются коллагеном [13]. Авторы изучили особенности миграции нейтрофилов через эндотелиальный слой, влияние интерлейкина-8 и TNF α на проницаемость ГЭБ, экспрессию белков плотных контактов. Кроме этого, авторы моделировали ишемию и гипогликемию, а также оценивали влияние антиоксидантов, исследовали формирование активных форм кислорода и активацию Rho-киназы в результате окислительного стресса в контексте изменения проницаемости ГЭБ.

В том же году была представлена еще одна трехмерная модель нейроваскулярной единицы на основе коллагена. Принцип устройства заключается в том, что в коллагене формируются каналы (трубочки) диаметром 235-360 мкм путем заливки коллагена вокруг микроигл с последующим их удалением. Получившиеся трубочки покрывают фибронектином, внутри них культивируют эндотелиальные клетки [21]. Основные исследования, которые проводили авторы, используя предложенную модель, посвящены трансэндотелиальной проницаемости при нарушении осмолярности крови.

Очень интересная модель ГЭБ на чипе с использованием микрофлюидной техники была представлена Brown с соавт. [11]. Их чип состоит из трех слоев

PDMS: сосудистая камера с входными каналами (ширина 100 мкм, высота 6,2 мм), камера нейроглиальных клеток (ширина 4,75 мм, длина 6,2 мм и глубина 500 мкм) и слой перфузионных каналов (несколько параллельных каналов высотой 100 мкм). Сосудистые и мозговые камеры разделены поликарбонатной мембраной (диаметр пор 0,2 мкм). В качестве адгезива используется ламинин. Скорость потока – 2 мкл/мин, что соответствует давлению 2 мПа. Особенностью этой модели является то, что камера нейроглиальных клеток заполняется коллагеном (матригелем), в котором находятся человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Клетки остаются жизнеспособными до 21 суток. Авторами изучены особенности проницаемости ГЭБ в присутствии глутамата, аскорбиновой кислоты и при холодовом шоке. Кроме того, авторы сообщили о достижении очень высоких значений трансэндотелиального сопротивления (до 2000 Ом/см²), что сопоставимо с этим параметром *in vivo*.

Примером оригинального технического решения может являться создание трехмерной модели ГЭБ в микрофлюидной камере [30] с участием эндотелия, перицитов и астроцитов, в которой достигалась величина парацеллюлярных пор, сопоставимая с параметрами *in vivo*, за счет корректной организации расположения всех трех типов клеток.

Особое положение в ряду микрофлюидных моделей ГЭБ *in vitro* занимают модели, созданные для изучения процессов ангиогенеза, барьерогенеза. К числу таких моделей можно отнести те, в которых акцент делается на подбор оптимального внеклеточного матрикса, заполняющего собой не только камеры,

но и входные и отводящие каналы [27]. Возможность создания в таких системах градиента гуморальных факторов с про- или антиангиогенным эффектом создает предпосылки для детального изучения механизмов образования новых сосудов и тестирования фармакологических препаратов с потенциальным ангиостатическим действием (например, для решения задач терапии опухолей головного мозга) или ангиостимулирующим эффектом (например, для стимуляции репаративного ангиогенеза после повреждения ткани головного мозга). Близкими по задачам являются микрофлюидные системы, формирующие пронеурогенное микроокружение (т.н. «сосудистый скаффолд») для клеток, участвующих в нейрогенезе, что актуально при разработке новых технологий регенеративной неврологии и реализации амбициозных проектов – например, «brain-on-chip» [19].

Заключение

Таким образом, внедрение микрофлюидики революционировало процесс разработки моделей ГЭБ *in vitro* в формате «organ-on-chip». Вместе с тем, эти же этапы в развитии технологии моделирования ГЭБ позволили увидеть ключевые достоинства и недостатки указанного подхода.

В целом, микрофлюидные модели ГЭБ обладают рядом несомненных преимуществ: во-первых, существенно снижается расход используемых реагентов и количество отработанного материала, повышается чувствительность и пропускная способность эксперимента. Во-вторых, в рассматриваемых системах химические реакции осуществляются с более высокой скоростью, лучшим и

более точным результатом, что обусловлено небольшими размерами каналов и значительным коэффициентом поверхности микроканала по отношению к объему жидкости. Нельзя также не отметить более тонкий контроль смешивания реагентов и контроль количества продукта, которое получается после химической реакции. В-третьих, микрофлюидные устройства, применяемые в настоящее время в научных исследованиях (медицинского и биологического профиля), представлены большим спектром различных модификаций. В них используют разнообразные принципы разделения, концентрирования и выявления результата. Так, один чип позволяет концентрировать несколько герметично закрываемых или открытых стационарных сосудов, наполняемых жидким или газообразным веществом, насосом и идущими в разные стороны микрофлюидными каналами [22].

Вместе с тем, можно отметить и существенные недостатки при использовании микрофлюидных технологий при моделировании ГЭБ: несмотря на значительный прорыв в этой области, многие технологические проблемы остаются нерешенными: они связаны, в первую очередь, с оптимизацией движения жидкости в ограниченном пространстве, с перемешиванием жидкостей, увеличением скорости потока жидкости, уменьшением гидродинамической дисперсии. Нельзя исключать и отрицательные эффекты материалов и перфузирующих жидкостей в отношении клеток церебрального эндотелия или клеток неэндотелиальной природы, участвующих в формировании ГЭБ (например, перicyтов, астроцитов). Значимой проблемой остается поиск наиболее удобных

и информативных методов мониторинга состояния клеток в микрофлюидных камерах, для решения этой задачи применяют, например, оптические зонды, в т.ч. экзогенные флуоресцентные красители, эндогенные флуорофоры или экспрессируемые в клетках флуоресцентные белковые биосенсоры [26].

Решение этих технологических проблем, несомненно, обеспечит «прорыв» в развитии микрофизиологических систем для моделирования нейрогенеза, нейропластичности, нейродегенерации с учетом структурно-функциональной целостности ГЭБ. В этой связи прогнозируется новый этап в развитии метода микрофлюидики, связанный с внедрением технологии 3D-принтинга для создания биосовместимых конструкций, прозрачных, легко мониторируемых, с заданными свойствами и недорогих [6]. Этот же подход обеспечит замену гидрогелей в качестве обычного матрикса для клеток в микрофлюидной камере на 3D-полимерные скаффолды, что важно для прижизненной флуоресцентной визуализации клеток в течение длительного времени с высоким разрешением. Не менее интересным является применение технологий 3D-принтинга для инкорпорации в микроканалы или микрокамеры микрофлюидной системы различных структур (например, микромиксеров, микролинз, микрофильтров), как это было недавно показано с применением лазерной двухфотонной фотополимеризации [7].

Кроме всего перечисленного, для ускорения разработки и обеспечения возможности сравнения и проверки различных моделей ГЭБ на чипе необходимо разработать стандартизацию и общие подходы к проблеме среди исследователей. В этом контекста наиболее

актуальны: 1) стандарты в определении проницаемости ГЭБ; 2) применение стандартизированных клеточных линий; 3) конструктивные особенности микрофлюидной камеры с такой топологией и архитектурой, которые бы максимально приближенно к реальным условиям воспроизводили особенности кровотока в микрососудах головного мозга. Вместе с тем, имеющиеся в настоящее время микрофлюидные модели ГЭБ несовершенны именно из-за различий в указанных аспектах, что вызывает значительные расхождения в экспериментальных результатах и сложности в интерпретации полученных данных.

В целом, перспективы совершенствования и применения моделей ГЭБ *in vitro* с использованием технологий микрофлюидики связаны с развитием технологий биоинженерии, биотехнологии, созданием новых биоматериалов и способов их обработки, а также методов визуализации. Прогресс в этих направлениях дает новые возможности в изучении механизмов поддержания структурно-функциональной целостности ГЭБ в норме и при патологии, механизмов барьерогенеза и ангиогенеза в головном мозге, создании новых моделей заболеваний ЦНС, изучении возможностей направленного изменения свойств ГЭБ, тестирования соединений с потенциальной нейротропной активностью.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (соглашение № 14-25-00054).

Список литературы

1. Микрофлюидные системы для химического анализа / под ред. Ю.А. Золотова, В.Е. Курочкина. - М.: ФИЗМАТЛИТ. 2011. 528 с.
2. *Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Хилажеева Е.Д., Пожиленкова Е.А., Таранушенко Т.Е., Медведева Н.Н., Салмина А.Б.* Технологии изучения и моделирования гематоэнцефалического барьера // Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии: рук-во для врачей. В 3-х томах / под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танащян. - М.: АТМО. 2015. Т. III. С. 134-166.
3. *Achyuta A.K.H., Conway A.J., Crouse R.B., Bannister E.C., Lee R.N., Katnik C.P., Behensky A.A., Cuevas J., Sundaram S.S.* A modular approach to create a neurovascular unit-on-a-chip // Lab. Chip. 2013. Vol. 13. P. 542-553.
4. *Ando J., Yamamoto K.* Effects of shear stress and stretch on endothelial function // Antioxid. Redox Signal. 2011. Vol. 15. № 5. P. 1389-1403.
5. *Bhatia S.N., Ingber D.E.* Microfluidic organs-on-chips // Nat. Biotechnol. 2014. Vol. 32. No. 8. P. 760-772.
6. *Bhattacharjee N., Urrios A., Kang S., Folch A.* The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics // Lab. Chip. 2016. Vol. 16. No. 10. P. 1720-1742.
7. *Bing X., Wen-Qiang D., Jia-Wen L., Yan-Lei H., Liang Y., Chen-Chu Z., Guo-Qiang L., Zhao-Xin L., Jin-Cheng N., Jia-Ru C., Dong W., Su-Ling L., Koji S.* High efficiency integration of three-dimensional functional microdevices inside a microfluidic chip by using femtosecond laser multifoci parallel microfabrication // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 19989.
8. *Booth R., Kim H.* Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (mu BBB) // Lab. Chip. 2012. Vol. 12. P. 1784-1792.
9. *Booth R., Kim H.* Permeability analysis of neuroactive drugs through a dynamic microfluidic in vitro blood-brain barrier model // Annals Biomed. Engineering. 2014. Vol. 42. P. 2379-2391.
10. *Booth R., Noh S., Kim H.A.* multiple-channel, multiple-assay platform for char-

- acterization of full-range shear stress effects on vascular endothelial cells // *Lab. Chip*. 2014. Vol. 14. P. 1880-1890.
11. **Brown J.A., Pensabene V., Markov D.A., Allwardt V., Neely M.D., Mingjian S., Britt C.M., Hoilett O.S., Qing Y., Brewer B.M., Samson P.C., McCawley L.J., May J.M., Webb D.J., Deyu L., Bowman A.B., Reiserer R.S., Wiksw J.P.** Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: A novel neurovascular microfluidic bioreactor // *Biomicrofluidics*. 2015. Vol. 9. No. 5. P. 1-15.
 12. **Cao X., Lin H., Muskhelishvili L., Latendresse J., Richter P., Heflich R.H.** Tight junction disruption by cadmium in an in vitro human airway tissue model // *Respir. Res.* 2015. Vol. 16. No. 1. P. 30.
 13. **Cho H., Seo J.H., Wong K.H., Terasaki Y., Park J., Bong K., Arai K., Lo E.H., Irimia D.** Three-dimensional blood-brain barrier model for in vitro studies of neurovascular pathology // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 15222.
 14. **Cucullo L., Hossain M., Puvenna V., Marchi N., Janigro D.** The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology // *BMC Neurosci.* 2011. Vol. 12. P. 40.
 15. **Filipovic N., Ghimire K., Saveljic I., Milosevic Z., Ruegg C.** Computational modeling of shear forces and experimental validation of endothelial cell responses in an orbital well shaker system // *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 2016. Vol. 19. No. 6. P. 581-590.
 16. **Hellman K., Nielsen P.A., Ek F., Olsson R.** An ex vivo model for evaluating blood-brain barrier permeability, efflux, and drug metabolism // *ACS Chem. Neurosci.* 2016. Vol. 7. No. 5. P. 668-680.
 17. **Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E.** Reconstituting organ-level lung functions on a chip // *Science*. 2010. Vol. 328. P. 1662-1668.
 18. **Huh D., Torisawa Y.S., Hamilton G.A., Kim H.J., Ingber D.E.** Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips // *Lab. Chip*. 2012. Vol. 12. No. 12. P. 2156-2164.
 19. **Karimi M., Bahrami S., Mirshekari H., Basri S.M., Nik A.B., Aref A.R., Akbari M., Hamblin M.R.** Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering // *Lab. Chip*. 2016. Vol. 16. No. 14. P. 2551-2571.
 20. **Kim H.J., Huh D., Hamilton G., Ingber D.E.** Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow // *Lab. Chip*. 2012. Vol. 12. P. 2165-2174.
 21. **Kim J.A., Kim H.N., Im S.-K., Chung S., Kang J.Y., Choi N.** Collagen-based brain microvasculature model in vitro using three-dimensional printed template // *Biomicrofluidics*. 2015. Vol. 9. P. 024115.
 22. **Luni C., Serena E., Elvassore N.** Human-on-chip for therapy development and fundamental science // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. Vol. 25. P. 45-50.
 23. **Nedergaard M.** Garbage truck of the brain // *Science*. 2013. Vol. 340. No. 6140. P. 1529-1530.
 24. **Oh H.J., Shin Y., Chung S., Hwang D.W., Lee D.S.** Convective exosome-tracing microfluidics for analysis of cell-non-autonomous neurogenesis // *Biomaterials*. 2016. Vol. 112. P. 82-94.
 25. **Prabhakarparandian B., Shen M.C., Nichols J.B., Mills I.R., Sidoryk-Wegrzynowicz M., Aschner M., Pant K.** SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model // *Lab. Chip*. 2013. Vol. 13. P. 1093-1101.
 26. **Senutovitch N., Vernetti L., Boltz R., DeBiasio R., Gough A., Taylor D.L.** Fluorescent protein biosensors applied to microphysiological systems // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2015. Vol. 240. No. 6. P. 795-808.
 27. **Tourovskaja A., Fauver M., Kramer G., Simonson S., Neumann T.** Tissue-engineered microenvironment systems for modeling human vasculature // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2014. Vol. 239. No. 9. P. 1264-1271.

28. Uzel S.G., Amadi O.C., Pearl T.M., Lee R.T., So P.T., Kamm R.D. Simultaneous or sequential orthogonal gradient formation in a 3D cell culture microfluidic platform // *Small*. 2016. Vol. 12. No. 5. P. 612-622.
29. Van der Helm M.W., van der Meer A.D., Eijkel J.C., van den Berg A., Segerink L.I. Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research // *Tissue Barriers*. 2016. Vol. 4. No. 1. P. e1142493.
30. Wang J.D., Khafagy el-S., Khanafer K., Takayama S., ElSayed M.E. Organization of endothelial cells, pericytes, and astrocytes into a 3D microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier // *Mol. Pharm.* 2016. Vol. 13. No. 3. P. 895-906.
31. Wang Y.I., Abaci H.E., Shuler M.L. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening // *Biotechnol. Bioeng.* 2016. doi: 10.1002/bit.26045.
32. Westein E., van der Meer A.D., Kuipers M.J.E., Frimat J.P., van den Berg A., Heemskerk J.W.M. Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110. P. 1357-1362.
33. Wong I.Y., Bhatia S.N., Toner M. Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine // *Genes Dev.* 2013. Vol. 27. No. 22. P. 397-408.
34. Yeon J.H., Na D., Choi K., Ryu S.W., Choi C., Park J.K. Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures // *Biomed. Microdevices*. 2012. Vol. 14. P. 1141-1148.
35. Zanutelli M.R., Ardalani H., Zhang J., Hou Z., Nguyen E.H., Swanson S., Nguyen B.K., Bolin J., Elwell A., Bischel L.L., Xie A.W., Stewart R., Beebe D.J., Thomson J.A., Schwartz M.P., Murphy W.L. Stable engineered vascular networks from human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells cultured in synthetic hydrogels // *Acta Biomater.* 2016. Vol. 35. P. 32-41.

Microfluidic technologies in studying and modelling the blood-brain barrier

A.V. Morgun, V.V. Salmin, Y.A. Uspenskaya, E.A. Teplyashina,
A.B. Salmina

Development of the blood-brain barrier model in vitro is one of the main points in modern Neurobiology and Neuropharmacology. Application of microfluidic approach to the blood-brain barrier modeling allows studying and reconstructing the key events in cerebral angiogenesis, barrierogenesis, regulation of structural and functional integrity of the barrier, and testing the drug candidates targeting brain tissue. Here we review the current achievements in the development of blood-brain barrier microfluidic models as well as the most promising technological solutions to get novel opportunities in the development and application of these models *in vitro*.

Key words: blood-brain barrier, microfluidics, model *in vitro*.



Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой

В.Н. Каркищенко¹, Н.Н. Каркищенко¹, Е.Б. Шустов¹, И.А. Берзин²,
Ю.В. Фокин¹, О.В. Алимкина¹

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

² – Федеральное медико-биологическое агентство, Москва

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

Разработана модификация метода повторного предъявления плавательной нагрузки с утяжелением 10% от массы тела, позволяющая более четко оценивать выносливость и скорость формирования утомления у крыс. Проведен статистический анализ показателей методики, позволяющий производить популяционный перенос полученных результатов. На основе анализа точек срыва работоспособности в тесте вынужденного плавания с утяжелением 10% от массы тела и кинезогидродинамического исследования предложены новые аспекты интерпретации полученных данных.

Ключевые слова: лабораторные животные, биомедицинские исследования, физическая работоспособность, плавательные тесты, кинезогидродинамическое исследование.

Введение

В практике биомедицинских исследований физической работоспособности животных стандартно используются два вида задаваемой физической нагрузки: бег на тредбане до отказа и плавательные тесты с нагрузкой. Плавательные тесты с нагрузкой, в свою очередь, могут подразделяться по типу задаваемой нагрузки на плавание с грузом и плавание во встречном ламинарном потоке (кинезогидродинамическое исследование). В ходе кинезогидродинамического исследования оценивается широкий комплекс показателей: макси-

мальная и средняя скорость плавания, выносливость, работоспособность, утомляемость животных [5]. В тесте плавания с грузом оценивается фактически единственный показатель – предельное время плавания. Традиционно этот показатель считается показателем работоспособности (или динамической выносливости) животных. Однако насколько корректна такая его интерпретация? Ведь исходно тесты плавания грызунов с грузом были предложены Порсолтом как «тесты отчаяния» для оценки степени выраженности депрессивных компонентов поведенческой

активности животных [10]. Различные модификации этого теста в основном касаются условий его проведения (варьируются масса груза, температура воды, кратность предъявления нагрузки) [7], но не затрагивают принципов интерпретации предельного плавания как показателя работоспособности (выносливости) животных.

Первые сомнения в корректности такой интерпретации у нас возникли при анализе обширного массива накопленных данных по «трехнагрузочному» плавательному тесту, используемому для оценки влияния лекарственных средств на процессы восстановления после истощающих нагрузок. При проведении этого теста выполняется стандартный плавательный тест с утяжелением 10% от массы тела, применяемый в исследованиях смешанной аэробно-анаэробной физической работоспособности. Специфической особенностью этой его модификации является то, что строго через 5 мин после завершения первой нагрузки (достижение критерия предельного плавания – погружение животного на дно бассейна более чем на 30 сек без плавательных движений или появление пузырьков вытесняемого из легких воздуха) животное подвергается повторному выполнению такого же плавательного теста, и строго через 45 мин периода восстановления – третьему идентичному нагрузочному тесту. В объединенном массиве контрольных групп животных (что приближает полученные данные к популяционным характеристикам, $n=458$) среднее время первого плавания животных составило 148 ± 8 сек, во втором плавании строго через 5 мин – 71 ± 4 сек,

что составило 48% от времени первого плавания. Временной интервал в 5 мин явно недостаточен для снятия выраженного мышечного утомления, но его, как правило, достаточно для устранения острой эмоциональной реакции животных.

Целью настоящего исследования была проверка корректности интерпретации временных характеристик плавания животных в нагрузочных пробах, как показателей, характеризующих работоспособность (динамическую выносливость) животных.

Материалы и методы

Исследование выполнено по двум методикам задания физических нагрузок лабораторным животным: вынужденному плаванию с грузом и кинезогидродинамическому исследованию.

Исследование в модели вынужденного плавания строилось по принципу повторно предъявляемой плавательной нагрузки с 5-минутным интервалом до формирования выраженного утомления и отказа животных от дальнейшего выполнения исследований. Нагрузка осуществлялась в соответствии со стандартной методикой плавания животных с грузом 10% от массы тела в воде термокомфортной температуры (28°C). Фиксировалась продолжительность каждого заплыва до отказа, количество таких заплывов, поведенческие признаки на момент отказа.

Кинезогидродинамическое исследование проводилось по стандартному протоколу [3, 4, 5], с совместным анализом временных характеристик заплывов и динамики формирования утомления у лабораторных животных.

Оба этапа исследования проводились на трех группах животных: контрольная группа (КГ) и две группы животных, которым за 1 ч до нагрузки вводилось фармакологическое средство с заведомо психостимулирующим действием (ОГ1) или седативным действием (ОГ2). Наличие соответствующего психоактивирующего или психоседативного действия было предварительно подтверждено исследованиями спонтанной поведенческой активности животных (с помощью тест-системы «Laboras», Нидерланды) и методом оценки ультразвуковой локализации животных [2, 4, 5].

Исследование выполнено на нелинейных лабораторных белых крысах-самцах массой 180-210 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Маркировка клетки кодировала пол животных, дату начала введения препаратов, название группы. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер. Крысы содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem группами по 3

особи. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

Протокол исследования был разработан в соответствии с требованиями Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [6] и Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [9] и одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Фармакологические маркеры, влияющие на психоэмоциональное состояние животных, вводились с помощью атравматичного внутрижелудочного зонда за 1 ч до исследования (группы ОГ1 и ОГ2) в 0,5 мл физ. р-ра. Животным контрольной группы (КГ) вводили эквивалентное количество физ. р-ра.

Результаты и их обсуждение

При выполнении повторного теста вынужденного плавания до отка-

за было установлено, что животные контрольной группы способны перенести от трех до шести повторений данного нагрузочного теста. Частотный анализ распределения значений времени предельного плавания животных в первых трех повторениях, выполненных всеми животными, представлен на рис. 1.

При анализе рис. 1 обращает на себя внимание, что данные первого заплыва, которые обычно интерпретируются как показатель работоспособности (динамической выносливости) животных не имеют признаков, близких к кривой нормального распределения. Они характеризуются практически плоским распределением во временном разрезе 81-140 сек, с быстрым подъемом и асимметричным «скосом» в сторону больших значений. Такой тип картины частотного распределения наиболее типичен для случаев, когда анализируемая величина не является случайной, и на нее воздействуют несколько разных внешних факторов.

Для показателей T2 и T3 параметры частотного распределения также не соответствуют требованиям нормального статистического распределения. При этом между зонами максимумов на кривых частотного распределения отмечается закономерный сдвиг, отражающий утомление животных. Проверка этой гипотезы методом однофакторного дисперсионного анализа показывает, что различия между кривыми закономерно связаны именно с утомлением как контролируемым фактором (коэффициент детерминации модели $D=0,77$; $F=117,3$; $F_{cr}=3,1$; $p=6 \cdot 10^{-23}$). В связи с этим, для характеристики процессов утомления в рамках анализируемой методики целесообразно ввести коэффициент утомляемости животных (КУ), отражающий отношение времени плавания в третьей попытке к времени в первом выполнении теста ($KY=1- T3/T1$).

В КГ значения этого показателя находились в диапазоне от 0,48 до 0,83, при среднем значении $0,69 \pm 0,02$. Частотная

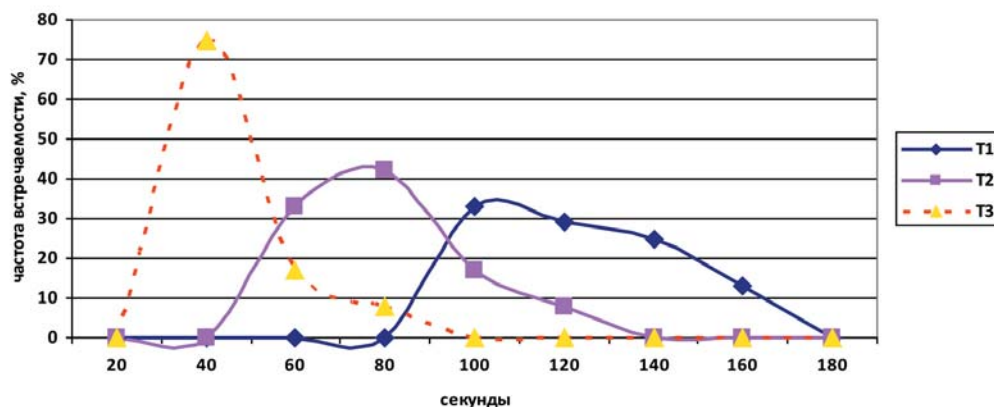


Рис. 1. Частотные кривые распределения значений времени вынужденного плавания животных в первых трех попытках выполнения теста. Обозначения: T1 – время 1-й попытки, T2 – время 2-й попытки, T3 – время 3-й попытки.

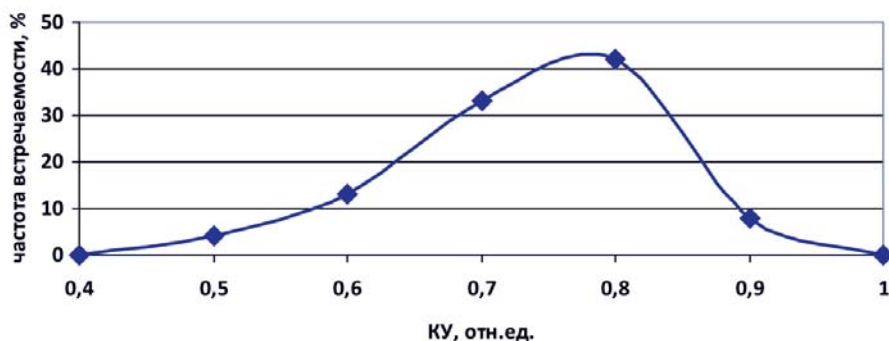


Рис. 2. Кривая частотного распределения коэффициента утомляемости животных КГ.

кривая распределения этой величины представлена на рис. 2.

Анализ рис. 2 и статистических параметров, характеризующих показатель утомления, свидетельствует о том, что КУ имеет характеристики, близкие к нормальному статистическому распределению (среднее значение близко к медиане распределения, индекс эксцесса равен $-0,09$, индекс асимметрии равен $-0,45$), а коэффициент вариации, равный $0,06$, свидетельствует о стабильности этого показателя. Анализ точек перегибов частотной кривой позволяет выявить границы диапазонов высокой, низкой и средней утомляемости. При КУ менее $0,6$ животные могут быть отнесены к группе с низкой утомляемостью (высокой работоспособностью), в диапазоне от $0,61$ до $0,8$ — средней утомляемостью, более $0,8$ — с высокой утомляемостью (низкой работоспособностью). В КГ отмечается несколько меньшее, чем должно быть при нормальном статистическом распределении, количество животных с высокой утомляемостью, что отражается в более низких зна-

чениях «правого крыла» кривой распределения.

Таким образом, коэффициент КУ, определяемый как единица минус отношение времени выполнения теста предельного плавания при третьем нагрузочном тестировании к времени первой пробы, может быть интерпретирован как показатель утомляемости животных.

В моделях, связанных с повторным выполнением нагрузок, важную информацию несет показатель количества выполненных тестовых заданий, который обычно интерпретируется как показатель выносливости. В нашем исследовании в КГ его значения находились в достаточно узком диапазоне ($3-6$) при среднем значении $4,1 \pm 0,2$. Его статистические параметры частично близки к характеристикам нормального распределения (среднее значение, мода и медиана распределения близки между собой, но индексы эксцесса ($=-0,93$) и асимметрии ($=0,63$) не являются оптимальными для нормального распределения). Кривая распределения значений этого показателя в КГ представлена на рис. 3.

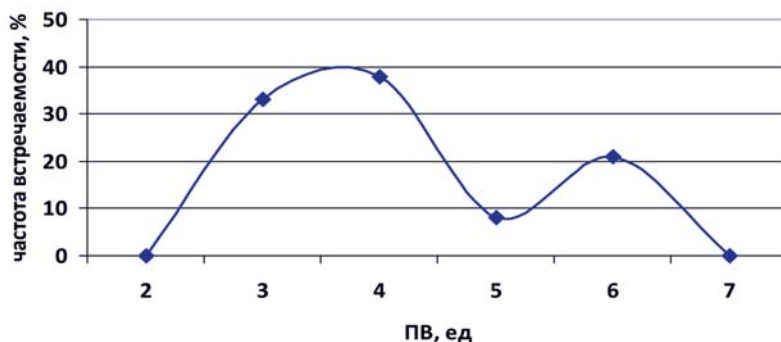


Рис. 3. Частотная кривая распределения значений показателя выносливости (ПВ) в КГ.

Анализ рис. 3 показывает, что он фактически состоит из наложения двух кривых, каждая из которых близка к кривой нормального распределения. Одна из кривых характеризует животных со средним уровнем выносливости по этой модели, а другая – с высоким уровнем выносливости. Обращает на себя внимание отсутствие животных с низким уровнем выносливости (способных выполнить только 1-2 заплыва). Возможно, такая картина распределения животных КГ по уровням выносливости отражает особенности использованных в работе нелинейных крыс.

Следующий показатель, который может отражать работоспособность животных в модели повторного выполнения теста предельного плавания, – это объем выполненной животными работы, который будет пропорционален суммарному времени

плавания животных и степени утяжеления, с которым животные выполняют тест. Т.к. степень утяжеления у всех животных стандартная (10% от массы тела), то объем выполненной работы будет пропорционален суммарной продолжительности плавания с грузом. Корреляционный анализ (ранговый коэффициент корреляции по Спирмену) показал, что этот показатель связан с показателем выносливости ($r=+0,87$) и временем выполнения первого тестового задания ($r=0,82$), а, следовательно, можно предположить возможное расщепление группы контрольных животных по уровням выносливости и индивидуальным особенностям, отражающимся в показателях Т1 (времени выполнения первого тестового задания). Частотный анализ распределения значений этого показателя представлен на рис. 4.

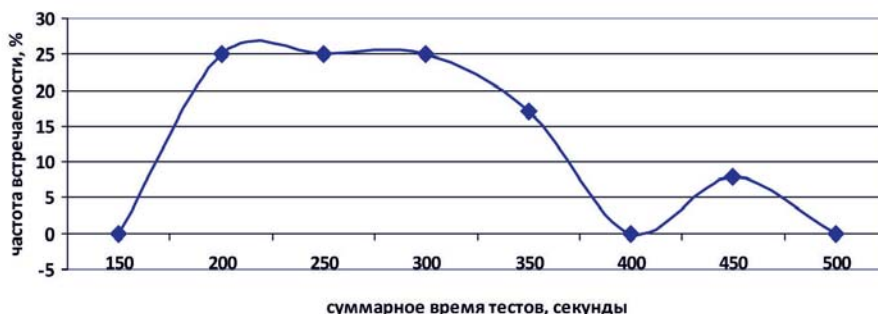


Рис. 4. Кривая частотного распределения показателя объема выполненной работы (работоспособности) животных КГ.

Анализ рис. 4 показывает, что показатель объема выполненной работы по характеру распределения далек от нормального, что не позволяет использовать его в полной мере для характеристики работоспособности животных. Однако он позволяет дифференцировать группу животных с высоким уровнем работоспособности, которая практически полностью определяется уровнем выносливости животных. Как показал факторный дисперсионный анализ, уровень выносливости определяет 76% всей дисперсии этого показателя ($D=0,76$; $F=32,9$; $F_{cr}=3,5$; $p=4 \cdot 10^{-7}$). В остальной массе животных со средним уровнем выносливости этот показатель находится под совместным влиянием нескольких неконтролируемых факторов (по аналогии с показателем T1), что не позволяет дать ему статистически корректную характеристику.

С методической точки зрения, важным является еще один показатель – значение времени плавания, при котором происходит отказ животного от

дальнейшего выполнения теста (Ткр). В КГ оно находится в диапазоне 20-30 сек, при среднем значении $26,1 \pm 0,6$. Частотная кривая его распределения представлена на рис. 5. Следовательно, при достижении в ходе исследования предельного времени плавания, находящегося в этом диапазоне, дальнейшее выполнение нагрузочной пробы можно прекратить. Скорее всего, сам диапазон критического уровня выполнения нагрузки может отражать характерологические особенности используемых в работе животных.

Таким образом, проведенный статистический анализ показал, что модель повторного выполнения теста предельного плавания с грузом 10% от массы тела животного до отказа позволяет статистически корректно интерпретировать такие показатели, как коэффициент утомляемости (КУ), равный отношению времени третьего тестирования к первому, и показатель выносливости (ПВ), равный количеству выполненных тестовых заданий. Такие показатели, как

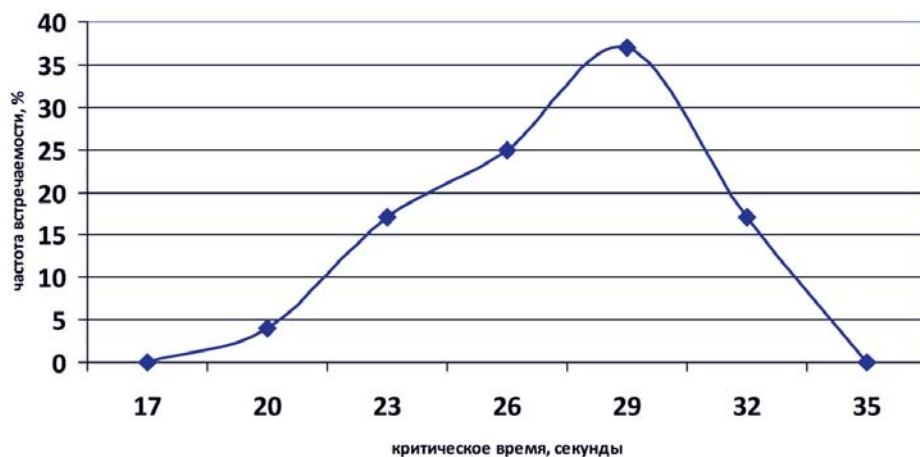


Рис. 5. Частотная кривая распределения времени выполнения теста при отказе животного (Ткр).

время выполнения первого тестового задания (а также второго и третьего) и объем выполненной работы, по результатам КГ не могут быть статистически корректно интерпретированы.

С целью дальнейшего анализа выполнено исследование с применением фармакологических анализаторов, повышающих активность нервной системы животных (ОГ1) и снижающих ее активность (ОГ2).

Результаты исследований с применением фармакологических анализаторов представлены в табл. 1.

Анализ табл. 1 показывает, что показатели модели повторного выполнения вынужденного плавания (время 1-го и 3-го выполнения теста, а также коэффициент утомляемости) чувствительны к снижению уровня активации нервной системы. Причем, вероятно, за счет определенного экономизирующего дей-

ствия при низком уровне активации время выполнения 3-го теста было больше (+31%), и, следовательно, коэффициент утомляемости – ниже (-30%) по сравнению с КГ. Также к снижению уровня активации был чувствителен и основной показатель плавательного теста в классическом варианте исполнения (однократное предъявление нагрузки) – -22% по отношению к КГ. Обращает на себя внимание, что дополнительное стимулирование активности нервной системы животных не вызвало статистически достоверных отличий от КГ. Следовательно, в КГ присутствует достаточно высокая доля животных с повышенной активностью нервной системы, что может оказывать влияние на показатели частотного распределения значений анализируемых показателей.

С целью более детального анализа влияния уровня активации нервной

Таблица 1

Влияние фармакологических анализаторов на показатели модели повторного вынужденного плавания с грузом 10% от массы тела

Показатель	Контрольная группа (обычный уровень активности)	Повышение уровня активности	Снижение уровня активности
T1, сек	114±4	126±8	90±2 (78%, p=0,01)
T2, сек	69±4	78±9	65±9
T3, сек	36±2	44±5	47±8 (131%, p=0,05)
Ткр, сек	26,1±0,6	26,0±1,1	27,5±1,2
Коэффициент утомляемости, отн. ед.	0,69±0,02	0,65±0,04	0,48±0,08 (79%, p=0,0005)
Показатель выносливости, ед.	4,2±0,2	4,3±0,3	4,5±0,3
Работоспособность (суммарное время плавания, сек)	254±14	293±24	249±30

Примечание: достоверность различий между группами оценивалась по F-критерию (метод дисперсионного анализа ANOVA).

Таблица 2

Влияние фактора «активация нервной системы» на показатели модели повторного выполнения плавательного теста с нагрузкой 10% от массы тела

Показатель	Центроиды групп по уровням активации			D	p
	низкий	обычный	повышенный		
T1	90	114	126	0,25	0,008
T2	65	69	78	0,04	0,54
T3	47	36	45	0,13	0,11
Tкр	27	26	26	0,03	0,57
KУ	0,48	0,69	0,65	0,32	0,002
ПВ	4,5	4,2	4,3	0,004	0,74
A	249	254	293	0,05	0,45

Примечание: D – коэффициент детерминации (показывает, какую долю дисперсии показателя объясняет анализируемый фактор), p – уровень значимости модели.

системы на показатели модели массив данных был подвергнут процедуре однофакторного дисперсионного анализа по контролируемому фактору «уровень активации нервной системы». Его результаты представлены в табл. 2.

Таким образом, от уровня активации нервной системы значимо и статистически достоверно зависят два показателя: T1, который монотонно возрастает при повышении уровня активации нервной системы животных; и коэффициент утомляемости, который закономерно снижается при низком уровне активности нервной системы.

Ранее мы уже отмечали, что характер частотной кривой распределения значений показателя T1 в КГ отражает его зависимость от нескольких факторов. Одним из таких факторов является уровень активации нервной системы. Вторым фактором может стать врожденная биологическая характеристика животных – выносливость. Для проверки этой гипотезы был выполнен двухфакторный дисперсионный анализ показателя T1, где в качестве контролируемых факторов выступали уровень активации нервной системы и показатель выносливости. Его результаты отражены в табл. 3.

Таблица 3

Двухфакторный дисперсионный анализ показателя T1

Фактор	Уровень влияния на дисперсию T1 (D)	Уровень значимости (p)
A (выносливость)	0,17	0,04
B (активность нервной системы)	0,25	0,008
A*B (взаимодействие факторов)	0,04	0,74
Контролируемые факторы суммарно	0,435	0,039
Неконтролируемые факторы	0,565	

Таким образом, дисперсию показателя Т1 (время вынужденного плавания животных при однократном выполнении теста) на 25% определяет уровень выносливости животных, на 17% – уровень активности их нервной системы, еще 4% дает вклад взаимодействия этих факторов. Неконтролируемые же факторы определяют более половины всей дисперсии этого показателя в КГ.

На втором этапе исследования нами были проанализированы «точки срыва» работоспособности, отказа животных от дальнейшего выполнения нагрузки в кинезогидродинамическом исследовании. С этой целью были сформированы два аналитических массива, подвергнутых частотному анализу. В первый массив были включены данные фонового плавания животных до их рандомизации на группы, и результаты КГ животных, которые не подвергались воздействию ка-

ких-либо фармакологических средств. Во второй массив были сведены результаты кинезогидродинамического исследования животных, подвергавшихся воздействию препаратов с умеренным и выраженным психоактивирующим действием, верифицированным по данным тестов поведенческой активности животных (с помощью тест-системы «Laboras») и по анализу ультразвуковой вокализации (с помощью системы «Sonotrack»).

Результаты частотного анализа времени отказа животных от выполнения нагрузки представлены в табл. 4.

Также частотному анализу были подвержены данные по предельному количеству заплывов, после которых животное отказывалось от дальнейшего выполнения нагрузки. Эти данные, проанализированные в ранее сформированных массивах, представлены в табл. 5.

Таблица 4

Частоты встречаемости времени отказа животных от выполнения нагрузки (%)

Массив	Диапазоны времени отказа (сек)				
	0-9	10-19	20-29	30-39	40 и более
Фон + контроль	1	55	32	6	6
Умеренная активация НС	0	10	20	5	65
Выраженная активация НС	0	0	35	55	10

Таблица 5

Частоты встречаемости (%) количества заплывов, после которых животное отказывалось от дальнейшего выполнения нагрузки

Группа	Диапазоны количества заплывов					
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18
Фон + контроль	86	14				
Умеренная активация НС	0	35	55			
Выраженная активация НС	0	0	10	30	20	40

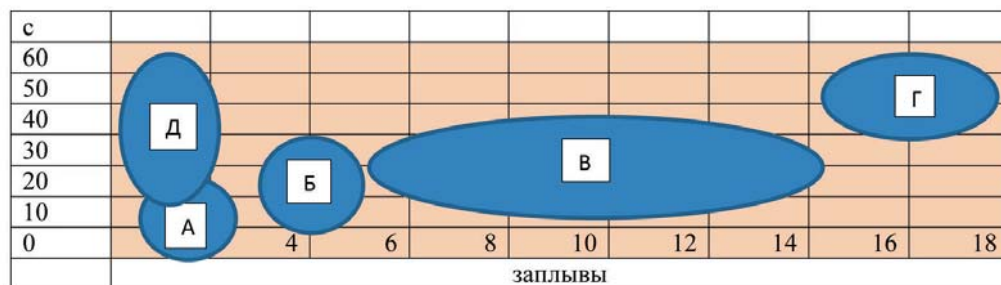


Рис. 6. Возможные причины отказа животных от выполнения нагрузок в кинезогидродинамическом исследовании. А – «истерический», эмоциональный отказ. Б – «истощение нервной». В – утомление. Г – переутомление, истощение общее. Д – функциональный дефицит.

Результаты совместного анализа табл. 4-5 представлены на рис. 6.

Зона А характеризуется высокой скоростью плавания животных, но с очень небольшим (1-2) количеством заплывов. Утомление за это время развиться не успевает, и отказ от дальнейших нагрузок носит эмоциональный, «истерический» характер.

Зона Б характеризуется небольшим объемом работы (3-5 заплывов), нарастанием продолжительности заплывов в 1,5-2 раза (до 30 сек). Отказ при этом может быть связан с формированием коркового утомления, при сохранении метаболических резервов организма.

Зона В характеризуется развитием выраженного утомления (5-14 заплывов) и отчетливым динамичным снижением скорости плавания к концу исследования до 40-45 сек. Отказ животного от дальнейшей нагрузки вызван выраженным утомлением.

Зона Г характеризуется максимально большим объемом выполненной работы (15 и более заплывов), причем последние заплывы осуществляются на пределе возможности животного (продолжительность заплывов более 45 сек). Такое состояние животного может отражать

состояние переутомления, начальные проявления общего истощения организма, что и обуславливает отказ от дальнейшей физической работы.

Теоретически возможна еще одна ситуация (зона Д) – малое количество заплывов (1-2) при медленном плавании животных. Такое состояние может отражать неврологический (или метаболический) дефицит у животного, ограничивающий его возможности к выполнению нагрузок (например, после моделирования тканевой гипоксии, инфаркта миокарда, черепно-мозговых травм и т.д.).

Проведенный анализ показал, что без фармакологической поддержки в 85% случаев причиной отказа животных от продолжения нагрузки в кинезогидродинамической модели являются эмоциональные факторы, и только в 15% – утомление центрального генеза.

Применение препаратов с умеренной психоактивирующей активностью ведет к тому, что в 80% случаев причиной отказа животных от продолжения нагрузок является утомление, а в 20% случаев – утомление центрального генеза. Следовательно, основные эффекты средств с умеренным психоактивирующим дейст-

вием в отношении работоспособности животных могут быть отнесены к ней-роактивирующим влияниям (повышение активности, расширение диапазона используемых функциональных резервов до уровня утомления).

Применение препаратов с высокой психоактивирующей активностью ведет к тому, что в 60% случаев животные выполняют нагрузки до стадии выраженного утомления, а в 40% случаев причиной прекращения нагрузки может быть состояние переутомления, общего истощения. Следовательно, влияние высокого уровня активации нервной системы в отношении работоспособности животных может быть направлено на выключение механизмов формирования утомления, резкое повышение выносливости, обеспечение возможности выполнения нагрузок в диапазоне переутомления и частичного истощения функциональных резервов организма.

Заключение

Стандартно используемый показатель работоспособности лабораторных животных – время вынужденного плавания крыс с грузом 10% от массы тела имеет статистическое распределение, отличное от нормального. Двухфакторный дисперсионный показал, что дисперсия этого показателя на 25% определяется уровнем активации нервной системы животных, на 17% – выносливостью, 4% объясняются взаимодействием первых двух факторов, но основное значение (54% от дисперсии) приходится на неконтролируемые факторы. В связи с этим интерпретация данного показателя как показателя работоспособности (динамической выносливости) животных не может считаться корректной.

Разработана новая модель исследования выносливости и скорости развития утомления (утомляемости) животных на основе многократного предъявления плавательной нагрузки с утяжелением 10% от массы тела.

Полученные данные анализа «точек срыва» работоспособности при выполнении нагрузочных плавательных тестов («истерические срывы», нервно-динамическое утомление, общее утомление, истощение резервов) должны учитываться при интерпретации результатов доклинического исследования новых лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность лабораторных животных.

Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. 2013. № 1. С. 7-17.
2. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Шустов Е.Б. Анализ поведенческих характеристик и ультразвуковой вокализации лабораторных крыс при фармакологической коррекции их эмоционального состояния // Биомедицина. 2015. № 3. С.33-42.
3. Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Алимкина О.В., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д. Факторы, влияющие на физическую работоспособность лабораторных животных в кинезогидродинамическом исследовании // Биомедицина. 2015. № 4. С. 23-29.
4. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н. Кинезогидродинамическая модель для оценки выносливости и работоспособности лабораторных животных // Биомедицина. 2012. № 4. С. 6-14.
5. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции. - М., СПб.: Айсинг, 2013. 288 с.
6. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

7. *Рылова М.Л.* Методы исследования хронического действия вредных факторов в эксперименте. - Л.: Медицина. 1964. 48 с.
8. *Dawson C., Horvath S.* Swimming in small laboratory animals // *Med. Sci. Sports.* 1970. V. 2 P. 51-78.
9. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123). - Strasburg, 1986.
10. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., et al.* Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 47. P. 379-391.

Features interpretation of laboratory animal health indicators in swimming tests with load

**V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, I.A. Berzin,
Yu.V. Fokin, O.V. Alimkina**

Developed modification method repetitious swimming with loading 10% of body weight, which allows more clearly assess the endurance and speed the formation of fatigue in rats. A statistical analysis of the methodology allows producing a population transfer of the results obtained. On the basis of an analysis of the breakdown of points of efficiency in forced swimming with loading test 10% of body weight and kinezo hydrodynamic studies offered new aspects of the interpretation of the data.

Keywords: laboratory animals, biomedical research, physical fitness, swimming tests, kinezo hydrodynamic study.

Использование мини-свиней светлогорской популяции в качестве биомодели для изучения иммунного ответа на введение иммуноглобулина G лошади

А.Г. Берзина¹, Н.В. Станкова², Л.И. Ульянова¹, Н.Б. Гамалея¹,
Г.Д. Капанадзе²

¹ – НИИ наркологии – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва

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

Контактная информация: к.б.н. Станкова Наталья Владимировна, sinayva@yandex.ru

Оптимизирована методика определения свиных антител против иммуноглобулина (Ig) класса G лошади методом иммуноферментного анализа (ИФА). На мини-свиньях светлогорской популяции исследовано формирование иммунного ответа на введение Ig G лошади. Свиноматку иммунизировали Ig G лошади в дозе 0,2 мг/кг, через 14 дней антиген вводили повторно. Через 6 мес. цикл инъекций повторяли с использованием меньшей дозы антигена (0,1 мг/кг). Потомство, рождённое после реиммунизации свиноматки, подвергалось проверке на содержание антител к Ig G лошади в возрасте 5 и 10 мес. В качестве контроля в реакции ИФА использовали сыворотку крови неиммунной свиньи. Определение титра антител проводили на 21-й и 142-й день от произведенных инъекций. Полученные результаты свидетельствуют о высокой иммуногенности антигена – Ig G лошади. После одного цикла иммунизации титр антител к Ig G лошади составил 1:100000. Реиммунизация животного через 6 мес. позволяет увеличить титр антител до 1:1000000. Содержание антител в сыворотке крови иммунной свиньи сохраняется высоким на протяжении 1,5 лет (титр 1:100000). Антитела к Ig G лошади, полученные поросятами внутриутробно из кровяного русла матери и присутствовавшие в титрах от 1:1000 до 1:10000 в возрасте 5 мес., постепенно исчезали. К 10 мес. титр антител уменьшался до 1:100.

Ключевые слова: иммуноглобулин G лошади, иммунный ответ, светлогорские мини-свиньи, потомство, биомодель.

Введение

Экспериментальные исследования на животных, позволяющие моделировать необходимые состояния и изучать динамику процесса, играют важную роль в решении многих проблем медицины. Одной из таких проблем является разработка антиидиотипических вакцин к психоактивным веществам (ПАВ). Антиидиотипические (вторичные) антитела, как известно, в их поливалентной форме могут быть использованы в качестве антигена при создании вакцинных препара-

тов [1, 2]. Ранее были получены данные, согласно которым антиидиотипические антитела способны выполнять сигнальную функцию антигена в том случае, когда они являются гетерологичными для реципиента [5]. В списке иммунобиологических препаратов, разрешённых к применению в лечебных целях у людей, основное место занимают иммуноглобулины человека, а также гетерологичные иммуноглобулины лошади.

Имуноглобулин лошади класса G (Ig G) обладает высокой иммуногенностью,

широко применяется в медицинской практике для лечения столбняка, дифтерии и бешенства. Однако при его применении у человека возможны аллергические реакции. При разработке антиидиотипических вакцин с использованием Ig G лошади нужно иметь представление о реакции иммунной системы на данный антиген. Для выяснения особенностей иммунного ответа необходимо проводить эксперименты на лабораторных животных–биомоделях. В последние годы в качестве биомодели человека при проведении биомедицинских исследований успешно используются мини-свиньи светлогорской популяции [3, 4, 7]. В связи с этим, при изучении вопроса о создании антиидиотипической вакцины от ПАВ нами было принято решение исследовать формирование иммунного ответа на Ig G лошади у светлогорских мини-свиней.

Цель данной работы – оптимизировать методику определения свинных антител против Ig G лошади методом ИФА и проследить динамику накопления в крови мини-свиньи светлогорской популяции антител к Ig G лошади с исполь-

зованием малых доз антигена в процессе иммунизации на протяжении 1,5 лет, а также выявить наличие антител к Ig G лошади у потомства иммунной мини-свиньи в разные возрастные периоды.

Материалы и методы

В работе в качестве антигена для иммунизации был использован коммерческий препарат Ig G лошади фирмы «Sigma» (США). В качестве биомоделей были использованы светлогорские мини-свиньи, которые содержались в оборудованном виварии с оптимальными условиями [6]. Свиноматке (в возрасте 8 мес. и массой 15 кг) вводили Ig G лошади в дозе 0,2 мг/кг в две точки задних конечностей внутримышечно в смеси 1:1 с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). Через 14 дней эти же дозы антигена вводили подкожно в область шейных лимфоузлов в смеси 1:1 с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ). Третью инъекцию проводили аналогичным образом через 14 дней. Заборы крови осуществляли из краниальной полой вены на 21-й день от последней инъекции (рис. 1).



Рис. 1. Забор крови у мини-свиньи из краниальной полой вены.

Через 6 мес. цикл инъекций повторяли с использованием меньшей дозы препарата (0,1 мг/кг). Титр специфических антител определяли с помощью непрямого варианта ИФА с использованием антивидового иммунопероксидазного конъюгата фирмы «Sigma» (США). Для блокировки неспецифической реакции в буфер (PBST) добавляли 0,3% бычьего сывороточного альбумина (БСА). За величину титра принимали максимальное разведение сыворотки, при котором оптическая плотность (ОП) при длине волны 490 нм превышала значения в контроле в два раза. В качестве контроля в реакции ИФА использовали сыворотку крови неиммунной свиньи. Потомство, рождённое после реиммунизации свиноматки в период первой беременности, подвергалось проверке на содержание антител к Ig G лошади в возрасте 5 мес. (первая проверка), вторую проверку поросётам проводили в возрасте 10 мес. Одному из поросётов того же потомства в возрасте 5 мес. вводили внутримышечно антиген в дозе 0,1 мг/кг в смеси 1:1 с ПАФ. Определение титра антител проводили на 21-й и 142-й день от произведенной инъекции.

Физиологическое состояние животных оценивали визуально, проводили

взвешивание в начале эксперимента и через полгода, а также измеряли ректальную температуру.

Результаты и их обсуждение

В ходе выполнения работы были подобраны оптимальные условия для определения свинных антител к Ig G лошади методом ИФА. Поскольку, по литературным данным, у свиньи и лошади имеется частичное серологическое родство между иммуноглобулинами класса G, то в реакции с контрольной сывороткой неиммунной свиньи возможны высокие фоновые значения. Для снижения фоновых значений были подобраны оптимальные условия постановки ИФА (концентрация антигена, сорбированного на твердой фазе – 2 мкг/мл, разведение антивидового конъюгата 1:10000, концентрация субстрата орто-фенилендиамина (ОФД) – 2мг/мл). Несмотря на оптимизацию условий, значения ОП в контроле оставались довольно высокими (0,2 ед. ОП). Определение титра специфических антител к Ig G лошади в сыворотке мини-свиньи №454 после первого цикла иммунизации, проведенного в апреле 2015 г., показало наличие антител в разведении сыворотки 1:100000 (май 2015 г., рис. 2).

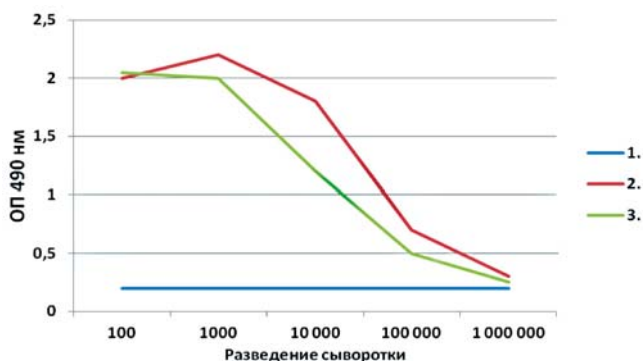


Рис. 2. Титры антител в сыворотках крови свиноматки № 454 против Ig G лошади после первого цикла иммунизации в 2015 г.: 1 – контроль, сыворотка неиммунной свиньи; 2 – сыворотка иммунизированной свиньи (май 2015 г.); 3 – сыворотка неиммунной свиньи (сентябрь 2015 г.).

На протяжении 4 мес. (с мая по сентябрь 2015 г.) титр антител оставался практически неизменным. Вторым циклом иммунизации проводили в октябре 2015 г. (через 6 мес. от начала иммунизации) с использованием меньших доз антигена – 0,1 мг/мл. В результате, к концу декабря 2015 г. титр антител у свиноматки составил 1:1000000 (рис. 3).

На протяжении длительного времени титр антител оставался высоким (1:100000). Результаты тестирования антисывороток в июле и октябре 2016 г. представлены на рис. 4.

В потомстве свиноматки, рожденном вскоре после реиммунизации (январь 2016 г.), нами также был определен титр антител к Ig G лошади. Обнаруже-

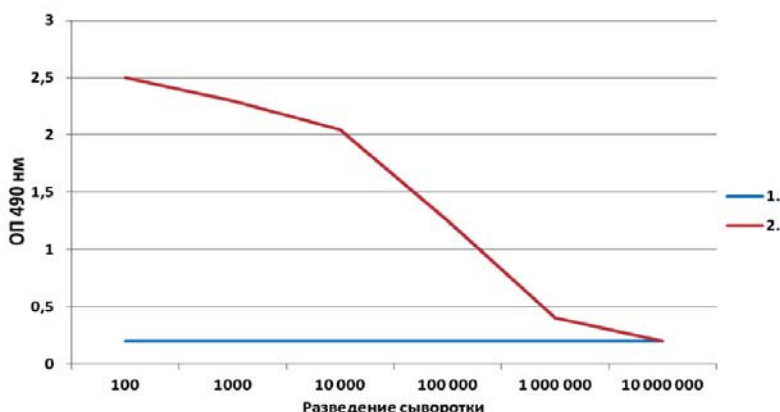


Рис. 3. Титры антител в сыворотках крови свиноматки № 454 против Ig G лошади после второго цикла иммунизации в 2015 г.: 1 – контроль, сыворотка неиммунной свиньи; 2 – сыворотка иммунной свиньи (декабрь 2015 г.).

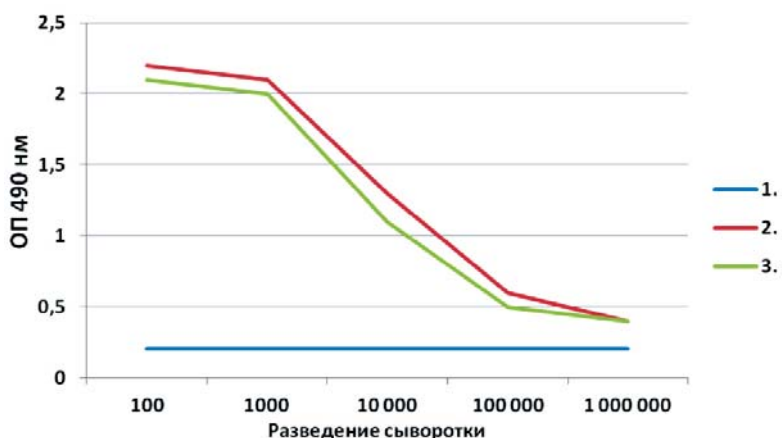


Рис. 4. Титры антител в сыворотках крови свиноматки № 454 против Ig G лошади после однократной внутримышечной инъекции в июне 2016 г.: 1 – контроль, сыворотка неиммунной свиньи; 2 – сыворотка иммунной свиньи (июль 2016 г.); 3 – сыворотка иммунной свиньи (октябрь 2016 г.).

но, что все поросята в возрасте 5 мес. обладали материнским иммунитетом к данному антигену, однако антитела в их сыворотках присутствовали в меньших количествах (титры от 1:1000 до 1:10000), чем у матери. Через 5 мес. в сыворотках десятимесячных поросят антител практически не осталось (титр 1:100, рис. 5).

Однако у поросенка из данного потомства, получившего всего одну инъекцию антигена в дозе 0,1 мг/кг в возрасте 5 мес., титр антител сохранялся высоким (1:10000) до 10 мес. (рис. 6).

Ректальная температура у животных не изменялась в процессе иммунизации и оставалась на уровне 38,6°C, что свидетельствует об отсутствии неблагопри-

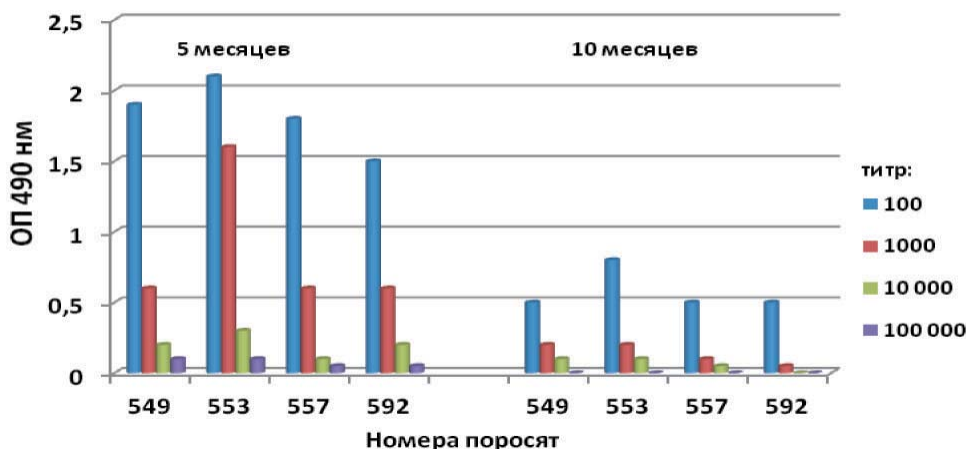


Рис. 5. Титры антител против Ig G лошади в сыворотках крови потомства свиноматки № 454 (в возрасте 5 и 10 мес.).

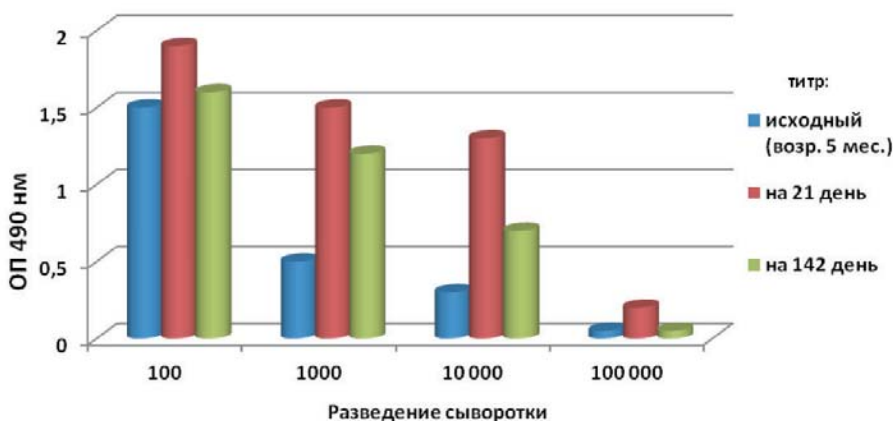


Рис. 6. Титры антител против Ig G лошади в сыворотке крови поросёнка № 555, получившего в 5 мес. одну внутримышечную инъекцию антигена.



Рис. 7. Свиноматка № 454 со вторым пометом (ноябрь 2016 г.).

ятного влияния Ig G лошади на организм свиней. Животные нормально росли и развивались согласно своему возрасту, имели хороший аппетит и адекватное поведение. Масса свиноматки № 454 через 6 мес. от начала иммунизации составила 30 кг, что также является нормой для данного вида, позже от нее было получено еще одно здоровое потомство (рис. 7).

Заклучение

Таким образом, полученные нами результаты по иммунизации мини-свиньи светлогорской популяции антигеном Ig G лошади свидетельствуют о высокой иммуногенности данного антигена. Оптимизирована методика определения свинных антител против Ig G лошади методом ИФА. После одного цикла иммунизации титр антител к Ig G лошади составил 1:100000. Реиммунизация животного через 6 мес. позволяет увеличить титр антител до 1:1000000. Содержание антител в сыворотке крови иммунной свиньи сохраняется высоким на протяжении 1,5 лет (титр 1:100000). Антитела к иммуноглобулину лошади,

полученные поросятами внутриутробно из кровяного русла матери и присутствующие в титрах от 1:1000 до 1:10000 в возрасте 5 мес., постепенно исчезают. К 10 мес. титр антител уменьшается до 1:100. Однократная инъекция антигена в дозе 0,1 мг/кг свиноматке и ее пятимесячному поросенку позволила продлить высокое содержание антител в крови матери (титр 1:1000000) и поросенка (титр 1:10000) до полугода. Побочных эффектов у животных при иммунизации с использованием предложенной нами схемы не наблюдалось.

Список литературы

1. *Бяловский Ю.Ю., Булатецкий С.В.* Изменения иммунологических показателей в условиях увеличенного сопротивления дыханию у спортсменов // Спортивная медицина: наука и практика. 2016. № 2. С. 29-34.
2. *Гамалея Н.Б., Берзина А.Г.* Вакцины от наркотиков – новое перспективное направление профилактики злоупотребления ПАВ // Наркология. 2011. № 10. С. 70-83.
3. *Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Станкова Н.В.* Получение диагностических антисывороток к морфину на мини-свиньях светлогорской популяции // Биомедицина. 2014. № 3. 96 с.

4. *Капанадзе Г.Д.* Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // Биомедицина. 2006. № 2. С.40-51.
5. *Кульберг А.Я.* Антииммуноглобулины. - М.: Медицина. 1978. 183 с.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
7. *Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д.* Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции // Биомедицина. 2012. № 1. С 49-53.

Svetlogorsk mini-pigs as a biomodel for studying the immune response of the horse immunoglobulin G

**A.G. Berzina, N.V. Stankova, L.I. Ul'yanova, N.B. Gamaleya,
G.D. Kapanadze**

The technique of detecting pig antibodies against the horse immunoglobulin (Ig) of the G class was optimized by the method of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Formation of the immune response against the horse Ig G was investigated on Svetlogorsk mini-pigs. The sow was immunized with the horse Ig G at a dose of 0.2 mg/kg, 14 days after the antigen was administered again. After 6 months, the injection cycle was repeated using a smaller dose of the antigen (0.1 mg/kg). The offspring born after reimmunization of the sow was tested for the content of antibodies against the horse Ig G at the age of 5 and 10 months. Blood serum of non-immune pigs was used as a control in ELISA. Determination of the antibody titers was conducted on the 21st and 142nd day after injections. The results indicated the high immunogenicity of the antigen, horse Ig G. After one cycle of immunization, the titer of antibodies against horse IgG was 1:100000. Reimmunization of the animal after 6 months allows increasing the antibody titer up to 1:1000000. The content of antibodies in the blood serum of immune pigs remains high for 1.5 years (the titer was 1:100000). Antibodies against the horse IgG received by piglets in utero from the blood stream of their mother presented in titers from 1:1000 to 1:10000 at the age of 5 months and disappeared gradually. By the 10 months the antibody titer reduced to 1:100.

Key words: horse immunoglobulin G, immune response, Svetlogorsk mini-pigs, offspring, biomodel.

Метаболиты цианобактерий: компьютерный прогноз биологической активности неосакситоксина, гониатоксина II и аэругинозида 126A

Я.В. Русских¹, Е.Н. Чернова¹, Е.И. Афонина¹, З.А. Жаковская¹,
Е.В. Федорова², В.А. Островский^{1,3}

¹ – ФГБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН», Санкт-Петербург

² – ООО «ВВС Лаб», Санкт-Петербург

³ – Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург

Контактная информация: Русских Яна Владимировна, yanarussk@gmail.com;
Федорова Елена Викторовна, elena.vic.fedorova@gmail.com

С помощью методов компьютерного моделирования выявлены новые и подтверждены ранее известные виды биологической активности для ряда наиболее распространенных цианобактериальных метаболитов (микроцистинов, анабаенопептинов, сакситоксинов). В рамках дизайна, основанного на структуре мишени (structure-based drug design), изучены докинг-взаимодействия (3D-QSAR) с участием молекул цианометаболитов. На основе результатов проведенного исследования были отобраны наиболее перспективные кандидаты для дальнейшего изучения – неосакситоксин (neosaxitoxin), гониатоксин II (gonyautoxin GTX2) и аэругинозид 126A (aeruginoside 126A), для которых отмечено проявление свойств цитостатиков, противоопухолевых антибиотиков и антикоагулянтов.

Ключевые слова: цианометаболиты, сакситоксины, аэругинозид 126A, методы компьютерного моделирования, PASS, QSAR, биологическая активность.

Введение

В последние десятилетия доминирующее положение в составе фитопланктона во многих пресноводных и морских экосистемах занимают цианобактерии (фотосинтезирующие прокариоты) [18]. Большинство метаболитов цианобактерий проявляют различные виды биологической активности. В настоящее время широко проводятся исследования метаболитов цианобактерий как потенциальных лекарственных средств, обладающих эффективностью и селективностью действия и проявляющих противоопухолевую, противовирусную, противомикробную, противомаларий-

ную, антигрибковую активность; предложено их использование в качестве антифидантов, гербицидов и иммунодепрессантов [4, 18]. Так, сакситоксины – соединения, принадлежащие группе нейротоксичных цианобактериальных метаболитов, рассматриваются как эффективные анестезирующие и обезболивающие средства [8, 17]. В ходе клинических испытаний было показано, что неосакситоксин обеспечивает более выраженный анестезирующий эффект по сравнению с применяемыми в настоящий момент аналогами новокаина (Bupivacaine) [17], а гониатоксин II может использоваться для лечения патологий,

вызванных мышечными спазмами [8]. В то же время не следует пренебрегать вероятностью проявления этими соединениями более широкого спектра биологической активности.

Благодаря новым возможностям выделения таких соединений из объектов окружающей среды [9], развитию методов компьютерного моделирования [11], а также успехам тонкого органического синтеза [6, 10, 14], целесообразность исследования цианометаболитов как перспективных объектов медицинской химии возрастает.

В связи с этим, **целью** работы являлось компьютерное прогнозирование спектра биологической активности наиболее распространенных в водоемах России цианометаболитов – микроцистинов, анабаенопептинов, сакситоксинов и азругинозидов.

В рамках настоящего исследования использовали два альтернативных подхода: PASS (prediction of activity spectra for substances) прогнозирование и 3D-QSAR моделирование. Качественный прогноз и определение спектра биологической активности осуществляли с использованием программного комплекса PASS с целью отбора наиболее перспективных кандидатов. Для выбранных соединений проводили последующий количественный анализ с помощью 3D-QSAR моделирования [1].

Материалы и методы

Для проведения исследования была предложена следующая схема эксперимента. На первом этапе было проведено компьютерное моделирование для оценки биологической активности наиболее часто детектируемых нами цианомета-

болитов. Далее для соединений, показавших наиболее интересные результаты, были изучены возможности их получения путем химического синтеза и/или выделения из объектов окружающей среды с использованием хроматографических методов.

Компьютерное моделирование

PASS Refined 2014 – компьютерная программа, позволяющая выполнять прогноз спектров биологической активности химических соединений на основе анализа взаимосвязей «структура – активность» в обучающей выборке. Химическая структура соединений в PASS представлена в виде набора дескрипторов многоуровневых атомных окрестностей (multilevel neighborhoods of atom – MNA), для анализа взаимосвязей «структура–активность» использован модифицированный метод Байесовской статистики [5], биологическая активность описана на качественном уровне (наличие/отсутствие). Современная версия программы PASS – PASS Refined 2014 прогнозирует 7158 видов биологической активности, включая 480 терапевтических эффектов и 3818 механизмов действия со средней точностью около 95% (скользящий контроль с исключением по одному). Результаты прогноза PASS для каждой анализируемой молекулы содержат списки мишеней с оценками вероятности наличия взаимодействия – P_a и вероятности отсутствия взаимодействия – P_i , которые могут принимать значения в диапазоне от нуля до единицы.

В данном исследовании прогноз и анализ возможных терапевтических эффектов и связанных с ними механизмов действия осуществлялся для ряда цианометаболитов с использованием

PASS 2014 Refined с порогом вероятности проявления предсказанной активности $P_a > 0,3$. Результаты прогноза с использованием программы PASS представлены в табл. 1 в виде списков предсказанных активностей, убывающих по вероятности их проявления. Данные, полученные с помощью PASS, могут быть использованы для выбора видов биологической активности, на которые следует протестировать анализируемое соединение в первую очередь, а также отбора претендентов на проявление данного вида биологической активности.

SYBYL: QSAR-моделирование («quantitative structure – activity relationship», или «количественное соотношение структура–активность») широко используется при поиске новых перспективных фармакологически активных веществ, поскольку наряду с наличием целевой специфической активности необходимо обеспечить минимум побочных и токсических эффектов и приемлемые фармакокинетические характеристики потенциального препарата [1]. В работе использовался 3D-QSAR-метод CoMFA (сравнительный анализ молекулярных полей) и методы молекулярного докинга и симуляции молекулярной динамики. Начальная оптимизация структуры проводилась с использованием молекулярной механики (пакет Sybyl-X), пространственное выравнивание лигандов выполнялось с использованием модуля Sybyl/GALAHAD [20]. В результате отбирались лучшие выравнивания, для каждого из них строились модели предсказания аффинности методом частичных наименьших квадратов на

основании полей CoMFA. Моделирование комплексов белок-лиганд осуществляли посредством докинга [19].

AutoDock Vina. На данный момент одними из самых используемых в научном сообществе программ докинга являются AutoDock и AutoDock Vina. Среди них AutoDock Vina лучше сортирует тестовую выборку. Кроме того, она работает существенно быстрее, чем AutoDock, и дает в среднем более воспроизводимые результаты. С учетом вышесказанного, докинг структур в данном исследовании произведен с помощью программы AutoDock Vina, которая разрешает изменения в конформации лиганда в процессе докинга, таким образом подбирая наиболее выгодную структуру. В процедуре докинга структуру молекулы белка принимали жесткой, в то время как молекулы лигандов были подвижными. Для поиска наиболее оптимальных положений лигандов в активном центре использовали Ламарковский генетический алгоритм [13] с параметрами по умолчанию, за исключением угла вращения вокруг ординарных связей и вращательного движения молекул, которые были равны 30° . Оценку качества позиционирования характеризовали величиной RMSD, представляющей собой среднеквадратичное отклонение положения лиганда после докинга от его нативного положения в белке. При этом результат докинга кластеризовали на основе величины $RMSD=2,0$ А. Оценка эффективности связывания лигандов с белком проводилась по полуэмпирической оценочной функции AutoDock Vina при наложении силового поля AMBER [2].

Аналитическое определение

Экстракция цианометаболитов из биомассы

Процедура пробоподготовки для масс-спектрометрического анализа цианобактериальных метаболитов включала в себя разрушение клеточной стенки бактерий при помощи лиофильной сушки или соникации с последующей ультразвуковой экстракцией водно-органическими смесями. Для извлечения микроцистинов и азругинозидов использовали метанол водный 75% [7]. Для экстракции сакситоксин-подобных вариантов применяли комплексную смесь в соотношении 40:60 (A:B), состоящую из 4 mM формиата аммония (pH=3,5) (фаза A) и смеси ацетонитрила с 4 mM формиатом аммония в соотношении 95:5 (фаза B) [9].

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Определение присутствующих в фитоплактоне водоемов цианометаболитов проводили с использованием хромато-масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap («Thermo Finnigan») с линейной и орбитальной ловушками в режиме электрораспылительной ионизации с регистрацией спектров положительных ионов. Идентификацию соединений проводили по рассчитанным с помощью программы NIST IsoForm ver. 1.02 (NIST formula and isotopic pattern generator, «NIST», США) точным массам ионов $[M+H]^+$ и $[M+2H]^{2+}$ (при условии их совпадения в пределах 5 ppm). Хроматографическое разделение экстракта биомассы для определения микроцистинов, анабаенопептинов и азругинозидов выполняли на обращенно-фазовой колонке типа Thermo Hypersil Gold (100×3 мм, 3 мкм)

в градиентном режиме. Хроматографическое разделение производных сакситоксинов (неосакситоксина и гониатоксина) осуществляли согласно работе [9] с использованием гидрофильной колонки TSK-gel Amide-80 (2,0×250 мм, 5 мкм) («Tosoh Bioscience», Япония) в изократическом режиме элюирования комплексной смесью в соотношении 40:60 (A:B), состоящей из 4 mM формиата аммония (pH=3,5) (фаза A) и ацетонитрила с формиатом аммония в соотношении 95:5 (фаза B).

Результаты и их обсуждение

При помощи хромато-масс-спектрометрического анализа были определены наиболее встречаемые и распространенные в северо-западной и центральной части России метаболиты цианобактерий. Далее, с помощью программного комплекса PASS был определен спектр биологической активности 16-ти наиболее распространенных цианометаболитов – микроцистинов, анабаенопептинов, сакситоксинов и азругинозидов.

Для микроцистинов и анабаенопептинов (циклические пептиды) выявлена ранее известная биологическая активность – ингибирование протеинфосфатазы и карбоксипептидазы соответственно. Кроме того, для анабаенопептинов отмечено проявление следующих видов активности: ингибитор протонного насоса (general pump inhibitor), церебральный антиишемический агент и антибиотик гликопептидного типа, о которых ранее не сообщалось.

Соединения из группы сакситоксинов (производные триалкилтетрагидропурина) показали разнообразную биологическую активность (противо-

опухолевый антибиотик, антибактериальный агент, ингибитор синтеза ДНК, антибиотик, радиопротектор). Для азругинозида 126А (гликопептид) отмечено

проявление следующих видов биологической активности: антитромботик, антагонист антикоагулянта тромбоцитов, тромболитик (табл. 1, 2).

Таблица 1

Прогнозируемые терапевтические эффекты и связанные с ними механизмы действия для гониатоксина II, неосакситоксина и азругинозида 126А

Гониатоксин II					
Pa	Pi	Эффект	Pa	Pi	Механизмы действия
0,541	0,013	антибактериальный	0,757	0,017	противоопухолевый
0,520	0,064	противоопухолевый	0,300	0,049	ингибитор синтеза
0,300	0,049	ингибитор синтеза ДНК	0,290	0,056	ингибитор реакции Майяра
Неосакситоксин					
Pa	Pi	Эффект	Pa	Pi	Механизмы действия
0,909	0,005	противоопухолевый	0,438	0,022	ингибитор синтеза ДНК
0,438	0,022	ингибитор синтеза ДНК	0,189	0,021	противоопухолевый антибиотик
0,399	0,028	антибактериальный	0,219	0,130	ингибитор транскрипции и трансляции
0,308	0,076	радиопротектор	0,113	0,052	агонист меланокортина MC4
Азругинозид 126А					
Pa	Pi	Эффект	Pa	Pi	Механизмы действия
0,633	0,012	антитромботик	0,379	0,014	антикоагулянт
0,379	0,014	антикоагулянт	0,362	0,071	интерлейкин-2 агонист

Таблица 2

Значения оценочной функции для исследуемых соединений, полученные методом молекулярного докинга

Соединения	Значения оценочной функции для мишеней, ккал/моль	
	Эпидермальный фактор роста (EGFR)	Фактор Стюарта-Прауэра
Неосакситоксин (neoSXT)	-10,5	*
Гониатоксин II (GTX2)	-7,6	*
Иматиниб	-10,2	*
Азругинозид 126А	*	-6,5
Ривароксабан	*	-8,5

Примечание: * – не рассматривали в качестве мишени для данного соединения.

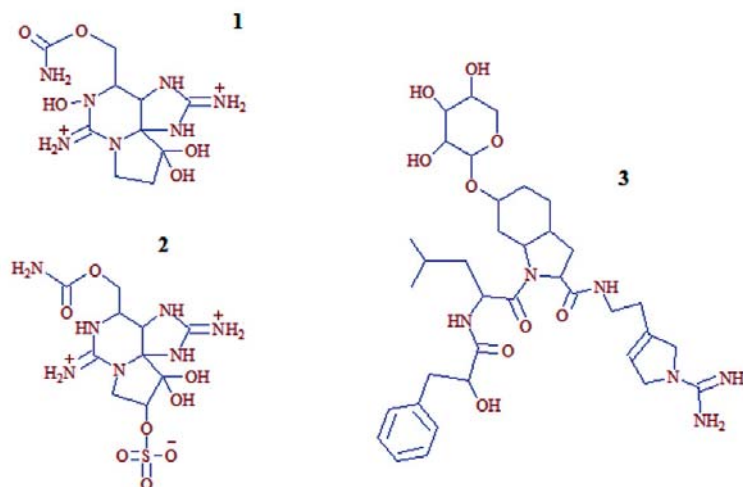


Рис. 1. Структурные формулы: 1 – неосакситоксин; 2 – гониатоксин II; 3 – аэругинозид 126A.

Объектами для дальнейшего исследования методом 3D-QSAR были выбраны три наиболее интересных и перспективных представителя цианометаболитов: неосакситоксин (neosaxitoxin), гониатоксин II (gonyautoxin GTX2) и аэругинозид 126A (aeruginoside 126A) (рис. 1).

При отборе наиболее перспективных веществ руководствовались следующими критериями:

1. Высокая вероятность проявления биологической активности (соединения 1 и 2).

2. Специфический механизм действия (соединение 3).

3. Критерий новизны – количество уникальных дескрипторов (соединения 1 и 2).

Необходимо также отметить, что если целью исследователя является выбор соединений с достаточно высоким уровнем новизны (new chemical entity, NCE), рекомендуется использовать вещества, для которых величина прогнозируемой вероятности P_a для требу-

емого вида активности ниже 0,5 (при сохранении условия $P_a > P_i$) [5].

Перечень прогнозируемых терапевтических эффектов и вызывающие их механизмы действия для трех выбранных соединений представлены в табл. 1.

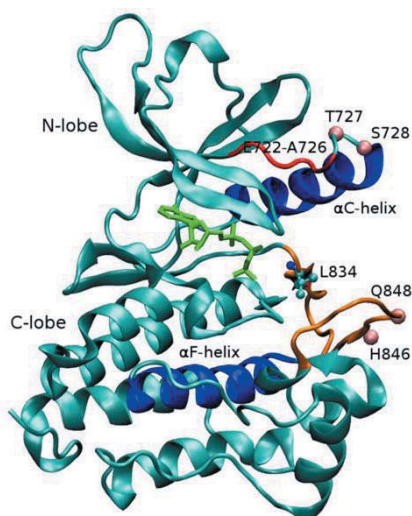
Таким образом, с помощью программного обеспечения PASS Refined 2014 для гониатоксина II и неосакситоксина прогнозируется наличие противоопухолевой активности с вероятностью более 75% и 90% соответственно (табл. 1). Для аэругинозида 126A прогнозируется наличие выраженной антикоагулянтной активности с соответствующими механизмами действия (табл. 1). Поскольку в PASS биологическая активность определяется лишь качественным образом (наличие/отсутствие), что, конечно, является достаточно грубым описанием действительной ситуации, нами был осуществлен последующий количественный анализ с помощью 3D-QSAR моделирования.

В качестве тест-системы для *in silico* 3D-QSAR моделирования противоопухолевой активности в работе [16] рекомендуется система Гливек/EGFR, а для моделирования антикоагуляционной активности – система Риворксабан/Ха-фактор.

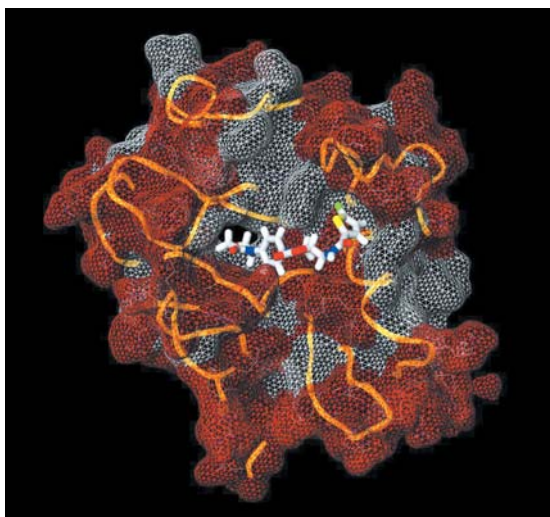
Рецептор EGFR, крупный трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 170 кДа, является продуктом одного из онкогенов семейства *erb* – *c-erbB1* и относится к числу рецепторных тирозинкиназ (РТК), важных регуляторов клеточной пролиферации и злокачественной трансформации. Их принципиальной особенностью является трансмембранная локализация и необходимость взаимодействия с соответствующим полипептидным лигандом для реализации киназной активности. Благодаря исследованиям последних лет, струк-

тура EGFR описана весьма детально, она состоит из трех основных доменов: внеклеточного N-концевого гликолизированного лиганд-связывающего участка, составляющего около 50% всей молекулы (621 из 1173-х аминокислотных остатков) и обеспечивающего специфичность восприятия сигнала; собственно трансмембранного α -спирального участка, состоящего всего из 23-х гидрофобных аминокислот; и внутриклеточного тирозинкиназного домена (542 аминокислоты), наиболее консервативного участка (рис. 2А).

Ха-фактор является ключевой точкой «усиления» в коагуляционном каскаде: одна молекула Ха-фактора вызывает образование около 1000 молекул тромбина, поэтому ингибирование Ха-фактора обеспечивает самый мощный контроль образования фи-



А



Б

Рис. 2. Структура эпидермального фактора роста (EGFR) (protein data bank (PDB) id: 2GS6) (А). *In silico* тест-система Риворксабан / Ха-фактор (Б).

брина. Ривароксабан угнетает синтез тромбина, не влияя на уже циркулирующий тромбин, который регулирует первичный гемостаз. Ривароксабан не влияет на агрегацию тромбоцитов, поэтому не оказывает прямого влияния на тромбоцитарно-сосудистый гемостаз. Таким образом, Ха-фактор – прекрасная мишень для воздействия антикоагулянта, благодаря чему возможно блокировать синтез тромбина. На рис. 2Б представлена *in silico* тест-система Ривароксабан / Ха-фактор.

На основании докинг-анализа показано, что неосакситоксин и гониатоксин II по энергии связывания с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) тирозинкиназы сопоставимы с референтным препаратом Иматиниб (Novartis, Гливек), широко используемым в настоящий момент для лечения больных с диссеминированными гастроинтестинальными стромальными опухолями и со всеми стадиями хронического миелолейкоза. Специфичный механизм действия для азругинозида 126A был подтвержден независимым методом докинг-анализа в тест-системе Ривароксабан / Ха-фактор (табл. 2).

В связи с открывающимися перспективами применения данных соединений в клинической практике, было интересно оценить возможности их получения. Изучаемые цианометаболиты могут быть получены двумя способами: тонким органическим синтезом и экстракцией биомассы из природных водоемов. Так, например, для сакситоксинов описаны три основных способа химического синтеза, каждый из которых включает в себя 15-19 стадий [6, 10, 14]. Теоретический стратегический маршрут

синтеза неосакситоксина, определенный нами с помощью программы REAXYS [15], может быть проведен в 12 стадий. В природе биологический синтез проходит по нерибосомальному пути, причем содержание метаболитов в клетках составляет около 80% от общего количества, синтезируемого клеткой, поэтому выделение цианометаболитов из биомассы цианобактерий с использованием аналитической препаративной хроматографии или твердофазной экстракции также является одним из способов их получения [3].

На настоящий момент, по нашему мнению, способ выделения целевых соединений с помощью экстракции является более рациональным по сравнению с многостадийным органическим синтезом. В данном исследовании были применены разработанные к настоящему времени аналитические процедуры для выделения различных видов цианометаболитов из клеток цианобактерий с помощью метода ультразвуковой экстракции водно-органическими растворителями [7, 9]. Для детектирования применяли метод жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии высокого разрешения, обеспечивающий разделение компонентов экстракта на хроматографической колонке, и чувствительное и селективное определение целевых соединений с использованием масс-спектрометрического анализатора. Данные проведенного нами масс-спектрометрического анализа азругинозида 126A из биомассы цианобактерий представлены на рис. 3. Идентификацию соединений проводили по точной массе (рис. 3А, Б).

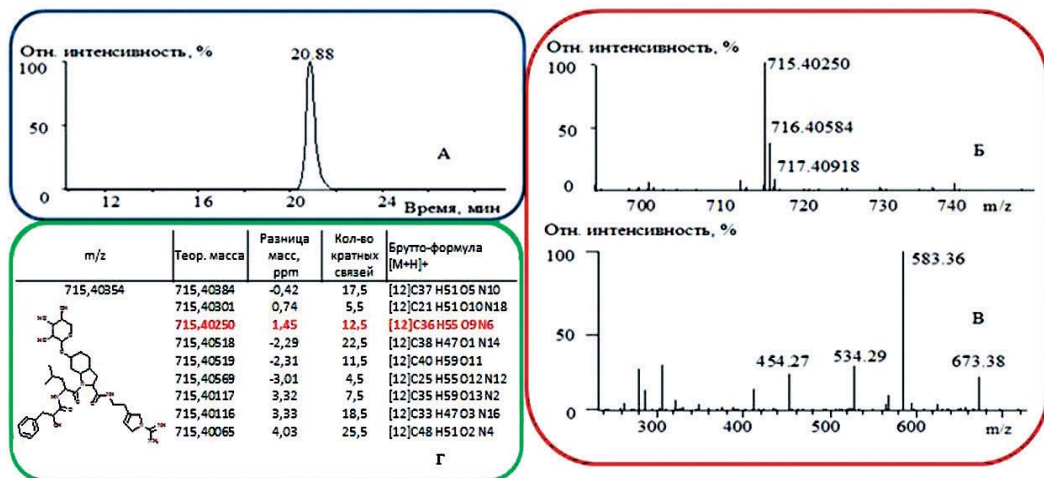


Рис. 3. Масс-хроматограмма по выделенному ионному току в диапазоне m/z 715,39892 – 715,40608 (А), полный (Б) и тандемный (В) масс-спектры аэругенозида 126А, полученные с использованием LTQ Orbitrap (на рис. подписаны сигналы, соответствующие характеристическим ионам, определяющим структуру соединения). Г – брутто-формулы соединений, рассчитанные с помощью программного обеспечения Xcalibur 2.07 на основании данных точной массы молекулярного иона, зарегистрированного методом масс-спектрометрии высокого разрешения.

Вероятную брутто-формулу детектируемого соединения рассчитывали с использованием программного обеспечения Xcalibur 2.07 (Thermo Scientific) (рис. 3Г). Подтверждение установленной структуры выполняли с помощью данных MS2-спектров по характеристическим фрагментам (рис. 3В), установленным с использованием программы Mass Frontier 5.0 Quick Start (Thermo Scientific).

Выводы

В настоящей работе показана принципиальная возможность применения методов компьютерного моделирования для поиска и идентификации уникальных соединений в ряду метаболитов цианобактерий, проявляющих биологическую активность и представляю-

щих интерес для медицинской химии и клинической практики. Продукты метаболизма цианобактерий – гониатоксин II, неосакситоксин и аэругинозид 126А продемонстрировали высокую эффективность и селективность действия в отношении ключевых мишеней, использующихся для разработки современных таргетных препаратов. Поскольку выбранные нами соединения могут находиться в значительном количестве в природных водоемах, а также учитывая уникальные возможности современных аналитических методов, перспективным направлением дальнейших исследований может стать выделение указанных лекарственных кандидатов из объектов окружающей среды и их изучение в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы

1. **Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Глориозова Т.А., Рудик А.В., Дружиловский Д.С., Погodin П.В., Пороиков В.В.** Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS online // Химия гетероциклических соединений. 2014. № 3. С. 483-499.
2. AUTODOCK [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.autodock.scripps.edu>, свободный. Загл. с экрана. - Язык англ.
3. **Dittmann E., Wiegand C.** Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs // Molecular nutrition & Food research. 2006. No. 50. P. 7-17.
4. **Dixit R.B., Suseela M.R.** Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery // Antonie van Leeuwenhoek. 2013. No. 103. P. 947-961.
5. **Filimonov D.A., Poroikov V.V.** Probabilistic approaches in activity prediction // Chemoinformatics approaches to virtual screening. Ed. by A. Varnek and A. Tropsha. - Cambridge (UK): RSC Publishing. 2008. P. 182-216.
6. **Fleming J.J., Du Bois J.** Total Synthesis of (+)-Saxitoxin // J. Am. Chem. Soc. 2006. No.128. P. 3926-3927.
7. **Furey A., Allis O., Ortea P.M., Lehane M., James K.J.** Hepatotoxins: context and chemical determination. In: Seafood and freshwater toxins // Pharmacology, physiology and detection. Ed. By Botana L.M. Second Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group. 2008. P. 844-886.
8. **Garrido R., Lagos N., Lattes K., Garcia C., Azolas R., Bocic G., Cuneo A., Chiong H., Jensen C., Henriquez A., Fernandez C.** The Gonyautoxin 2/3 epimers reduces anal tone when injected in the anal sphincter of healthy adults // Biological Research. 2004. No. 37. P. 395-403.
9. **Halme M., Rapinoja M.L., Karjalainen M., Vanninen P.** Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method // J. of chromatography b. analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2012. Vol. 880. No. 1. P. 50-57.
10. **Jacobi P.A., Martinelli M.J. Polanc S.** Total synthesis of (+)-saxitoxin. // J. Am. chem. soc. 1984. No. 106. P. 5594-5598.
11. **Kurashov E., Fedorova E., Krylova J., Mitrukova G.** Assessment of the potential biological activity of low molecular weight metabolites of freshwater macrophytes with QSAR // Scientifica. 2016 (in press).
12. **Liu L., Herfindal L., Jokela J., Shishido T.K., Wahlsten M., Døskeland S.O., Sivonen K.** Cyanobacteria from terrestrial and marine sources contain apoptogens able to overcome chemoresistance in acute myeloid leukemia cells // Marine drugs. 2014. No. 12. P. 2036-2053.
13. **Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J.** Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // J. of Computational chemistry. 1998. Vol. 19. No. 14. P. 1639-1662.
14. **Mulcahy J.V., Du Bois J.** A stereoselective synthesis of (+)-gonyautoxin 3 // J. Am. chem. soc. 2008. Vol. 130. P. 12630-12631.
15. REAXYS [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.reaxys.com>, свободный. - Загл. с экрана. - Язык англ.
16. **Randhawa P.S., Farasati N.A., Huang Y., Mapa M.Y., Shapiro R.** Viral drug sensitivity testing using quantitative PCR: effect of tyrosine kinase inhibitors on polyomavirus BK replication // Am. J. Clin. pathol. 2010. Vol. 134. No. 6. P. 916-20.
17. **Rodriguez-Navarro A.J., Berde Ch.B., Wiedmaier G., Mercado A., Garcia C., Iglesias V., Zurakowski D.** Comparison of neosaxitoxin versus bupivacaine via port infiltration for postoperative analgesia following laparoscopic cholecystectomy. A randomized, double-blind trial // Regional anesthesia and pain medicine. 2011. Vol. 36. No. 2. P. 103-109.
18. **Tan L.T.** Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery // Phytochemistry. 2007. Vol. 68. No. 7. P. 954-979.
19. **Trott O., Olson A.J.** AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // J. of Computational chemistry. 2010. No. 31. P. 455-461.
20. **Zhong H., Bowen J.Ph.** Computer software review // J. Am. Chem. soc. 2007. Vol. 129. No. 17. P. 5780.

Cyanobacterial metabolites: computer-aided prediction of biological activity spectra of neosaxitoxin, gonyautoxin II and aeruginoside 126A

**Ya.V. Russkikh, E.N. Chernova, E.I. Afonina, Z.A. Zhakovskaya,
E.V. Fedorova, V.A. Ostrovskiy**

We identified new and confirmed the previously known types of biological activity for some of the most common cyanobacterial metabolites (microcystins, anabaenopeptin, saxitoxin) by computer simulation. Within the design based on the target structure (structure-based drug design) was studied docking interaction (3D-QSAR) involving cyano-metabolites molecules. Based on the results of the study the most promising candidates were selected for further study – neosaxitoxin, gonyautoxin GTX2 and aeruginoside 126A, for which the observed properties of the manifestation of cytostatic, anti-tumor antibiotics and anticoagulants.

Key words: cyanometabolites, saxitoxins, aeruginoside 126A, computer-modelling methods, PASS, QSAR, biological activities.



Анализ морфометрических параметров в ядрах переднего отдела миндалевидного комплекса мозга с учетом гендерных особенностей

И.Р. Гарипова, З.Р. Хисматуллина

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа

Контактная информация: Гарипова Ирина Ринатовна, owl66680@mail.ru

Половой диморфизм мозга указывает на морфологические различия особей. Миндалевидный комплекс (МК) мозга является одной из зон полового диморфизма. Двусторонние связи МК с гипоталамусом обеспечивают его участие в процессах полового созревания и регуляции деятельности гонад, что позволяет рассматривать данную область в качестве звена репродуктивной системы организма с расположенными на ее территории нейроэндокринными центрами, способными регулировать секрецию гонадотропинов и половое поведение. На территории переднего отдела МК зоны полового диморфизма представлены передней амигдаллярной областью (ААА), передним кортикальным (СОа) и центральным (СЕ) ядрами, обладающими способностью регулировать секрецию гонадотропинов и половое поведение.

Ключевые слова: половой диморфизм, миндалевидный комплекс, нейроно-глиальный индекс, нейроэндокринный центр.

Введение

Согласно концепции о половой детерминации SRY-гена (sex-determining region of the Y chromosome), через прямое действие тестостерона на нервные клетки мозг плода развивается по мужскому типу, либо по женскому – при отсутствии данного гормона. Иными словами, гендерная принадлежность программируется в структурах головного мозга во время внутриутробного развития [1, 4]. Половой диморфизм в структуре человеческого мозга на основании данных магнитно-резонансной томографии (МРТ) указывает на морфо-

логические, когнитивные и поведенческие различия между мужчинами и женщинами [5, 6]. Кроме общих различий в объеме мозга, существует разница и в конкретных его областях. Участки мозга, в которых детально представлены различия по фактору пола, представлены, в частности, гипоталамусом, базальными ганглиями, гиппокампом и миндалевидным комплексом (амигдалой) [2, 3]. Двусторонние связи миндалевидного комплекса (МК) мозга с преоптической областью и гипоталамусом обеспечивают его участие в процессах полового созревания и регуляции деятельности

гонад [7], что позволяет рассматривать МК в качестве звена репродуктивной системы организма. На территории МК существует два нейроэндокринных центра, расположенных в его переднем и заднем отделах и способных регулировать секрецию гонадотропинов и половое поведение. В переднем отделе МК нейроэндокринный центр представлен передней амигдаларной областью (ААА), передним кортикальным (СОа) и центральным (СЕ) ядрами.

Целью данной работы являлся анализ корреляции фактора пола и морфометрических показателей передней амигдаларной области, переднего кортикального и центрального ядер МК на примере мозга крыс линии WAG/Rij.

Материалы и методы

Исследование выполнено на половозрелых самцах (n=25) и самках (n=28) крыс линии WAG/Rij массой 300-330 г. Все животные содержались в виварии кафедры физиологии человека и зоологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» при свободном доступе к пище и воде и с длительностью освещения 14 ч. Материал для исследования брали путем декапитации наркотизированных эфиром животных и окрашивали кре-

зиловым фиолетовым. Основными параметрами при изучении данных срезов являлись удельная площадь ядер, а также соотношение нейронов и клеток глии данных областей на роstralном и каудальном уровнях переднего отдела МК мозга крыс. Определение площади проводили в программе Universal Desktop Ruler («AVP Soft», США) в мм² с дальнейшим вычислением удельной площади структур. Подсчет нейронов и клеток глии в ядрах переднего отдела МК проводили с помощью световой микроскопии.

Статистическую обработку и анализ данных проводили в программном пакете Statistica 5.0 («Statsoft Inc.», США) на основании данных удельной площади и количества клеток в исследуемых областях МК. Значимость различий между самцами и самками определялась критерием Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

При сравнении полученных данных в исследуемых ядрах стало очевидно, что значения удельной площади в переднем кортикальном ядре у самцов крыс выше, чем у самок – и на роstralном (самцы – $9,95 \pm 0,34$; самки – $9,06 \pm 0,32$), и на каудальном (самцы – $15,28 \pm 0,43$; самки – $14,77 \pm 0,23$) уровнях (табл. 1).

Таблица 1
Удельная площадь ядер переднего отдела МК крыс WAG/Rij (%)

Область МК		Самцы	Самки	P
Роstralный уровень	СОа	$9,95 \pm 0,34$	$9,06 \pm 0,32$	$\leq 0,01$
	ААА	$7,42 \pm 0,60$	$8,12 \pm 0,32$	$\leq 0,05$
	СЕ	$4,11 \pm 0,32$	$4,22 \pm 0,12$	$\geq 0,05$
Каудальный уровень	СОа	$15,28 \pm 0,43$	$14,77 \pm 0,23$	$\leq 0,05$
	СЕ	$6,20 \pm 0,33$	$6,45 \pm 0,55$	$\geq 0,05$

Удельная площадь передней амигдаларной области у самцов ($7,42 \pm 0,60$) меньше, чем у самок крыс ($8,12 \pm 0,32$). В центральном ядре удельная площадь у самок крыс также больше по сравнению с самцами – как на роstralном (самцы – $4,11 \pm 0,32$; самки – $4,22 \pm 0,12$), так и на каудальном (самцы – $6,20 \pm 0,33$; самки – $6,45 \pm 0,55$) уровнях. Полученные данные, несомненно, говорят о влиянии фактора пола на морфометрические показатели ядер переднего отдела МК.

Анализируя влияние гендерной принадлежности на количество нейронов и клеток глии, учитывались и параметры их количественного соотношения. Количество нейронов в густоклеточной зоне переднего кортикального ядра у самцов крыс оказалось достоверно больше, чем у самок ($15,72 \pm 0,18$ и $13,62 \pm 0,15$ соответственно). Количественные показатели в передней амигдаларной области

отражают также достоверно большее количество нейронов (самцы – $11,22 \pm 0,22$; самки – $11,10 \pm 0,12$) и клеток глии (самцы – $20,82 \pm 0,25$; самки – $20,04 \pm 0,16$), в т.ч., и сателлитной (самцы – $3,28 \pm 0,34$; самки – $2,04 \pm 0,13$), у самцов крыс. В центральном ядре переднего отдела МК распределение клеток аналогичное и свидетельствует о большем количестве нейронов ($11,54 \pm 0,34$), клеток глии ($21,18 \pm 0,25$) и сателлитной глии ($2,66 \pm 0,37$) у самцов крыс по сравнению с самками (нейроны – $11,11 \pm 0,14$, клетки глии – $20,86 \pm 0,15$, сателлитная глиа – $2,30 \pm 0,17$, нейроно-глиальный индекс – $2,10 \pm 0,02$) (табл. 2).

Обсуждение результатов

Полученные результаты по удельным площадям изученных структур МК количественного соотношения нейронов и клеток глии свидетельст-

Таблица 2
Нейроно-глиальное соотношение ядер переднего отдела МК

Ядро	Клетки	Самцы	Самки	P
СОа (густоклеточная зона)	Нейроны	$15,72 \pm 0,18$	$13,62 \pm 0,15$	$\leq 0,01$
	Клетки глии	$20,34 \pm 0,21$	$20,86 \pm 0,18$	$\geq 0,05$
	Сателлитная глиа	$3,60 \pm 0,33$	$2,26 \pm 0,19$	$\leq 0,05$
	Нейроно-глиальный индекс	$1,55 \pm 0,04$	$1,71 \pm 0,02$	$\leq 0,05$
ААА	Нейроны	$11,22 \pm 0,22$	$11,10 \pm 0,12$	$\geq 0,05$
	Клетки глии	$20,82 \pm 0,25$	$20,04 \pm 0,16$	$\geq 0,05$
	Сателлитная глиа	$3,28 \pm 0,34$	$2,04 \pm 0,13$	$\leq 0,05$
	Нейроно-глиальный индекс	$2,19 \pm 0,06$	$2,00 \pm 0,01$	$\leq 0,01$
СЕ	Нейроны	$11,54 \pm 0,34$	$11,11 \pm 0,14$	$\geq 0,05$
	Клетки глии	$21,18 \pm 0,25$	$20,86 \pm 0,15$	$\geq 0,05$
	Сателлитная глиа	$2,66 \pm 0,37$	$2,30 \pm 0,17$	$\geq 0,05$
	Нейроно-глиальный индекс	$2,57 \pm 0,40$	$2,10 \pm 0,02$	$\geq 0,05$

вуют о влиянии фактора пола на структуру передней амигдаллярной области, переднего кортикального и центрального ядер самцов и самок крыс. Удельная площадь СОа на роstralном и каудальном уровнях самцов крыс достоверно больше по сравнению с самками, тогда как в ААА и СЕ удельная площадь больше у самок.

Расчет нейроно-глиального индекса в исследуемых ядрах переднего отдела МК мозга крыс линии WAG/Rij также выявил различия: количество нейронов и клеток глии в передней амигдаллярной области, переднем кортикальном и центральном ядрах больше у самцов крыс по сравнению с самками.

Выводы

Таким образом, нами выявлены различия по удельным площадям и нейроглиальным соотношениям в структурах МК мозга, относящихся к репродуктивным центрам амигдалы, с учетом фактора пола.

Список литературы

1. *Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б.* Миндалевидный комплекс: функциональная морфология и нейроэндокринология. - М.: Наука. 1993. 270 с.
2. *Häfner H.* Gender differences in schizophrenia // *Psychoneuroendocrinology*. 2003. No. 28(2). P. 17-54.
3. *Kessler R.C., Berglund P., Demler O., Jin R., Merikangas K.R., Walters E.E.* Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*. 2005. No. 62(6). P. 593-602.
4. *Savic I., Garcia-Falgueras A., Swaab D. F.* Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation // *Prog. brain. res.* 2010. No. 186. P. 41-62.
5. *Wallentin M.* Putative sex differences in verbal abilities and language cortex: a critical review // *Brain Lang.* 2009. No. 108. P. 175-183.
6. *Whittle S., Yucel M., Yap M.B., Allen N.B.* Sex differences in the neural correlates of emotion: Evidence from neuroimaging // *Biol. Psychol.* 2011. No. 87. P. 319-333.
7. *Yokosuka M., Okamura H., Hayashi.* Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor – alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon and the amygdala in the rat. // *J. Comp. Neurol.* 1997. Vol. 389. No. 3. P. 81-93.

Analysis of morphometric parameters in the nuclei of the anterior amygdala complex account with gender specific

I.R. Garipova, Z.R. Khismatullina

The brain sexual dimorphism indicates the morphological differences between individuals. Amygdala complex (МК) of the brain is one of the areas of sexual dimorphism. Bilateral relations of the МК with the hypothalamus ensure its participation in the processes of puberty and the regulation of the gonads, that allows considering this area as a link in the reproductive system of the organism is located on its territory neuroendocrine centers, which is able to regulate the secretion of gonadotropins and sexual behavior. On the territory of the anterior part of the МК zone of sexual dimorphism presented by the front amygdalar area (ААА), front cortical (СОА) and Central (СЕ) nuclei, having the ability to regulate the secretion of gonadotropins and sexual behavior.

Key words: sexual dimorphism, amygdale, neuronal-gliial index, neuroendocrine center.

Изучение эффективности природных лигандов протоноактивируемых рецепторов на биомодели соматической боли

И.А. Дьяченко^{1,2}, В.А. Паликов¹, Ю.А. Паликова¹, Г.И. Белоус¹,
Е.А. Калабина¹, Е.С. Садовникова¹, Е.А. Рассказова¹, И.Н. Кравченко¹,
Т.Ю. Жармухамедова¹, А.Н. Мурашев^{1,2}

¹ – Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуцинский государственный естественно-научный институт, г. Пуцино Московской области

² – ФГБУН Пуцинский научный центр РАН, г. Пуцино Московской области

Контактная информация: к.б.н. Дьяченко Игорь Александрович, dyachenko@bibch.ru

С помощью биомоделей для оценки соматической боли («гиперчувствительность, спровоцированная CFA» и «висцеральные боли») изучили природные лиганды протоноактивируемых рецепторов. Пептид UGTX, введенный внутримышечно, в исследовании фармакологической активности в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA», и «Висцеральные боли» показал максимальную обезболивающую активность в дозе 0,02 мг/кг. Влияние увеличения или уменьшения дозы пептида UGTX достоверно не отличалось от препарата сравнения. Новый компонент Севанол, выделенный из укуснокислого экстракта тимьяна, в дозе 1 мг/кг показал сопоставимую с диклофенаком обезболивающую активность, однако в дозе 10 мг/кг достоверно превосходил диклофенак по показателю «снижение общего количества корч». Изучаемые лиганды могут быть рассмотрены как потенциальные обезболивающие лекарственные препараты.

Ключевые слова: ASICs, природные лиганды, *in vivo* модели, анальгетическая активность.

Введение

Неприятные болевые ощущения и, в первую очередь, хронические болевые синдромы значительно снижают качество жизни людей. Они часто вызывают физические и эмоциональные страдания, сопровождающиеся депрессией, подавленным настроением и чувством безнадежности.

Современные стратегии поиска новых потенциальных анальгетиков вызывают с изменением чувствительности ноцицепторов (воздействие на семейство каналов переменного рецепторного потенциала (TRP) и др. каналы

ноцицепторов), нормализацией состояния ноцицепторов, нарушенного при воспалении (блокада активности медиаторов и модуляторов, изменяющих порог активности ноцицепторов), снижением патологической возбудимости нейронов, участвующих в проведении ноцицептивного сигнала (блокаторы тетродотоксин нечувствительных Na⁺-каналов, блокаторы Ca²⁺-каналов). Новые соединения с обезболивающей активностью могут быть найдены среди ингибиторов ЦОГ-3, блокаторов протончувствительных каналов ASIC3, каналов пуриновых рецепторов P2X2 и P2X3,

блокаторов рецепторов брадикинина, кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП), каннабиноидов [2].

Детальные механизмы возникновения патологических болей до конца не выяснены, но известен ряд клеточных рецепторов, отвечающих за восприятие болевых стимулов и генерацию болевых ощущений. По современным представлениям, одними из важнейших рецепторов болевого каскада являются кислото-чувствительные ионные каналы (ASICs) [4]. Ионные каналы ответственны за восприятие снижения рН в тканях (ацидоз), которое может происходить как в норме (при накоплении молочной кислоты, в связи с усилением анаэробного метаболизма глюкозы, и высвобождении протонов при гидролизе АТФ), так и при патологии (воспалительные процессы в тканях, ишемический инсульт, черепно-мозговая травма, опухоли, повреждение тканей и эпилептический припадок) [3].

Каналы ASICs относятся к надсемейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных (DEG/ENaC) Na^+ -каналов и представлены в организме в виде шести изоформ: ASIC1a, -1b, -2a, -2b, -3 и -4. Они в большом количестве встречаются в нейронах ЦНС, где было обнаружено, по крайней мере, три (ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b) из шести субъединиц. Из всех субъединиц, представленных в мозге, ASIC1a является основной. Показано, что ASIC1a и ASIC2 принимают непосредственное участие в процессах синаптической пластичности, обучении, передаче нервного возбуждения, ишемических процессах, эпилепсии, кислотоопосредованного нейронального повреждения [12].

В нейронах периферической нервной системы в основном представлены гомо-

мерные ASIC3 и гетеромерные ASIC3-содержащие каналы. Способность этих каналов воспринимать сигналы в виде небольшого снижения рН внеклеточной среды (до значений 7,0-6,7), интегрировать различные воспалительные и ишемические стимулы (такие, как АТФ, молочная и арахидоновая кислоты, повышение осмотического давления) позволяет рассматривать ASIC3 в качестве основных участников процесса развития боли. Характерной особенностью при активации ASIC3 является их способность проводить токи двух видов: быстрые, инактивирующиеся в течение нескольких мс, и медленные, продолжительностью в несколько десятков сек. Для периферических ASIC3-каналов было показано, что они:

а) участвуют в восприятии кислотоопосредованной, воспалительной и постоперационной боли;

б) вносят вклад в развитие первичной и/или вторичной механогиперчувствительности в мышцах;

в) участвуют в кожной и висцеральной механочувствительности и восприятии боли от механических стимулов;

г) участвуют в восприятии болевых сигналов от легких и ЖКТ [11].

Поиск природных веществ, проявляющих активность по отношению к каналу ASIC3, проводился среди животных (морские анемоны) и растительных организмов. Для этого либо получали образцы ядов морских анемонов, либо подготавливали экстракты из растительного материала. Полученные таким образом образцы тестировали на наличие искомой биологической активности.

Мы идентифицировали новый компонент, выделенный из кислотного (уксуснокислого) экстракта тимьяна (*Thymus*

armeniacus), который называли «Севанол» (или 9,10-диизоцитриловый эфир эпифилловой кислоты). Севанол является первым природным низкомолекулярным соединением, ингибирующим обе компоненты тока канала ASIC3, и проявляет ингибирующее действие рН-индуцированных токов ASIC3-рецепторов. Пиковая компонента тока ингибируется полностью ($IC_{50}=353$ мкМ), в то время как продолжительная компонента – только на 45% (IC_{50} около 234 ± 53 мкМ). При этом он также ингибирует проводимость экспрессированных в ооцитах лягушки ASIC1a, хотя и менее эффективно [6]. Севанол – первое природное соединение, которое оказывает эффект ингибирования как на переходных, так и на выдержанных составляющих тока ASIC3.

Принципиально отличный по структуре полипептид Ugr 9-1 (UGTX) получен из яда морской анемоны *Urticina grebelnyi*. Его молекулярная масса – 3135 Да, и он является самым коротким полипептидом, способным модулировать активность ASIC. Пространственная структура UGTX представляет собой β -шпильку и пять β -поворотов, стабилизированные двумя дисульфидными связями, в то время как длинный N-концевой и короткий C-концевой участки выдаются из плотной центральной области β -структуры. Пептид UGTX обладает ингибирующим действием на пиковую и продолжительную компоненты тока ASIC3, не оказывая эффекта на остальные изоформы кислоточувствительных каналов [8]. Это отличает биологические свойства UGTX от др. токсинов морских анемонов – APETx2 и Hcr 1b-1, которые ингибируют только пиковую компоненту тока [7]. Пиковая компонента ингибировалась при добавлении токсина

полностью ($IC_{50}=10$ мкМ), а продолжительная компонента – только на 48% ($IC_{50}=1,44$ мкМ) [10].

В экспериментах на животных с использованием неспецифических блокаторов, таких, как амилорид, НПВС и A-317567 [7], в т.ч. на мышах, нокаутных по гену ACCN3 [5], кодирующему ASIC3, была продемонстрирована ключевая роль ASICs и, особенно, ASIC3-канала, в генерации высокоинтенсивных болевых стимулов – таких, как кислотоиндуцированная кожная боль и развитие гиперчувствительности к механическим стимулам при воспалительном процессе в мышцах.

Цель исследования – изучение обезболивающей активности новых лигандов, специфически взаимодействующих с ASIC-рецептором.

Материалы и методы

Для изучения обезболивающей активности двух новых лигандов ASIC3 (Севанола и пептида UGTX) были выбраны тесты тепловой гиперчувствительности, спровоцированной введением полного адьюванта Фрейнда (CFA), и кислотной стимуляции боли («висцеральные боли»), в которых немаловажный вклад в восприятие боли вносят ASIC3-каналы [1, 9].

Исследование проводилось на мышах CD-1 в возрасте 8-10 недель. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и имели статус SPF, подтвержденный сертификатом производителя. Все процедуры по рутинному уходу за животными вы-

полнялись в соответствии с СОП лаборатории.

Животные содержались в комнате барьерного типа при температуре воздуха 20-24°C и относительной влажности 28-63%. Температура и влажность постоянно контролировались в экспериментальной комнате с помощью системы мониторинга EVL. В комнате содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час.

Результаты и их обсуждение

Введение Севанола в дозе 1 мг/кг в тесте «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA» увеличивало время нахождения на термостатируемой поверхности примерно на 41% относительно контрольной группы,

получавшей физ. р-р. В дозе 10 мг/кг обезболивающий эффект увеличился относительно контрольной группы до ~67%. Достоверных отличий между дозами не наблюдали. Пептид UGTX в диапазоне доз от 0,01 мг/кг (15%) до 0,5 мг/кг (76%) показал выраженный доза-эффект исследуемого пептида относительно контрольной группы. Достоверных отличий между дозами 0,1 мг/кг (60%) и 0,5 мг/кг (76%) не наблюдали (рис. 1).

Дальнейшие исследования обезболивающей активности проводили с помощью теста «Висцеральные боли» (спровоцированные внутрибрюшинным введением уксусной кислоты 0,6%). Наблюдение за животными проводили в течение 15 мин после введения раздражителя. Введение Севанола в дозе 0,01 г/кг достоверно снижало общее

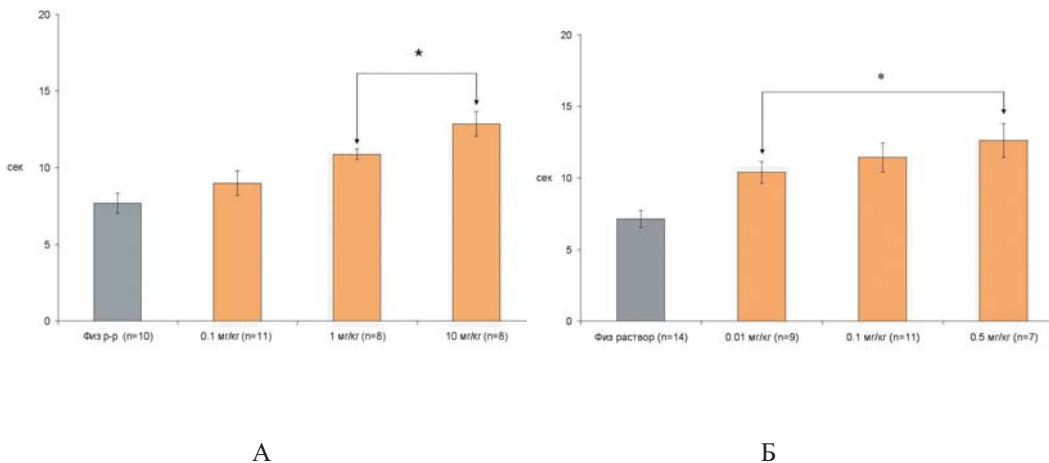


Рис. 1. Время нахождения на термостатируемой поверхности (сек) в биомодели термической гиперчувствительности, спровоцированной CFA. Внутривенное введение полипептида Севанол (А) и пептида UGTX (Б) мышам CD-1 с последующим тестированием через 30 мин.

Данные представлены как средняя арифметическая \pm ошибка средней арифметической.

Примечание: n – количество животных в группе, * – $p < 0,05$ (статистический анализ проводился с использованием теста ANOVA-1 (Duncan test) относительно контрольной группы (физ. р-р)).

количество корчей на 44% после введения раздражителя, пептид UGTX в дозе 0,01 мг/кг снижал общее количество корчей лишь на 24%, в обоих случаях полученные результаты достоверно отличались от контрольной группы, получавшей физ. р-р. Дальнейшее увеличение дозы пептида UGTX лишь незначительно повышало обезболивающую активность: 0,1 мг/кг – 35%, 0,5 мг/кг – 45% относительно контрольной группы. В группе, получавшей Севанол в дозе 0,1 мг/кг (66%), наблюдали достоверно большую активность относительно дозы 0,01 мг/кг. Дальнейшее увеличение дозы до 1 мг/кг (67%) достоверно отличалось от предыдущей дозы 0,1 мг/кг, однако не отличалось от дозы 10 мг/кг (75%), результаты исследования представлены на рис. 2.

Таким образом, по результатам проведенного исследования Севанола и пептида UGTX после внутривенного введения в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA» и «Висцеральные боли» показано, что для Севанола максимальная обезболивающая активность наблюдается в дозе 1 мг/кг,

для пептида UGTX – 0,1 мг/кг. Обезболивающая активность Севанола и пептида UGTX в указанных тестах после внутримышечного введения оказалась более высокой. Поскольку в исследовании использовался внутримышечный способ введения, дополнительно была создана группа, которой вводили препарат сравнения (диклофенак) в дозе 1 мг/кг внутримышечно. В тесте гиперчувствительности, спровоцированной CFA, диклофенак на 81% увеличивал время нахождения на термостабируемой поверхности относительно контрольной группы. Было показано, что для самого распространенного НПВС данный тест является специфичным и показывает максимальную обезболивающую активность. В исследовании висцеральной боли диклофенак показал обезболивающую активность и достоверно снижал общее количество корчей на 57% относительно контроля.

Внутримышечное введение Севанола в дозе 0,1 мг/кг увеличивало обезболивающую активность на 38% относительно контрольной группы и на 24% – относительно диклофенака. В дан-

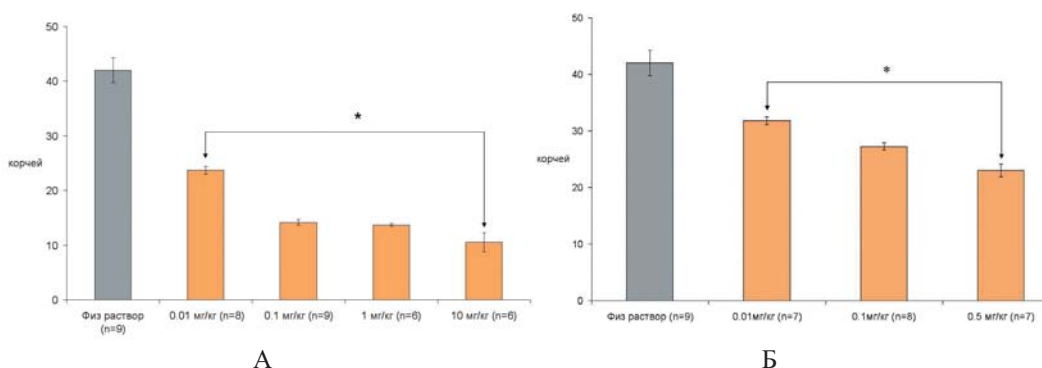


Рис. 2. Общее количество судорог мышеч CD-1 в тесте висцеральной боли. Все обозначения – как на рис. 1.

ной дозе Севанол не отличался как от контрольной группы, так и от препарата сравнения. Дальнейшее увеличение дозы до 1 мг/кг достоверно увеличило время нахождения на термостатируемой поверхности на 84% относительно контрольной группы, однако эти результаты были сопоставимы с группой, получавшей диклофенак. Дальнейшее увеличение дозы до 10 мг/кг на 94% увеличило обезболивающую активность относительно контрольной группы, но достоверно не отличалось от дозы 1 мг/кг и эффекта диклофенака. Полученные результаты показали, что Севанол обладает максимальной обезболивающей активностью в тесте гиперчувствительности, спровоцированной СФА, в диапазоне доз 1-10 мг/кг.

Аналогичные результаты были показаны в тесте «Висцеральные боли» после введения раздражителя: эффект Севанола (0,001 мг/кг) достоверно отличался от контрольной группы, общее количество корчей снижалось на 19%. Увеличение дозы до 0,1 мг/кг снижало общее количество корчей на 42% относительно контрольной группы, а относительно диклофенака – было больше на 33%. В дозе 1 мг/кг была обнаружена сопоставимая с диклофенаком обезболивающая активность, проявляющаяся в снижении общего количества корчей. Увеличение дозы до 10 мг/кг показало, что общее количество корчей достоверно снижается относительно диклофенака на 45% и на 76% – относительно контрольной группы.

Таким образом, по результатам проведенного исследования было показано, что Севанол в дозе 1 мг/кг обладает сопоставимой с диклофенаком обезболивающей активностью, однако в дозе

10 мг/кг достоверно превосходит диклофенак по показателю снижения общего количества корчей.

Эффект внутримышечного введения пептида UGTX в дозах 0,002 и 1 мг/кг в тесте «Гиперчувствительность, спровоцированная СФА» достоверно не отличался от контроля. Экспериментальные животные также проводили на термостатируемой поверхности достоверно меньше времени относительно диклофенака. В дозе 0,02 мг/кг обнаружено достоверное повышение этого показателя на 159% относительно контрольной группы и на 43% – относительно диклофенака. Доза 0,02 мг/кг является «включающей» обезболивающую активность UGTX, однако последующее увеличение дозы не влияет на данный показатель. В расчете результатов наблюдается высокая вариабельность: некоторые экспериментальные животные не достаточно хорошо отвечали на обезболивающую активность, что указывает на избирательный эффект.

Исследование фармакологической активности пептида UGTX в тесте висцеральной боли оценивали через 2 ч после внутримышечного введения. Максимальная фармакологическая активность, достоверно отличающаяся от контрольной группы (74%) и эффектов диклофенака (40%), наблюдалась в дозе 0,02 мг/кг. Дальнейшее увеличение дозы до 0,2 мг/кг недостоверно уменьшало общее количество корчей на 16% относительно диклофенака, однако достоверно отличалось от контрольной группы (на 64%). Увеличение дозы до 1 мг/кг достоверно не отличалось от диклофенака, результаты были сопоставимы с дозой 0,2 мг/кг.

Пептид UGTX в исследовании фармакологической активности после внутримышечного введения в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA» и «Висцеральные боли» показал максимальную обезболивающую активность в дозе 0,02 мг/кг. Однако при увеличении или уменьшении дозы пептида UGTX его эффекты достоверно не отличались от таковых препарата сравнения.

Заключение

По результатам проведенного исследования обезболивающей активности полипептида Севанол и пептида UGTX показаны их обезболивающие эффекты в тестах «Гиперчувствительность, спровоцированная CFA» и «Висцеральные боли». Полученные лиганды могут быть рассмотрены как потенциальные обезболивающие лекарственные препараты.

Список литературы

1. **Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н.** *In vivo* модели для изучения анальгетической активности // Биомедицина. 2011. № 2. С. 84-94.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. - М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
3. **Яшин В.И., Веденин А.Н., Яшин А.Я.** Антиоксиданты и спорт. Основные причины неудачных применений, возможные перспективы // Спортивная медицина: наука и практика. 2016. № 1. С. 35-39.
4. **Deval E., Noël J., Gasull X., Delaunay A., Alloui A., Friend V., Eschaliér A., Lazdunski M., Lingueglia E.** Acid-sensing ion channels in postoperative pain // *J. Neurosci.* 2011. No. 31. P. 6059-6066.
5. **Dubé G.R., Lehto S.G., Breese N.M., Baker S.J., Wang X., Matulenko M.A., Honoré P., Stewart A.O., Moreland R.B., Brioni J.D.**

- Electrophysiological and *in vivo* characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels // *Pain.* 2005. No. 117(1-2). P. 88-96.
6. **Dubinyi M.A., Osmakov D.I., Koshelev S.G., Kozlov S.A., Andreev Y.A., Zakaryan N.A., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Arseniev A.S., Grishin E.V.** Lignan from thyme possesses inhibitory effect on ASIC3 channel current // *J. Biol. Chem.* 2012. No. 287. P. 32993-33000.
 7. **Gautam M.I., Benson C.J., Ranier J.D., Light A.R., Sluka K.A.** ASICs do not play a role in maintaining hyperalgesia induced by repeated intramuscular acid injections // *Pain Res. Treat.* 2012:817347. doi: 10.1155/2012/817347.
 8. **Karczewski J., Spencer R.H., Garsky V.M., Liang A., Leitl M.D., Cato M.J., Cook S.P., Kane S., Urban M.O.** Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2 // *Br. J. Pharmacol.* 2010. No. 161. P. 950-960.
 9. **Mogil J.S., Breese N.M., Witty M.F., Ritchie J., Rainville M.L., Ase A., Abbadi N., Stucky C.L., Séguéla P.** Transgenic expression of a dominant-negative ASIC3 subunit leads to increased sensitivity to mechanical and inflammatory stimuli // *J. Neurosci.* 2005. No. 26;25(43). P. 9893-901.
 10. **Osmakov D.I., Kozlov S.A., Andreev Y.A., Koshelev S.G., Sanamyan N.P., Sanamyan K.E., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Murashev A.N., Mineev K.S., et al.** Sea anemone peptide with uncommon β -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity // *J. Biol. Chem.* 2013. No. 288. P. 23116-23127.
 11. **Sluka K.A., Winter O.C., Wemmie J.A.** Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases // *Curr. opin. drug discov. devel.* 2009. No. 12. P. 693-704.
 12. **Wemmie J.A., Askwith C.C., Lamani E., Caspell M.D., Freeman J.H., Welsh M.J.** Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning // *J. Neurosci.* 2003. No. 23. P. 5496-5502.

Study the efficiency of a natural ligand of a protono-activated receptors on biomodels of somatic pain

I.A. Dyachenko, V.A. Palikov, Yu.A. Palikova, G.I. Belous, E.A. Kalabina,
E.S. Sadovnikova, E.A. Rasskazova, I.N. Kravchenko,
T.Yu. Zharmukhamedova, A.N. Murashev

Natural ligands protono-activated receptors were studied by biomodel (hypersensitivity provoked by CFA and visceral pain) assessment of somatic pain. Peptide UGTX study pharmacological activity after intramuscular hypersensitivity tests provoked CFA, and visceral pain, showed the maximum analgesic activity at a dose of 0.02 mg / kg. Increasing or decreasing the dose of UGTX peptide was not significantly different from the reference drug. Sevanol 1 mg / kg showed comparable diclofenac analgesic activity, but at a dose of 10 mg / kg of diclofenac significantly superior in terms of reduction of the total number of cramps. The studied ligands may be considered as potential analgesic drugs.

Key words: ASICs, natural ligands, *in vivo* models, analgesic activity.

Влияние Р-гликопротеина на транспорт противосудорожных средств в головной мозг

А.М. Зыбина¹, К.Н. Куличенкова¹, В.Ю. Балабаньян², С.Э. Гельперина²,
К.Р. Аббасова¹

¹ – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

² – ООО «Технология лекарств», г. Химки Московской обл.

Контактная информация: Балабаньян Вадим Юрьевич, bal.pharm@mail.ru

Резистентность к антиэпилептическим препаратам (АЭП) является серьезной клинической проблемой. Среди факторов, обуславливающих устойчивость к АЭП, определенную роль играет гиперэкспрессия Р-гликопротеина (Р-gp) – одного из основных транспортеров, ограничивающих поступление ксенобиотиков в мозг. В настоящее время нет единого мнения о взаимодействии карбамазепина (КБЗ) с Р-gp. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния верапамила – ингибитора Р-gp на противосудорожный эффект КБЗ на модели эпилепсии у крыс, вызванной изониазидом. Показано, что применение верапамила позволяет значительно усилить противосудорожное действие КБЗ и обеспечивает снижение его эффективной дозы не менее, чем на 30% (с 30 мг/кг до 20 мг/кг). Полученные данные свидетельствуют о том, что Р-gp существенно ограничивает поступление КБЗ в мозг.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, изониазид, карбамазепин, Р-гликопротеин, эпилепсия.

Введение

Возникновение фармакорезистентных форм эпилепсии в определенной мере связано с повышенной экспрессией специфических трансмембранных белков – АВС-транспортеров (от англ. «ATP-binding cassette» – АТФ-связывающая кассета), в частности, Р-гликопротеина (Р-gp) в различных структурах мозга [15]. Гиперэкспрессия Р-gp обнаружена как в эндотелиальных клетках капилляров мозга пациентов с резистентной формой эпилепсией [4], так и на моделях эпилепсии у животных, индуцированных введением каината или электрическим киндлингом [22].

В настоящее время остается неясным, является ли гиперэкспрессия Р-gp причиной или следствием устойчивой

формы эпилепсии [11, 7]. Тем не менее, поскольку многие АЭП являются субстратами Р-gp, гиперэкспрессия этого транспортера на поверхности церебрального эндотелия ограничивает транспорт АЭП в мозг и, таким образом, приводит к снижению их терапевтического эффекта. Данные о влиянии гиперэкспрессии Р-gp на эффективность транспорта АЭП (в т.ч. фенитоина, ламотриджина, топирамата и др.) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) были получены в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [12].

Резистентность наблюдается также и к карбамазепину (КБЗ) – одному из основных АЭП, эффективных в отношении генерализованных тонико-клонических и парциальных судорог. Причиной резистентности считают

генетический полиморфизм генов, кодирующих белки, модулирующие активность ферментов, участвующих в метаболизме КБЗ (СYP3A4, СYP3A5, СYP2C9, СYP2C19 и EPHX1), снижение эффективности связывания или плотности соответствующих рецепторов (SCN1A, SCN2A), а также повышенную экспрессию P-gr [2, 16].

Ингибирование P-gr верапамилом приводит к повышению эффективности КБЗ при лечении резистентной эпилепсии у людей [21], что свидетельствует об ограниченном проникновении препарата в мозг в условиях гиперэкспрессии P-gr. На модели резистентной эпилепсии крыс, вызванной электрическим киндлингом миндалевидного тела, показано, что ингибирование P-gr путем предварительного введения верапамила приводит к повышению концентраций КБЗ в интерстициальной жидкости кортекса [13]. В то же время, влияние P-gr на транспорт КБЗ через ГЭБ в условиях нормальной экспрессии транспортера изучено недостаточно.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния верапамила на противосудорожный эффект карбамазепина на изониазидовой модели эпилепсии у крыс.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах-самцах популяции линий Wistar (n=81) массой 300-350 г, полученных из вивария экспериментальных животных ИМБП РАН, с соблюдением требований, предъявляемых к работе с экспериментальными животными в РФ, а также в соответствии с Европей-

ской конвенцией по охране позвоночных животных.

Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и комбикорму.

Судороги у крыс инициировали внутрибрюшинным введением изониазида (ИЗН) в дозе 300 мг/кг [14]. После введения ИЗН за поведением животных наблюдали в течение 120 мин, оценивая их состояние по шкале Рэйсина, где 0 – нормальное поведение животного, 1 – тремор лицевых и жевательных мышц, 2 – кивания головой, 3 – клонус передних конечностей, 4 – подъем на задние лапы (поза «кенгуру»), 5 – подъем на задние лапы с падением, тяжелые тонико-клонические судороги с потерей позы [17]. Также учитывали латентный период наступления и продолжительность судорог. КБЗ вводили в хвостовую вену за 45 мин до введения изониазида в дозе 30 мг/кг (минимальная противосудорожная доза, купирующая судороги, установленная в пилотных экспериментах). Поскольку КБЗ практически нерастворим в воде, в качестве растворителя использовали р-р полиэтиленгликоля-400 10% (ПЭГ-400). В качестве ингибитора P-gr использовали верапамил (40 мг/кг внутрибрюшинно), введенный за 1 ч до КБЗ [1]. Отдельной группе животных вводили верапамил и хемоконвульсант без АЭП с целью исключения собственной противосудорожной активности верапамила. На фоне верапамила КБЗ вводили внутривенно в субтерапевтической дозе 20 мг/кг. Животным контрольной группы вводили физ. р-р за 1 ч до КБЗ. Дизайн эксперимента представлен в табл. 1.

Таблица 1
 Дизайн эксперимента по исследованию противосудорожного действия карбамазепина

Группы	Количество животных	Препарат			
		Изониазид (ИЗН), 300 мг/кг в/б	Карбамазепин, в/в за 45 мин до ИЗН	Верапамил, в/б за 60 мин до КБЗ	Плацебо
1 (контроль)	16	+	-	-	0,9% NaCl
2 (контроль)	8	+	-	-	ПЭГ-400
3	7	+	-	40 мг/кг	ПЭГ-400
4	12	+	20 мг/кг	-	-
5	12	+	20 мг/кг	40 мг/кг	-
6	10	+	30 мг/кг	-	-

Для оценки проницаемости ГЭБ после эпилептического приступа, индуцированного введением ИЗН, животным вводили внутривенно краситель Evans Blue в дозе 40 мг/кг [10]. Через 2 ч после введения красителя крысам внутрибрюшинно вводили хлоралгидрат (ХГ, 400 мг/кг) и проводили транскардиальную перфузию физ. р-ром, а затем – формалином 4%, который вводили в кровотоки в объеме 40-60 мл. После этого извлекали головной мозг, выдерживали в формалине 3 дня, потом его помещали

на 3-4 дня в р-р сахарозы 30% для криопротекции.

Проникновение красителя в мозг оценивали визуально (при проникновении Evans Blue ткань головного мозга должна была окраситься синим) и методом флуоресцентной микроскопии «postmortem» на криосрезях толщиной 20 мкм. Исследование было проведено на конфокальной лазерной сканирующей установке «Nikon» (Япония). Дизайн эксперимента представлен в табл. 2.

Таблица 2
 Дизайн эксперимента по исследованию проницаемости ГЭБ

Группы	Количество животных	Препарат	
		Evans Blue (ЕВ), 40 мг/кг в/в	Изониазид (ИЗН), через 45 мин после ЕВ 300 мг/кг
1 (контроль)	2	-	-
2	2	+	-
3	2	+	+

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel и пакета статистических программ Statistica 8.0, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На фоне введения ИЗН у всех экспериментальных животных наблюдалось возникновение эпилептического приступа, при этом первый приступ начинался, как правило, через 40-50 мин после введения. ПЭГ-400 и верапамил не оказывали противосудорожного действия (рис. 1-3). Введение КБЗ в дозе 30 мг/кг приводило к развитию выраженного противосудорожного действия, которое проявлялось достоверным снижением тяжести (рис. 1) и продолжительности

(рис. 2) судорог, а также увеличением латентного периода их наступления (рис. 3). При снижении дозы КБЗ до 20 мг/кг противосудорожный эффект не наблюдался; тяжесть и латентный период наступления судорог не отличались от данных контрольной группы животных, однако продолжительность судорог оказалась достоверно ниже, чем в контроле, и достоверно выше по сравнению с эффективными дозами КБЗ. В то же время, на фоне введения верапамила КБЗ в дозе 20 мг/кг вызвал выраженный противосудорожный эффект. При этом все оцениваемые параметры (тяжесть, продолжительность и латентный период) в этой группе достоверно отличались от параметров контрольной группы животных (рис. 2, 3): максимальная тяжесть судорог снижалась, а латентный период был достоверно повышен.

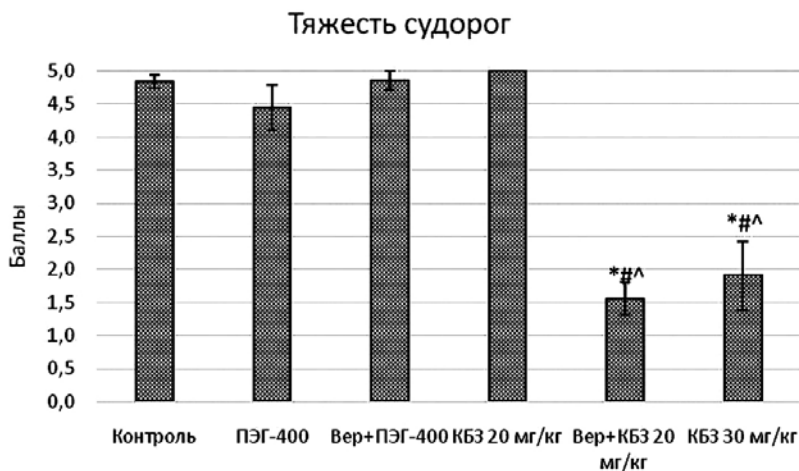


Рис. 1. Средняя тяжесть судорог по шкале Рэйсина в исследуемых группах (ПЭГ-400 – полиэтиленгликоль-400, КБЗ – карбамазепин, Вер – верапамил).

Примечание (здесь и далее): * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем ($n=16$),

– $p < 0,05$ по сравнению с группой КБЗ 20 мг/кг ($n=12$),

^ – $p < 0,05$ по сравнению с Вер+ПЭГ-400 ($n=7$).

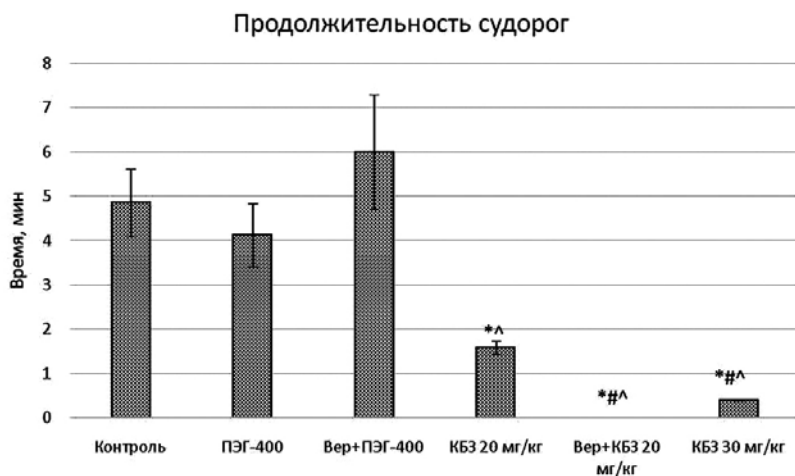


Рис. 2. Средняя продолжительность тяжелых судорог (4-5 баллов по шкале Рэйсина) в исследуемых группах животных.

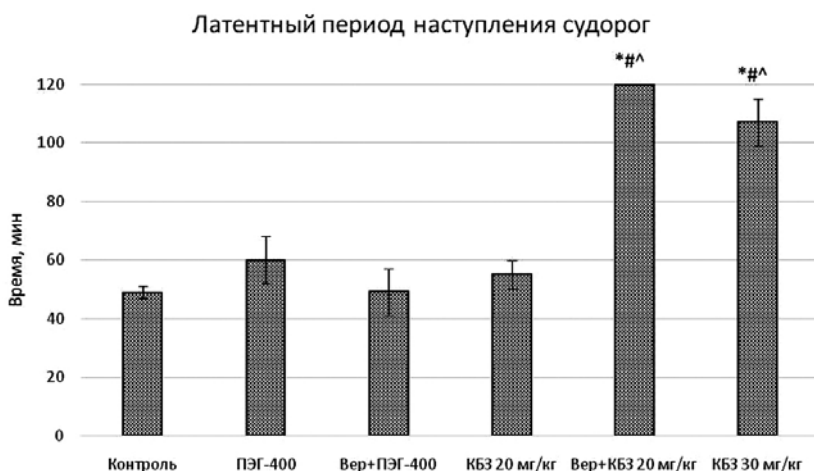


Рис. 3. Средний латентный период наступления клонико-тонических судорог в исследуемых группах животных.

С целью качественной оценки проницаемости ГЭБ на фоне судорог, вызванных ИЗН, животным вводили внутривенно флуоресцентный краситель Evans Blue, не проникающий через нормальный (неповрежденный) ГЭБ [18] и являющийся маркером его структурно-функциональной целостности. Визуальная оценка срезов го-

ловного мозга показала отсутствие проникновения ЕВ в головной мозг (рис. 4А-В). Флуоресцентная микроскопия срезов мозга также не выявила флуоресценции ни в одной из исследуемых групп (рис. 4Г-Е). Полученные результаты свидетельствуют о сохранении целостности ГЭБ в течение всего эксперимента.

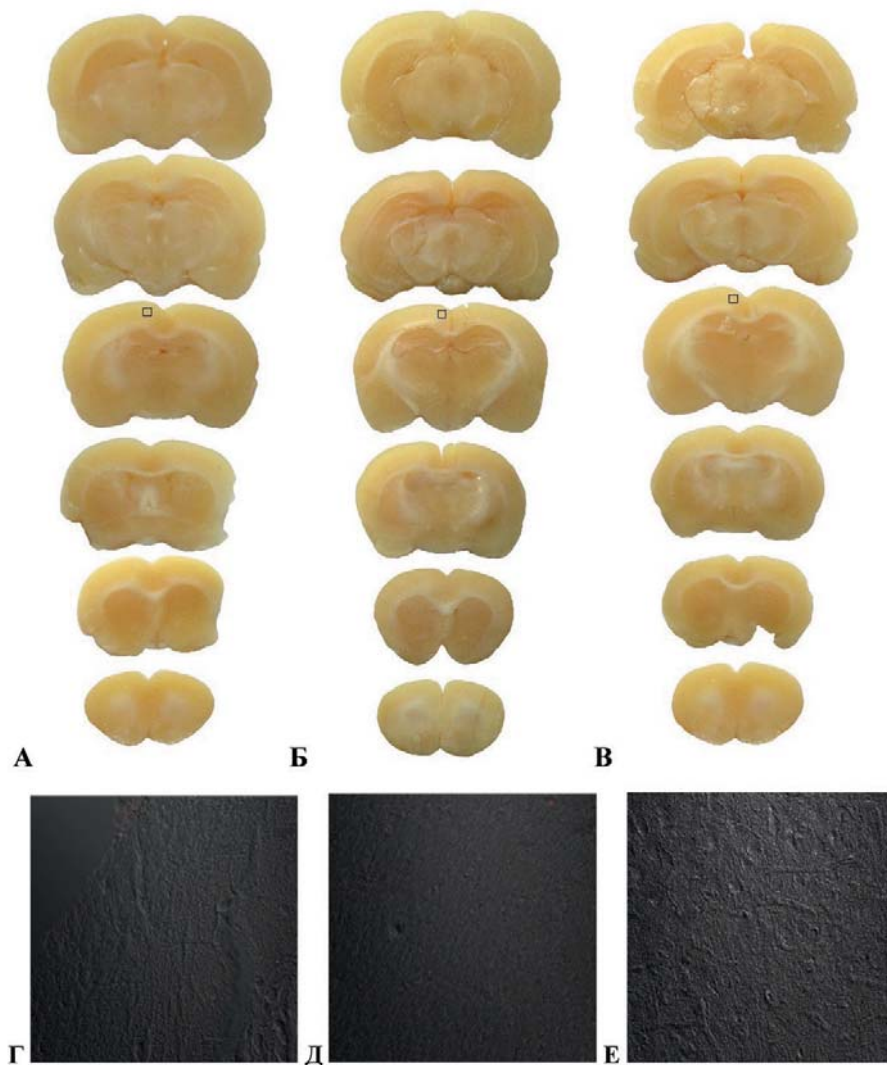


Рис. 4. Репрезентативные гистологические срезы головного мозга крыс через 2 ч после внутривенного введения Evans Blue. А, Г – отрицательный контроль (без красителя); Б, Д – внутривенное введение; В, Е – внутривенное введение с последующим введением ИЗН. Черным квадратом на срезах А-В обозначена область фотографий Г-Е.

В настоящее время существуют различные экспериментальные модели эпилепсии. При этом некоторые противосудорожные препараты проявляют активность только на определенных моделях эпилепсии [20]. Так, например, КБЗ эффективен на моделях эпилепсии у крыс, индуцированных методом электрического киндлинга, а также введением некоторых хемоконвульсантов: пилокарпина, каината и ИЗН [11]. Известно, что модель электрического киндлинга приводит к повышению проницаемости ГЭБ [22], а введение

эпилепсии у крыс, индуцированных методом электрического киндлинга, а также введением некоторых хемоконвульсантов: пилокарпина, каината и ИЗН [11]. Известно, что модель электрического киндлинга приводит к повышению проницаемости ГЭБ [22], а введение

каината и пилокарпина – к гиперэкспрессии Р-гр [8]. Выбор изониазидовой модели эпилепсии определялся, с одной стороны, ее чувствительностью к КБЗ, а с другой стороны – отсутствием значительных структурно-функциональных изменений ГЭБ [9]. При введении высокой дозы ИЗН происходит замедление синтеза ГАМК, вследствие чего снижается активность тормозной системы головного мозга и возникают судороги [5]. Выбранная модель эпилепсии технически проста, отличается хорошей воспроизводимостью и поэтому применяется для экспресс-скрининга новых АЭП [19]. Известно, что ИЗН – мощный ингибитор цитохрома Р450 (СYP450), который может приводить к снижению клиренса КБЗ [3], однако ИЗН не является субстратом или индуктором Р-гр [9].

В настоящее время нет единого мнения о взаимодействии КБЗ и Р-гр. Как отмечалось выше, при фармакорезистентной форме эпилепсии, сопровождающейся гиперэкспрессией Р-гр, применение верапамила позволяет повысить эффективность КБЗ путем облегчения его транспорта в мозг [21]. Тем не менее, результаты ряда исследований предполагают, что хотя КБЗ и является индуктором Р-гр, его транспорт через ГЭБ в большей степени зависит от других АВС-транспортеров – в частности, таких, как MRP (multidrug resistance-associated proteins) и BCRP (breast cancer resistance protein) [15].

Данные исследований *in vitro* с использованием монослоя поляризованных клеток MDCK [23] и сегментов тощей кишки мыши, экспрессирующих Р-гр [6], подтверждают отсутствие заметного влияния Р-гр как на абсорбцию

КБЗ, так и на его обратный транспорт из клеток. В то же время эти исследования свидетельствуют об активном Р-гр-зависимом обратном транспорте его главного активного метаболита КБЗ-10,11-эпоксида, образующегося в печени. Это важный факт, поскольку, как известно, КБЗ является аутоиндуктором собственного метаболизма в печени, и при регулярном приеме его эффективность может значительно снижаться именно из-за быстрой трансформации в печени с образованием метаболита, ограниченно проникающего в мозг.

Как показывают результаты данного исследования, применение верапамила – селективного ингибитора Р-гр позволяет значительно усилить противосудорожное действие КБЗ в отношении судорог, индуцированных ИЗН, обеспечивая снижение эффективной дозы не менее чем на 30% – с 30 мг/кг до 20 мг/кг. Можно было бы предположить, что усиление эффекта происходит в результате облегченного проникновения в мозг активного метаболита КБЗ. Однако это маловероятно, поскольку условия эксперимента не способствовали образованию метаболита: во-первых, КБЗ был введен внутривенно, т.е. его поступление в печень было ниже, чем в случае обычно применяемого перорального введения; во-вторых, препарат вводился животному впервые, что исключает аутоиндукцию метаболизма.

Заключение

Таким образом, полученные данные отчетливо подтверждают, что Р-гр играет существенную роль в транспорте КБЗ через ГЭБ, значительно ограничивая его поступление в мозг.

Список литературы

1. *Alvariza S., Fagiolino P., Vázquez M., et al.* Verapamil effect on phenytoin pharmacokinetics in rats // *Epilepsy Res.* 2013. Vol. 107. No. 1-2. P. 51-55.
2. *Daci A., Beretta G., Vllasaliu D., Shala, et al.* Polymorphic variants of SCN1A and EPHX1 influence plasma carbamazepine concentration, metabolism and pharmacoresistance in a population of Kosovar Albanian epileptic patients // *PLoS One.* 2015. Vol. 10. P. 1-17.
3. *Desta Z., Soukhova N.V., Flockhart D.A.* Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A // *Antimicrob agents chemother.* 2001. Vol. 45. No. 2. P. 382-392.
4. *Dombrowski S.M., Desai S.Y., Marroni M., et al.* Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy // *Epilepsia.* 2001. Vol. 42. P. 1501-1506.
5. *El Idrissi A., 'Amoreaux W.J.L.* Selective resistance of taurine-fed mice to isoniazide-potentiated seizures: in vivo functional test for the activity of glutamic acid decarboxylase // *Neuroscience.* 2008. Vol. 156. No. 3. P. 693-699.
6. *Fortuna A., Alves G., Falcão A., et al.* Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the using chamber technique // *Epilepsia.* 2012. Vol. 53. No. 3. P. 529-538.
7. *Gidal B.E.* P-glycoprotein expression and pharmacoresistant epilepsy: cause or consequence? // *Epilepsy. Curr.* 2014. Vol. 14. No. 3. P. 136-138.
8. *Han J.Y., Ahn S.Y., Yoo J.H., et al.* Alleviation of kainic acid-induced brain barrier dysfunction by 4-o-methylhonokiol in *in vitro* and *in vivo* models // *Biomed. Res. Int.* 2015. Article ID 893163.
9. *Horita Y., Doi N.* Comparative study of the effects of antituberculosis drugs and antiretroviral drugs on cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* // *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. Vol. 58. No. 6. P. 3168-3176.
10. *Hoffmann A., Bredno J., Wendland M., et al.* High and low molecular weight fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans to assess blood-brain barrier disruption: technical considerations // *Transl. stroke res.* 2011. Vol. 2. No. 1. P. 106-111.
11. *Löscher W., Luna-Tortós C., Römermann K., et al.* Do ATP-binding cassette transporters cause pharmacoresistance in epilepsy? Problems and approaches in determining which anti-epileptic drugs are affected // *Curr. Pharm. Des.* 2011. Vol. 17. No.26. P. 2808-2828.
12. *Luna-Tortós C., Fedrowitz M., Löscher W.* Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein // *Neuropharmacology.* 2008. Vol. 55. No. 8. P. 1364-1375.
13. *Ma A., Wang C., Chen Y., et al.* P-glycoprotein alters blood-brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy // *Drug. des. devel. ther.* 2013. Vol. 7. P. 1447-1454.
14. *Nair R., Kumar A.C., Priya V.K., et al.* // *Lipids Health Dis.* 2012.
15. *Potschka H.* Role of CNS efflux drug transporters in antiepileptic drug delivery: overcoming CNS efflux drug transport // *Adv. Drug deliv. Rev.* 2012. Vol. 64. No. 10. P. 943-952.
16. *Puranik Y.G., Birnbaum A.K., Marino S.E., et al.* Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy // *Pharmacogenomics.* 2013. Vol. 14. No. 1. P. 35-45.
17. *Racine R.J.* Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure // *Electroencephalogr. clin. neurophysiol.* 1972. Vol. 32. No. 3. P. 281-294.
18. *Rubin L.L., Staddon J.M.* The cell biology of the blood-brain barrier ann. rev. // *Neurosci.* 1999. Vol. 22. P. 11-28.
19. *Sun X.Y., Wei C.X., Deng X.Q., et al.* Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a]phthalazine in various experimental seizure models in mice // *Pharmacol. Rep.* 2010. Vol. 62. No. 2. P. 273-277.
20. *Smith M., Wilcox K.S., White H.S.* Discovery of antiepileptic drugs // *Neurotherapeutics.* 2007. Vol. 4. No. 1. P. 12-17.

21. *Summers M.A., Moore J.L., McAuley J.W.* Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy // *Ann. Pharmacother.* 2004. Vol. 38. No. 10. P. 1631-1634.
22. *Volk H.A., Potschka H., Löscher W.* Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats // *Epilepsy Res.* 2004. Vol. 58. No. 1. P. 67-79.
23. *Zhang C., Zuo Z., Kwan P., et al.* In vitro transport profile of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate, and their active metabolites by human P-glycoprotein // *Epilepsia.* 2011. Vol. 52. No. 10. P. 1894-1904.

The influence of P-glycoprotein on the transport of anticonvulsants in the brain

A.M. Zybina, K.N. Kulichenkova, V.Yu. Balaban`yan, S.E. Gel`perina, K.R. Abbasova

Pharmacoresistance to antiepileptic drugs (AEDs) is one of the major problems in the treatment of epilepsy. According to one of the current hypotheses, this pharmacoresistance may be associated with the reverse transport of AEDs by drug efflux transporters such as P-glycoprotein (Pgp) through the blood-brain barrier. However, so far there is no unequivocal opinion regarding the involvement of P-gp in the resistance to carbamazepine, one of the most important AEDs. The objective of the present study was to investigate the influence of verapamil, which is known to be P-gp inhibitor, on the anticonvulsive effect of carbamazepine in rat epilepsy induced by isoniazid. A significant enhancement of the anticonvulsive effect of carbamazepine in the presence of verapamil (30% decrease of the effective dose – from 30 mg/kg to 20 mg/kg) suggests that P-glycoprotein may considerably limit the transport of carbamazepine to the brain.

Key words: blood-brain barrier, isoniazid, carbamazepine, P-glycoprotein, epilepsy.

Влияние омега-3-полиненасыщенных жирных кислот на ультраструктуру гепатоцитов крыс с послеоперационным гипотиреозом и заместительной гормональной терапией

О.В. Остапенко

Академия биоресурсов и природопользования «КФУ имени В.И. Вернадского», Симферополь

Контактная информация: к.м.н. Остапенко Ольга Валериевна, ostapenko.o.v@yandex.ru

Работа посвящена изучению влияния препарата Эпадол на структуру печени животных в условиях экспериментального гипотиреоза. Было обследовано более 50-ти животных. Описаны гепатоциты, причем особое внимание было обращено на строение их органелл. Показано, что Эпадол оказывает выраженное действие на ультраструктуру клеток печени.

Ключевые слова: печень, послеоперационный гипотиреоз, Эпадол.

Введение

В последнее время одним из направлений в профилактике и лечении заболеваний человека является поиск натуральных препаратов, которые регулируют процессы метаболизма и оказывают корректирующее влияние на организм в целом. Одним из таких препаратов является Эпадол, который содержит омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Омега-3 ПНЖК относятся к незаменимым жирным кислотам, которые должны ежедневно сбалансированно поступать в организм. Механизм действия и обоснование терапевтического применения омега-3 ПНЖК частично связаны с их влиянием на состояние системы эйкозаноидов. Омега-3 ПНЖК являются конкурентными антагонистами арахидоновой кислоты – основного субстрата синтеза простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов в организме в составе фосфолипидов клеточных мембран.

В научной литературе указывается, что наряду с гиполипидемическим эффектом омега-3 ПНЖК оказывают гипокоагуляционное, антиагрегантное, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие. В лечебной практике они применяются при сердечно-сосудистых, нервных заболеваниях, воспалительных процессах и т.д. [2, 3, 7]. В доступной нам литературе не удалось обнаружить сведений относительно применения омега-3 ПНЖК при гипотиреозе.

Цель настоящего исследования – оценка выраженности ультраструктурных изменений при применении омега-3 ПНЖК (препарата Эпадол) в условиях гормональной терапии послеоперационного гипотиреоза.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 54-х половозрелых крысах-самцах популяции линий Wistar массой

160-220 г. Животные содержались в условиях вивария при постоянной температуре, естественном достаточном освещении и свободном доступе к пище и воде. Послеоперационный гипотиреоз моделировали путем тиреоидэктомии [5]. Животные были разделены на три группы: 1-я группа – тиреоидэктомированные животные; 2-я группа – животные, получавшие после операции заместительную гормональную терапию: L-тироксин – 10 мг/кг (производства «Фармак», Украина), и кальцитонин – 1,0 МЕ/кг (производства «Noventus», Швейцария). Животные 3-й группы получали одновременно и гормональные препараты, и омега-3 ПНЖК (Эпадол) (производства «Киевский витаминный завод», Украина) в дозе 0,04 мг/кг. Забор материала проводили через 100 дней после операции. Для контроля эффективности гипотиреоза у экспериментальных животных изучали содержание тироксина в сыворотке крови иммуноферментным методом (прибор «Sunrise RC» фирмы «ТЕКАН»). Фрагменты печени изучали с помощью световой и электронной микроскопии.

Исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals

used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [4].

Результаты и их обсуждение

Проведенный иммуноферментный анализ показал достоверное снижение уровня свободного тироксина более чем в три раза, что свидетельствует о гипофункции щитовидной железы (табл.).

У животных 1-й экспериментальной группы отмечаются ярко выраженные патологические процессы, что согласуется с данными о наличии жалоб пациентов с гипотиреозом на проблемы с ЖКТ. Паренхима печени характеризуется клеточным разнообразием: встречаются одно- и двуядерные, а также светлые и темные клетки. Однако можно отметить ряд гепатоцитов с более темной и более светлой цитоплазмой. Ядро темных клеток на светооптическом уровне слабо различимо, по размеру такие клетки значительно меньше, чем основная масса клеток. Светлые клетки выделяются не только более светлой на светооптическом уровне цитоплазмой, но и более крупными размерами. В цитоплазме таких клеток хорошо визуализируются одно или два ядра, цитоплазма характеризуется зернистостью.

На электронно-микроскопическом уровне в цитоплазме гепатоцитов наблюдается хаотическое распределение

Таблица

Содержание свободного тироксина в плазме крови (пмоль/л)

Контроль	Послеоперационный гипотиреоз
8,58±0,72	2,24±0,14*

Примечание: * – статистически достоверная разница по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

органелл, их количество резко снижено. Энергетический аппарат клетки представлен митохондриями округлой формы с электронно-плотным матриксом и слабо различимыми кристами, что свидетельствует об угнетении энергетической функции клеток. Белоксинтезирующий аппарат представлен фрагментарно расположенными цистернами ЭПС с незначительным количеством рибосом (рис. 1).

При изучении ультраструктуры секреторных клеток печени было

выявлено, что комбинированная терапия гормональными препаратами (L-тироксина, кальцитонином) сопровождается умеренными дистрофическими и аутолитическими изменениями. Следует отметить, что в паренхиме на светооптическом уровне практически не встречаются гепатоциты с очень темной или очень светлой цитоплазмой, что свидетельствует о лучшей сохранности паренхимы органа и относительной стабилизации процессов метаболизма.

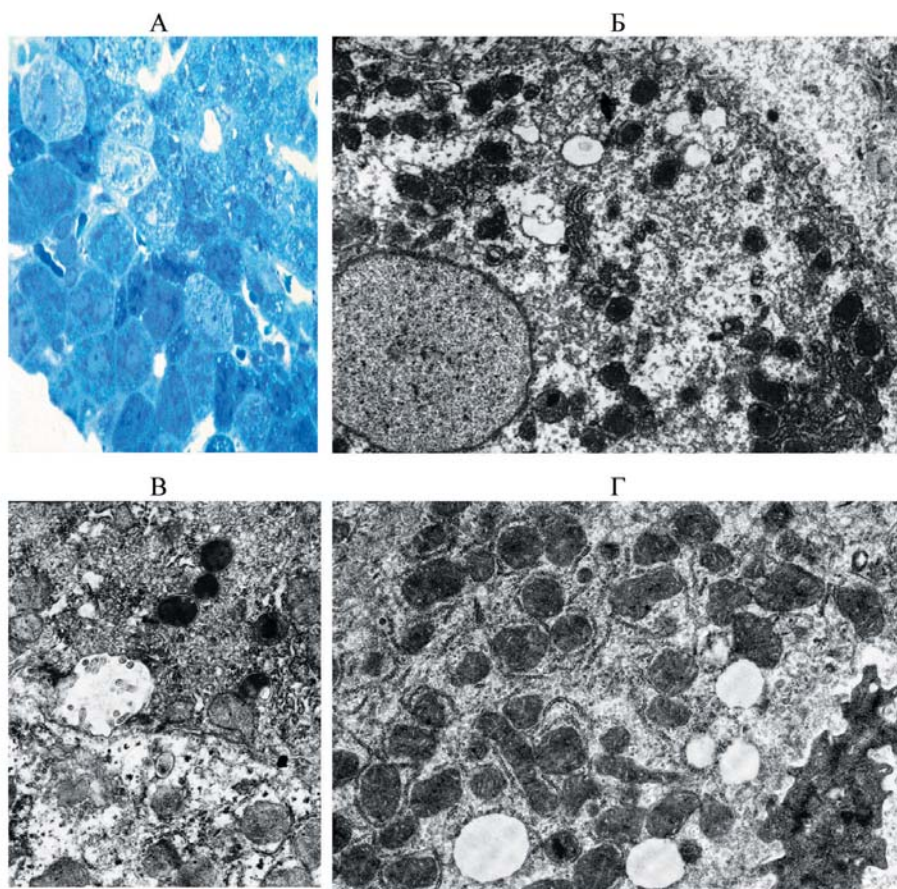


Рис. 1. Фрагменты печени крыс с послеоперационным гипотиреозом (100 суток): полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. $\times 1200$ (А). Электронно-микроскопические микрофотографии. Ультраструктурные изменения гепатоцитов. Скопление электронно-плотных митохондрий. Дезорганизация цистерн ЭПС. Хаотическое распределение включений. Ув. $\times 6400$ (Б), $\times 8600$ (В), $\times 8000$ (Г).

Ультраструктурная организация клеток печени характеризуется дезорганизацией ЭПС, на ее мембранах содержится умеренное количество рибосом, в ряде клеток отмечается скопление липидных капель. Митохондрии отличаются от предыдущей группы разнообразными размерами и формой (округлой и овальной) с умеренной электронной плотностью матрикса и короткими единичными кристами.

В экстрацеллюлярном пространстве выявляется скопление коллагеновых во-

локон (рис. 2). В кровеносных сосудах наблюдается стаз и сладж эритроцитов.

При применении препарата, содержащего омега-3 ПНЖК (Эпадол), в гепатоцитах отмечается улучшение структуры клетки и ядра. Клетки плотно прилегают друг к другу, формируя тяжи, между которыми располагаются синусоидные капилляры. В цитоплазме одно или два ядра округлой формы умеренной электронной плотности. Хроматин деконденсирован. В центре или эксцентрично располагается 1-2 ядрыш-

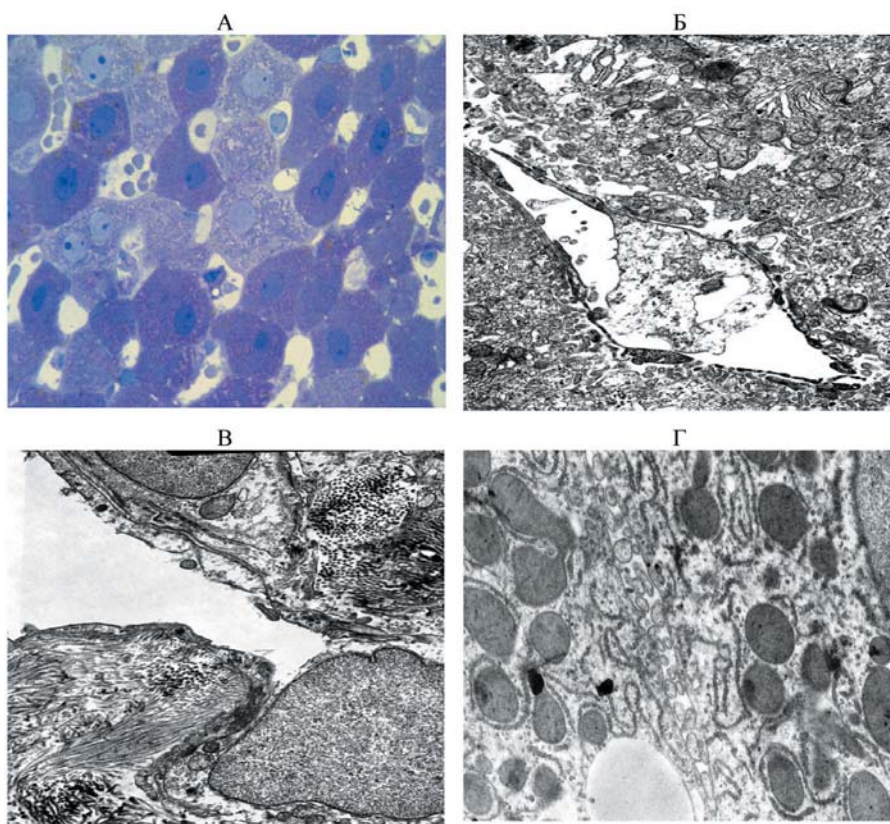


Рис. 2. Фрагменты печени крыс с послеоперационным гипотиреозом (100 суток) и заместительной гормональной терапией (L-тироксин, кальцитонин): полутонкий срез. Окраска по Нават. Ув. $\times 1200$ (А). Электронно-микроскопические микрофотографии. Изменения паренхимы и стромы органа. Разрозненные цистерны ЭПС. Митохондрии с матриксом умеренной электронной плотности. Скопление коллагеновых волокон. Ув. $\times 8000$ (Б), $\times 8000$ (В), $\times 9600$ (Г).

ка. Структурная организация ядрышек свидетельствует об их функциональной активности. Цитоплазма большей части гепатоцитов электронно-плотная, заполнена хорошо развитыми органеллами. Часть цитоплазмы занята цистернами эндоплазматической сети (рис. 3).

На периферии клеток располагаются скопления митохондрий округлой или слегка удлинённой формы. Внутренняя и наружная мембраны сохраняют свою целостность. Матрикс умеренной электронной плотности, однако при более детальном рассмотрении можно различить кристы.

Таким образом, при послеоперационном гипотиреозе в секреторных клетках печени отмечаются морфологические нарушения, приводящие к функциональной недостаточности органа. Происходит истощение энергетических и пластических возможностей, что сопровождается развитием функционального напряжения организма в целом. При коррекции дефицита гормонов щитовидной железы функциональное напряжение спадает, однако морфологические нарушения в меньшей степени сохраняются. При применении омега-3 ПНЖК происходит активация защитных меха-

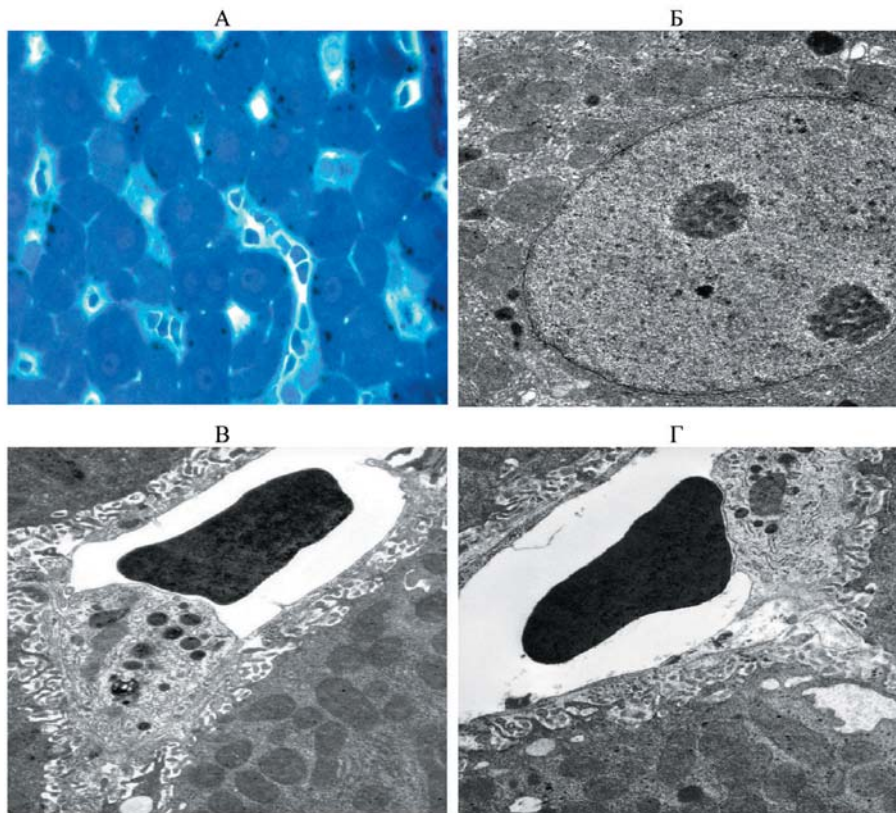


Рис. 3. Фрагменты печени крыс с послеоперационным гипотиреозом (100 суток) и заместительной гормональной терапией Эпадалом: полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. $\times 1200$ (А). Электронно-микроскопические микрофотографии. Активное интерфазное ядро с двумя ядрышками. Улучшенная сохранность клеток печени, эндотелиоцитов синусоидных капилляров. Активные клетки Купфера. Ув. $\times 8000$ (Б), $\times 8000$ (В), $\times 8000$ (Г).

низмов на ультраструктурном и клеточном уровнях. В результате насыщения организма омега-3 ПНЖК, включения их в состав фосфолипидов клеточных мембран происходит клеточная и внутриклеточная регенерация. Полученные данные согласуются с результатами экспериментальных и клинических исследований др. авторов [1, 3, 6, 7].

Выводы

Анализ полученного материала позволил сделать вывод о развитии нарушений морфофункционального состояния печени при дефиците гормонов щитовидной железы (послеоперационный гипотиреоз).

При гормональной компенсации функционального дефицита щитовидной железы отмечаются менее выраженные дистрофические изменения клеток печени (гепатоцитов, эндотелиоцитов) по сравнению с тиреоидэктомированными животными.

Применение омега-3 ПНЖК в виде препарата Эпадол, одновременно с заместительной гормональной терапией, оказывает положительное влияние на ультраструктуру клеток печени – ярко выраженный гепатопротекторный эффект.

Список литературы

1. *Агаджанян Н.А., Баевский Р.М., Берсенева А.П.* Проблемы адаптации и учение о здоровье: уч. пособ. - М.: РУДН. 2006. 284 с.
2. *Людинина А.Ю., Бойко Е.Р.* Среднепечечные жирные кислоты в обеспечении физических нагрузок разной интенсивности у лыжников-гонщиков // Спортивная медицина: наука и практика. 2015. № 4. С. 21-25.
3. *Остапенко О.В.* Электронно-микроскопическая характеристика клеток поджелудочной железы крыс с послеоперационным гипотиреозом его коррекцией Эпадолом // Биомедицина. 2015. № 4. С. 61-68.
4. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
5. *Стеченко Л.О., Петренко В.А., Бик П.Л., Кузян В.Р., Куфтирева Т.П.* Спосіб моделювання гіпотиреозу у щурів. Патент № 27821. МПК G09B23/28 (2006.01). Офіційний бюлетень. 2007 р.
6. *Фадель Х.К.* Влияние гипо- и гиперфункции щитовидной железы на ферментативную активность и окислительное фосфорилирование митохондрий тонкой кишки и поджелудочной железы у различных возрастных групп крыс: автореф. дис... канд. биол. наук. - Ташкент. 1991. 22 с.
7. *Шиш А.М.* Механізми кардіопротекції при стресі: роль ω-3 поліненасичених жирних кислот // Вісник вінницького національного медичного університету. 2008. № 12 (2). С. 364-368.

The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the ultrastructure of hepatocytes of rats with postoperative hypothyroidism and hormone replacement therapy

O.V. Ostapenko

The work is devoted to the research of Epadol influence on the structure of liver in animals with experimental hypothyroidism. Over 50 animals were examined. Cells of liver were described with particular attention to the structure of their organelles. It has been established that consumption of Epadol a pronounced effect on the ultrastructure of the cells of the liver.

Key words: liver, postoperative hypothyroidism, Epadol.

Влияние кислотности желудочного сока на микрофлору кишечника

Н.С. Тропская¹, И.Г. Шашкова¹, Т.В. Черненькая¹, Т.С. Попова¹,
Г.Д. Капанадзе²

¹ – ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва
² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

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

Исследовано влияние гипохлоргидрии на изменение качественного и количественного состава полостной микрофлоры тощей и слепой кишок крыс. Показано, что внутрижелудочное введение Париета в течение 16-ти суток приводит к колонизации *Escherichia coli* проксимальных отделов тонкого кишечника, что сопровождается потерей массы тела. Выявлено уменьшение видового состава микрофлоры тощей и слепой кишок. Обнаружено исчезновение количественного проксимо-дистального градиента микроорганизмов в кишечнике.

Ключевые слова: кишечная микрофлора, гипохлоргидрия, избыточный бактериальный рост.

Введение

Известно, что одним из механизмов, контролирующих кишечную микрофлору, является кислотный барьер желудка [5]. При снижении желудочной кислотопродукции (медикаментозное или оперативное ее подавление) наблюдается колонизация микрофлорой проксимальных отделов тонкого кишечника [1].

Наиболее эффективно снижают кислотопродукцию в желудке ингибиторы протонной помпы, блокирующие конечный этап образования соляной кислоты – перенос протонов в секреторные каналы париетальных клеток с помощью фермента H⁺/K⁺-АТФ-азы (омепразол, рабепразол и т.п.). У здоровых добровольцев и пациентов с язвенной болезнью желудка продемонстрировано, что через 5 недель приема омепразола по 20 мг/сут в желудочном и тон-

кокишечном содержимом увеличилось количество *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterococcus*, *Lactobacillus bifidus*, *Bacteroides vulgatus*, *B. uniformis*, *Eubacterium lentum*, *Eubacterium parvum*, *Corynebacterium granulosum* [7]. В этой работе отмечена корреляция между среднесуточным уровнем рН в желудке и выраженностью бактериальной колонизации тонкой кишки [7].

В большинстве экспериментальных и клинических работ по исследованию влияния ингибиторов протонной помпы на микрофлору кишечника приводятся результаты, касающиеся изменения микробного пейзажа желудка и верхних отделов тонкой кишки [3, 4, 8]. Кроме того, известно, что в норме количество микроорганизмов в просвете увеличивается в направлении дистальных отделов кишечника [2]. Однако в доступной

литературе мы не обнаружили сведений о влиянии подавления секреции соляной кислоты на состав микрофлоры слепой кишки, а также об изменении количественного проксимо-дистального градиента полостной микрофлоры кишечника.

Цель исследования – изучить влияние гипохлоргидрии на изменение качественного и количественного состава полостной микрофлоры тощей и слепой кишок.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 12-ти крысах-самцах популяции линий Wistar массой 420-490 г. Протокол исследований был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Контрольную группу составили 6 здоровых животных. В опытной группе (n=6) за 15 дней до экспериментов была проведена предварительная оперативная подготовка, для которой использовали р-р кетамина (0,3 мл/100 г массы тела внутривенно). Во время операции проводили срединную лапаротомию, вживляли зонд в антральную часть желудка. После фиксации зонд 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, влажности воздуха 45-65%, и 12-часовом режиме освещенности (8⁰⁰-20⁰⁰ – свет, 20⁰⁰-8⁰⁰ – сумеречное освещение).

В начале экспериментов всех животных взвешивали. В качестве препарата для подавления секреции соляной кислоты использовался Париет (международное непатентованное название – Рабепразол) – ингибитор протонной помпы. Во время экспериментов через желудочный зонд вводили 0,1 мл р-ра Париета в дозе 0,14 мг/кг ежедневно, однократно в течение 16-ти дней. До (фон) и через 2 ч после введения Париета измерялся рН содержимого желудка с помощью универсальной лакмусовой индикаторной бумаги. На 17-е сутки животных взвешивали и выводили из эксперимента. После введения летальной дозы наркоза (обеим группам животных) и вскрытия брюшной полости проводили забор содержимого тощей (20 см за связкой Трейтца) и слепой кишок для бактериологического анализа. Также выделяли печень, почки, надпочечники, селезенку, слепую кишку для определения относительной массы органов.

Микробиологическое исследование 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 9 групп микроорганизмов: *Escherichia coli* (*E.coli*), *Enterococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., плесневые грибы, *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. Количество бактерий в каждом виде выражали в КОЕ/мл.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Для каждой группы животных для всех параметров расчи-

тывали среднее значение, стандартное отклонение, медиану, персентили. В связи с тем, что распределение значений не носило нормального характера, данные в окончательном варианте представляли как медиану и персентили – Me (25;75)%, и для статистического анализа использовали непараметрические критерии. При сравнении фоновых значений кислотности содержимого желудка в различные сроки экспериментов (1-16-й дни) применяли непараметрический критерий – ранговый дисперсионный анализ по Фридману. При сравнении значений кислотности содержимого желудка до введения Париета со значениями после введения (с 1-го по 16-й день эксперимента) применяли Т-критерий Уилкоксона. При сравнении данных бактериологических исследований и значений относительной массы органов опытной группы с контрольной использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При сравнении количества бактерий в

тощей и слепой кишке (как в контрольной, так и в опытной группах) использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались значения при $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В первый день эксперимента до введения Париета значение рН содержимого желудка составляло 2 (2;2), после введения – 3 (2,5;4,5) ($p < 0,05$). Отметим, что уже на третий день эксперимента наблюдалось увеличение фонового значения рН содержимого желудка с двух (2;2) до 5,5 (5,5;5,5), причем данное различие было статистически значимым по сравнению с первым днем ($p < 0,01$). Кроме того, в эти сроки значения рН до и после введения Париета не отличались. На 9-й день у всех животных происходило устойчивое снижение кислотности желудочного сока, с сохранением результатов в последующие дни введения. Значения рН представлены на рис. 1.

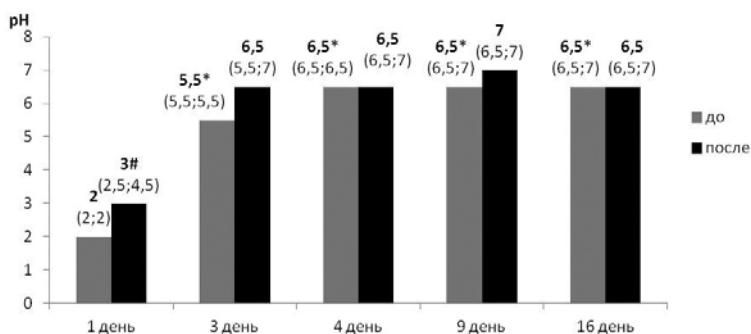


Рис. 1. Динамика изменения кислотности содержимого желудка в опытной группе в различные дни эксперимента.

Примечание:

* – отличия фоновых значений статистически значимы (1-3 день, 1-4 день, 1-9 день, 1-16 день), ранговый дисперсионный анализ по Фридману, $p < 0,01$;

– отличия фоновых значений (до) и после введения Париета статистически значимы, Т-критерий Уилкоксона, $p < 0,05$.

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

Они показали, что в контрольной группе у большинства животных в содержимом тощей кишки присутствовали *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp. У трех животных из шести присутствовали *E.coli*, у двух – *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp., у одного животного высевалась *Klebsiella* spp. При анализе микрофлоры каждого отдельного животного было установлено, что микробиоценоз тощей кишки

здоровых животных составлял от одного до шести видов бактерий. В содержимом слепой кишки у всех животных присутствовали *Staphylococcus* spp, *E.coli*, и *Bifidobacterium* spp. У большинства животных высевались *Proteus mirabilis*, *Enterococcus* spp. У трех животных из шести присутствовали плесневые грибы и *Lactobacillus* spp., у двух – *Enterobacter* spp. и у одного животного высевалась *Klebsiella* spp. Состав микрофлоры слепой кишки каждого животного составлял от пяти до семи видов микроорганизмов.

Таблица 1

Содержание различных видов микроорганизмов в тощей и слепой кишке в контрольной группе (здоровые животные) и в опытной группе (животные после 16-суточного введения Париета), КОЕ/мл, Ме (25;75)%

Вид микроорганизмов	Тощая		Слепая	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>Staphylococcus</i> spp.	10 ² (0;10 ³)	0 (0;0) #	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁵)	0 (0;0)*
<i>Enterococcus</i> spp.	10 ² (0;10 ³)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁵) #	10 ⁵ (10 ⁵ ;10 ⁵)	10 ⁵ (10 ⁵ ;10 ⁶)
<i>E.coli</i>	10 ² (0;10 ⁴)	10 ⁷ (10 ⁶ ;10 ⁹) #	10 ⁵ (10 ⁵ ;10 ⁶)	10 ⁸ (10 ⁷ ;10 ⁹)*
<i>Proteus mirabilis</i>	0 (0;0)	10 (0;10 ²)	10 ³ (0;10 ³)	10 ³ (0;10 ⁵)
<i>Enterobacter</i> spp.	10 ³ (10 ² ;10 ⁵)	0 (0;10 ⁶)	0 (0;10 ⁵)	0 (0;10 ⁵)
<i>Klebsiella</i> spp.	0 (0;0)	10 ³ (0;10 ⁵)	0 (0;0)	10 ⁵ (0;10 ⁸)
Плесневые грибы	0 (0;0)	0 (0;0)	10 (0;10 ²)	10 (0;10 ²)
<i>Lactobacillus</i> spp.	0 (0;10 ³)	0 (0;10 ³)	10 ² (0;10 ⁴)	0 (0;10 ⁴)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0 (0;10 ³)	0 (0;0)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁵)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁵)

Примечание: * и # – отличия опытной группы от контрольной статистически значимы при p<0,01 и p<0,05 соответственно. При сравнении данных бактериологических исследований опытной группы с контрольной использовали непараметрический U- критерий Манна-Уитни.

Таблица 2

Количество видов микроорганизмов, обнаруженных у каждого отдельного животного в содержимом тощей и слепой кишки в контрольной и опытной группах

	Тощая кишка		Слепая кишка	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Количество видов микроорганизмов (минимум - максимум)	1-6	3-5	5-7	4-6

В опытной группе после 16-суточного введения Париета отмечались разнонаправленные тенденции в количественном отношении некоторых микроорганизмов. Так, в содержимом тощей кишки исчезли *Staphylococcus* spp. Статистически значимо увеличилось количество *Enterococcus* spp. и *E.coli*. Также увеличилось количество *Klebsiella* spp., но было статистически незначимым. У трех животных появились *Proteus mirabilis*. Статистически незначимо уменьшилось количество *Enterobacter* spp. и *Bifidobacterium* spp. Видовое разнообразие микрофлоры тощей кишки у каждого животного уменьшилось по сравнению с контролем и составляло от трех до пяти видов микроорганизмов. В содержимом слепой кишки исчезли *Staphylococcus* spp. Статистически значимо увеличилось количество *E.coli*. Количество *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis* и *Bifidobacterium* spp. также возросло, но было статистически незначимо.

Количество *Lactobacillus* spp. было статистически незначимо снижено. Видовое разнообразие микрофлоры слепой кишки у каждого животного уменьшилось по сравнению с контролем и составляло от четырех до шести видов микроорганизмов.

Таким образом, при стойком понижении кислотности желудочного содержимого произошло уменьшение видового состава микрофлоры как проксимальных участков тощей кишки, так и дистальных участков кишечника (слепая кишка).

При изучении закономерностей количественного проксимо-дистального градиента микроорганизмов были проанализированы только те виды бактерий, содержание которых статистически значимо отличалось между контрольной и опытной группами. Как видно из рис. 2, в контрольной группе количество *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *E.coli* в просвете увеличивается в направлении дистальных отделов – от тощей к слепой кишке. В опытной группе

Количественный градиент бактерий в контрольной группе

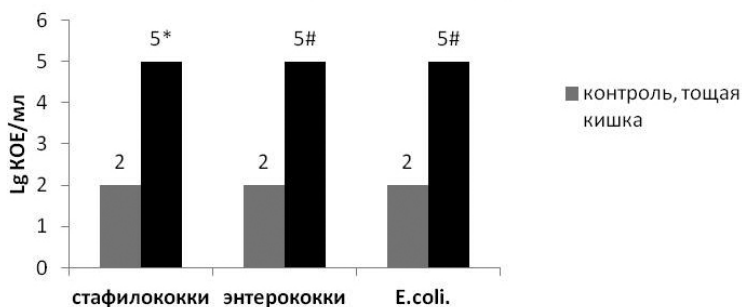


Рис. 2. Количественный градиент бактерий контрольной группы животных.

Примечание: * и # – отличия количества бактерий в тонкой и слепой кишке в контрольной группе статистически значимы при $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно (непараметрический U-критерий Манна-Уитни).

Количественный градиент бактерий в опытной группе

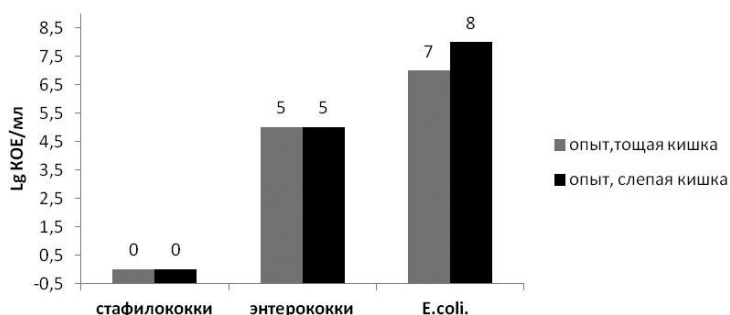


Рис. 3. Количественный градиент бактерий опытной группы животных.

Примечание: * и # – отличия количества бактерий в тонкой и слепой кишке в опытной группе статистически значимы при $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно (непараметрический U-критерий Манна-Уитни).

(рис. 3) количественный проксимо-дистальный градиент отсутствует: количество микроорганизмов как в тощей, так и слепой кишке статистически значимо не отличается.

При взвешивании животных выявлено, что в опытной группе произошло резкое снижение массы тела животных с 457-ми (451;475) до 248-ми (223;265) г, т.е. в 1,84 раза ($p < 0,05$). Данные по относительной массе органов представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что после 16-суточного применения ингибитора протонной помпы наблюдается статистически значимое увеличение относительной массы почек и надпочечников, а также уменьшение относительной массы слепой кишки.

Заключение

Таким образом, при стойком понижении кислотности желудочного содержимого наблюдается существенное снижение массы тела эксперименталь-

Таблица 3
Относительная масса органов, МЕ (25;75%)

Группа / Орган	Относительная масса органов, МЕ (25;75%)				
	Печень	Селезенка	Почки (пара)	Надпочечники (пара)	Слепая кишка
Контроль	2,05 (1,94;2,10)	0,20 (0,18;0,21)	0,49 (0,47;0,52)	0,012 (0,010;0,013)	0,92 (0,82;0,98)
Опыт	2,02 (1,76;2,21)	0,13 (0,11;0,18)	0,67* (0,63;0,69)	0,026* (0,020;0,029)	0,72# (0,66;0,77)

Примечание: * и # – отличия опытной группы от контрольной группы статистически значимы при $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно (непараметрический U-критерий Манна-Уитни).

ных животных, нефромегалия, гипертрофия надпочечников и уменьшение относительной массы слепой кишки. В нашем исследовании подтверждено, что при гипохлоргидрии происходит колонизация *E. coli* проксимальных отделов тонкого кишечника, что, по данным литературы, сопровождается потерей массы тела и мальабсорбцией [1, 6, 7]. При бактериологических исследованиях нами выявлены однонаправленные изменения как в проксимальных участках тощей кишки, так и в дистальных, выражающиеся в уменьшении видового состава микрофлоры тощей и слепой кишок. Кроме того, обнаружено исчезновение количественного проксимодистального градиента микроорганизмов в кишечнике. Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что кислотный барьер желудка не только контролирует колонизацию и рост бактерий в проксимальных отделах тощей кишки, но также регулирует популяцию и состав кишечной микрофлоры в слепой кишке.

Список литературы

1. Ардатская М.Д., Минушкин О.Н., Иконников Н.С. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностические подходы и пути коррекции. Возможности и преимущества биохимического исследования кала: пособ. для врачей. - М., 2004.

2. Среброва С.Ю., Добровольский О.В. Терапия язвенной болезни и проблемы сохранения микроэкологии желудочно-кишечного тракта // Русский медицинский журнал. 2007. № 16. С. 1193-1198.
3. Brummer R.J., Stockbrügger R.W. Effect of nizatidine 300 mg at night and omeprazole 20 mg in the morning on 24-hour intragastric pH and bacterial overgrowth in patients with acute duodenal ulcer // Dig. dis. sci. 1996. Vol. 41. No. 10. P. 2048-2054.
4. Diogo Filho A., Santos P.S., Duque A.S., Cezário R.C., Gontijo Filho P.P. Experimental model in the qualitative and quantitative assessment of non-*Helicobacter* gastric microflora under proton pump inhibitors action // Acta Cir. Bras. 2006. Vol. 21. No. 5. P. 279-284.
5. Gasbarrini A., Lauritano E.C., Garcovich M., Sparano L., Gasbarrini G. New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora, gas production and gut motility // Eur. rev. med. pharmacol. sci. 2008. Vol. 12. Suppl. 1. P. 111-117.
6. Lo W., Chan W.W. Proton pump inhibitor use and the risk of small intestinal bacterial overgrowth: a meta-analysis // Clin. gastroenterol. hepatol. 2013. Vol. 11. No. 5. P. 483-490.
7. Shindo K., Machida M., Fukumura M., Koide K., Yamazaki R. Omeprazole induces altered bile acid metabolism // Gut. 1998. Vol. 42. No. 2. P. 266-271.
8. Theisen J., Nehra D., Citron D., Johansson J., Hagen J.A., Crookes P.F., DeMeester S.R., Bremner C.G., DeMeester T.R., Peters J.H. Suppression of gastric acid secretion in patients with gastroesophageal reflux disease results in gastric bacterial overgrowth and deconjugation of bile acids // J. Gastrointest. surg. 2000. Vol. 4. No. 1. P. 50-54.

Influence of gastric acidity on intestinal microflora

N.S. Tropaskaya, I.G. Shashkova, T.V. Chernen'kaya, T.S. Popova,
G.D. Kapanadze

The effect of hypochlorhydria on qualitative and quantitative composition of the luminal microflora in the jejunum and cecum of rats was studied. It is shown that intragastric administration of pariet for 16 days leads to the *Escherichia coli* colonization of the proximal small intestine, which is accompanied by loss of body weight. It is found a decrease in the composition of microbiota in the jejunum and cecum. Quantitative disappearance of the proximal-distal gradient of microorganisms in the intestine was detected.

Key words: intestinal microflora, hypochlorhydria, bacterial overgrowth.

Правила направления, рецензирования и опубликования научных статей в журнале «Биомедицина»

1. Порядок направления и опубликования статей в рецензируемом издании

1.1. Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвящённые биологическому, математическому и комплексному моделированию. Особое внимание уделяется вопросам генетической, микробиологической, экологической стандартизации лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами. Принимаются рукописи, касающиеся доклинических и клинических испытаний лекарственных препаратов, выполненных на классических и альтернативных биологических объектах. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых видов животных-моделей, представляющих ценность для биомедицинских исследований в качестве тест-систем, биологических объектов, моделирующих патологические состояния человека, продуцентов вакцин и сывороток клеточных культур, органов и тканей для ксенотрансплантации. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных

в биомедицинских экспериментах на животных. Значительное место отводится статьям по разработке и внедрению новых биомедицинских технологий.

1.2. Рубрикация журнала:

- Обзоры;
- Оригинальные статьи;
- Краткие сообщения;
- Практикум;
- Нормативные документы.

В рубрике «Обзоры» публикуются обзоры научной литературы по темам, соответствующим профилю журнала, методологические статьи (максимальный объём рукописи – до 12 стр., максимальное количество ссылок – до 35).

В рубрике «Оригинальные статьи» печатаются труды, отражающие результаты завершённых исследований (до 10 стр., до 25 ссылок).

В «Кратких сообщениях» приводятся завершённые фрагменты работ, представляющие самостоятельный интерес (до 4 стр., до 15 ссылок).

«Практикум» – учебно-методический раздел, где помещаются описания используемых в биомедицине методик, новых технологий (до 6 стр., до 10 ссылок).

В разделе «Нормативные документы» печатаются правила обращения с лабораторными животными, отечественные и международные законодатель-

ные акты, регламентирующие использование биомоделей в экспериментах (до 3 стр.).

1.3. Актуальные разделы журнала:

- Новые биомедицинские технологии;
- Релевантное и альтернативное биомоделирование;
- Методы биомедицинских исследований;
- Лабораторные животные;
- Генетика лабораторных животных;
- Доклинические исследования новых медицинских технологий;
- Клинические исследования новых медицинских технологий;
- Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине;
- Новые регуляторные пептиды;
- Фармаконутриенты и спортивное питание;
- Информационные материалы и нормативные документы.

1.4. Общие требования к оформлению

1.4.1. Статью следует представлять в двух экземплярах с электронной версией текста, набранной 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. Нумерация страниц – сверху по центру (на первой странице её номер не проставляется).

1.4.2. На первой странице следует указать:

- предполагаемую рубрику журнала;
- название статьи;
- инициалы и фамилии авторов;
- учреждения, в которых была проведена работа;
- город или населённый пункт.

На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов). Латинские названия должны быть выделены курсивом.

1.4.3. В конце статьи приводится список цитированной литературы (см. «Литература») и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи. На отдельных листах печатаются таблицы, иллюстративный материал, подписи к рисункам, а также реферат и ключевые слова на английском языке.

1.4.4. 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.

1.4.5. Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список литературы». Для работ, предназначенных для рубрики «Краткие сообщения», раздел «Обсуждение результатов» необязателен, а количество литературных ссылок должно быть минимальным. Форма изложения обзорных и теоретических статей – свободная.

1.4.6. Статьи, описывающие исследования, выполненные на экспериментальных животных или альтернативных биологических объектах, в разделе «Материалы и методы» должны содержать следующую информацию: организм, орган, ткань, клеточная культура, микробная культура, субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов.

В тех работах, где были использованы лабораторные животные, следует указать:

- биологический вид;
- пол;
- возраст;
- массу животного;
- генетический статус: инбредные линии, популяции нелинейных животных гибриды, генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные);
- источник, откуда получены животные;
- микробиологический статус: гнотобиоты, SPF, конвенциональные;
- условия содержания: виварий, изолятор, барьерная система, тип клеток, плотность посадки животных, режим кормления и поения.

1.4.7. Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для расчётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы должны быть пронумерованы и озаглавлены. Они печатаются на отдельных листах, а в тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (табл. 1).

1.4.8. Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке их упоминания в тексте. На обороте каждого рисунка или фотографии должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов,

название статьи, номер рисунка, «верх». Подписи к рисункам даются общим списком на отдельной странице.

Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение. На полях рукописи следует проставить (карандашом) номера таблиц и рисунков напротив тех мест в тексте, где желательно их поместить.

Требования к иллюстрациям на дисках или компакт-дисках:

- чёрно-белая графика – разрешение: не менее 600 точек на дюйм, формат: EPS или TIFF;
- полутоновые и цветные изображения – разрешение не менее 300 точек на дюйм, формат EPS или TIFF;
- диаграммы и графики (векторные изображения) представляются в собственном формате программы Adobe Illustrator, FreeHand или CorelDraw или в формате EPS с приложением исходных (табличных) данных, по которым построены графики/диаграммы.

1.4.9. Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более трёх сокращений терминов, с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

1.4.10. Литература

Цитируемая в статье литература приводится общим списком в конце статьи в алфавитном порядке (вначале – на русском, затем – на иностранных языках). Ссылки на цитируемую литературу в тексте статьи отмечаются порядковым номером работы в списке литературы, заключённым в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов указываются (если это необходимо) в тексте на русском языке, при первом упоминании приводится их написание на языке оригинала в круглых скобках.

В списке литературы приводятся:

- для книг: фамилии и инициалы всех авторов, название, место издания, название издательства, год издания, цитируемые страницы, либо общее количество страниц в книге (если текст статьи содержит несколько ссылок на данную книгу).

Пример:

1. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В. Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. - М.-Воронеж: ИСТОКИ. - 2004. - С. 232.

- для главы (статьи) в книге: фамилии и инициалы авторов главы, название главы, название книги, фамилии и инициалы редакторов, место издания, название издательства, год издания, первая и последняя страницы главы.

Пример:

2. Авербах М.М., Мороз А.М. Естественная резистентность к туберкулезу и некоторые вопросы иммуногенетики // В кн.: Иммунология и иммунопатология туберкулеза. – М.: Медицина. - 1976. - С. 106-116.

- для статьи в журнале: фамилии и инициалы авторов, название статьи, наименование журнала, год, том (выпуск), номер, первая и последняя страницы статьи.

Пример:

3. Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина. - 2005. - № 1. - С. 5-17.

- для сайта: ссылка на страницу в сети Интернет.

Пример:

<http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout/index.html>.

1.5. Корректур

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.

1.6. Плата за публикацию и гонорар авторам

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

1.7. Адрес редакции

Рукописи направлять по адресу: 143442 Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые горы, вл. 1. ФГБУН НЦБМТ ФМБА, редакция журнала «Биомедицина».

2. Порядок рецензирования статей, направленных в редакцию рецензируемого издания

2.1. Все статьи, поступившие в редакцию, проходят независимое рецензирование.

2.2. Рукопись научной статьи, поступившая в редакцию журнала «Биомедицина», рассматривается ответственным секретарём на предмет соответствия профилю журнала, требованиям к оформлению, регистрируется. Отв. секретарь направляет статью на рецензирование одному или, при необходимости, двум рецензентам.

2.3. Для проведения рецензирования рукописей статей в качестве рецензентов могут привлекаться как члены редакционной коллегии издания «Биомедици-

на», так и высококвалифицированные учёные и специалисты других организаций и предприятий, обладающие глубокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению (как правило, доктора наук, профессора) и имеющие публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних трёх лет.

2.4. Оплата труда рецензентов, не являющихся членами редколлегии, производится в соответствии с действующими правилами.

2.5. Рецензенты уведомляются о том, что присланные им рукописи являются частной собственностью авторов и относятся к сведениям, не подлежащим разглашению. Рецензентам не разрешается делать копии статей для своих нужд. Рецензирование проводится конфиденциально. Нарушение конфиденциальности возможно только в случае заявления рецензента о недостоверности или фальсификации материалов, изложенных в статье.

2.6. К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в том же учреждении, где выполнена работа.

2.7. Если в рецензии на статью имеется указание на необходимость её исправления, то статья направляется автору на доработку. В этом случае датой поступления в редакцию считается дата возвращения доработанной статьи.

2.8. Статья, направленная автору на доработку, должна быть возвращена в исправленном виде в течение месяца. К переработанной рукописи необходимо приложить письмо от авторов, содержащее ответы на все замечания и поясняющее все изменения, сделанные в статье.

2.9. Если статья по рекомендации рецензента подверглась значительной ав-

торской переработке, она направляется на повторное рецензирование тому же рецензенту, который сделал критические замечания.

2.10. Редакция оставляет за собой право отклонения статей в случае неспособности или нежелания автора учесть пожелания редакции.

2.11. При наличии отрицательных рецензий на рукопись от двух разных рецензентов или одной рецензии на её доработанный вариант статья отвергается без рассмотрения другими членами редколлегии.

2.12. В случае несогласия с мнением рецензента автор статьи имеет право предоставить аргументированный ответ в редакцию журнала. Статья может быть направлена на повторное рецензирование либо на согласование в редакционную коллегию.

2.13. Решение о целесообразности публикации после рецензирования принимается главным редактором, а при необходимости – редколлекцией в целом.

2.14. Ответственный секретарь доводит до сведения автора принятое решение. Максимальный срок рецензирования между датами поступления рукописи в редакцию и вынесения редколлекцией решения составляет два месяца.

2.15. Правила, предъявляемые к рецензиям на научную статью

Задача рецензирования – способствовать строгому отбору авторских рукописей для издания и предлагать конкретные рекомендации по их улучшению. Рецензия должна объективно оценивать научную статью и содержать всесторонний анализ её научных и методических достоинств и недостатков. Рекомендуемый объем рецензий – до 15 тыс. знаков

(с пробелами), примерно до 1,5 страниц текста формата А4 12 кеглем.

2.16. Требования к содержанию рецензии на научную статью

Рецензент должен:

- определить соответствие материала, изложенного в статье, профилю журнала;

- оценить актуальность содержания статьи: соответствует ли уровень изложенного в ней материала современным достижениям науки и техники;

- оценить значимость полученных результатов исследований (научных, практических);

- указать, насколько учтены требования к оформлению материала статьи: соответствие объёма статьи, наличие аннотации на русском и английском языках, наличие списка литературы и ссылок на него в тексте, контактной информации об авторах и др.;

- дать качественную и/или количественную оценку приведённого в статье материала (фактического, иллюстрационного);

- оценить полноту и достоверность приводимых сведений;

- оценить правильность и точность используемых (или вводимых) определений и формулировок;

- дать оценку литературного стиля изложения материала;

- дать обоснованные выводы о статье в целом, замечания, при необходимости – рекомендации по её улучшению.

Комплекс перечисленных вопросов носит общий характер. Каждая конкретная статья требует индивидуального подхода к выбору критериев её оценки.

В заключительной части рецензии по результатам анализа статьи должна быть дана чёткая рекомендация об её публикации в представленном виде, либо о необходимости её доработки или переработки (с конструктивными замечаниями), а может быть, и о нецелесообразности её издания в данном журнале.

2.17. Редакция издания направляет авторам представленных материалов копии рецензий или мотивированный отказ, а также обязуется направлять копии рецензий в Министерство образования и науки РФ при поступлении соответствующего запроса.

2.18. Оригиналы рецензий хранятся в издательстве и редакционной коллегии в течение пяти лет со дня публикации статей.

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 РАН, Министерства здравоохранения РФ, 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

