

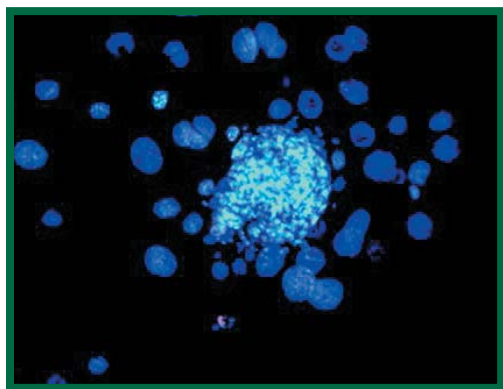
MEDICINE
ISSN 2074-5982

2017

2

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

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

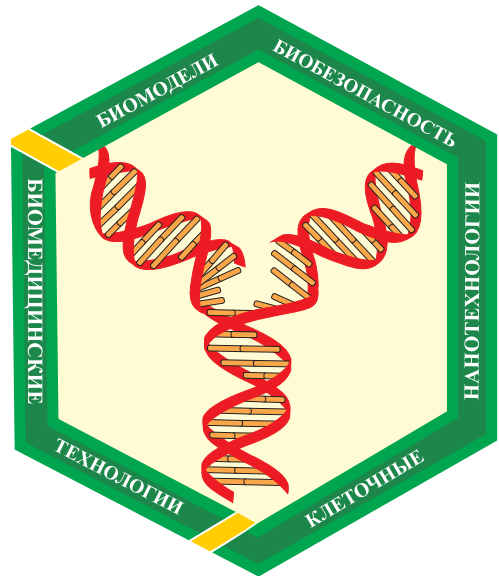
Научный журнал.

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 2017 года)



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор академик **Н.Н. Каркищенко**

Зам. гл. редактора **В.Н. Каркищенко**

Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

Г.Д. Капаназде, Светлые горы МО, **С.Л. Люблинский**, Обнинск, Калужская область, **Ю.С. Макляков**, Ростов-на-Дону, **Е.Л. Матвеев**, Светлые горы МО, **С.Ю. Пчелинцев**, Любучаны МО, **Г.В. Раменская**, Москва, **А.О. Ревякин**, Светлые горы МО, **В.П. Рябых**, Боровск МО, **Х.Х. Семенов**, Светлые горы МО, **Д.А. Сычев**, Москва, **Ю.В. Фокин**, Светлые горы МО, **Д.Б. Чайванов**, Москва, **Е.В. Ших**, Москва, **Е.Б. Шустов**, Светлые горы МО

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

К.В. Анохин, Москва, **Е.Е. Ачкасов**, Москва, **В.М. Баранов**, Москва, **И.А. Берзин**, Москва, **А.Т. Быков**, Сочи, **В. Влахов**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск, **А.М. Дыгай**, Томск, **А.Л. Зефирин**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан, **В.Г. Кукес**, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **А.И. Мирошников**, Пушкино МО, **А.Н. Мурашѐв**, Пушкино, МО, **С.В. Оковитый**, 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 22.06.2017
Тираж 3 000 экз.

Содержание

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Д.Г. Иванов, Н.В. Александровская, Е.А. Афонькина, П.В. Ерочкин, А.Н. Семенов, Д.В. Бусыгин
Адаптационные изменения у крыс при ежедневном выполнении физической нагрузки в методике «Бег на тредбане»4

С.В. Коржикова, Е.В. Фролов, З.А. Тепляшин, В.Н. Воловенко, А.С. Тепляшин
Перспективы клинического применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для регенерации хрящевой гиалиновой ткани23

Л.М. Межевикина, Е.А. Храмова, Е.Е. Фесенко
Выживаемость NGF-модифицированных эмбриональных стволовых клеток мышцы в составе многоклеточной бластоцисты33

С.А. Шахмарданова, П.А. Галенко-Ярошевский, Ф.Б. Литвин, В.В. Тарасов, М.Л. Максимов, С.С. Сологова
Механизм антигипоксического действия нового металлокомплекса железа – производного винилимидазола45

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Л.В. Крепкова, Е.Б. Шустов
Сравнительная характеристика доклинических параметров безопасности и эффективности препаратов эхинацеи пурпурной53

В.В. Новикова, В.Л. Гейн, О.В. Бобровская
Изучение антимикотической активности перспективных соединений ряда серебряных солей пирролопиразолов66

Content

BIOMEDICAL METHODS

D.G. Ivanov, N.V. Alexandrovskaya, E.A. Afonkina, P.V. Eroshkin, A.N. Semenov, D.V. Busiigin
Adaptive changes in rats under everyday physical load in «The run on treadmill» method4

S.V. Korzhikova, E.V. Frolov, Z.A. Teplyashin, V.N. Volovenko, A.S. Teplyashin
Prospects of clinical application of multipotent mesenchymal stromal cells for regeneration of hyaline cartilaginous tissue23

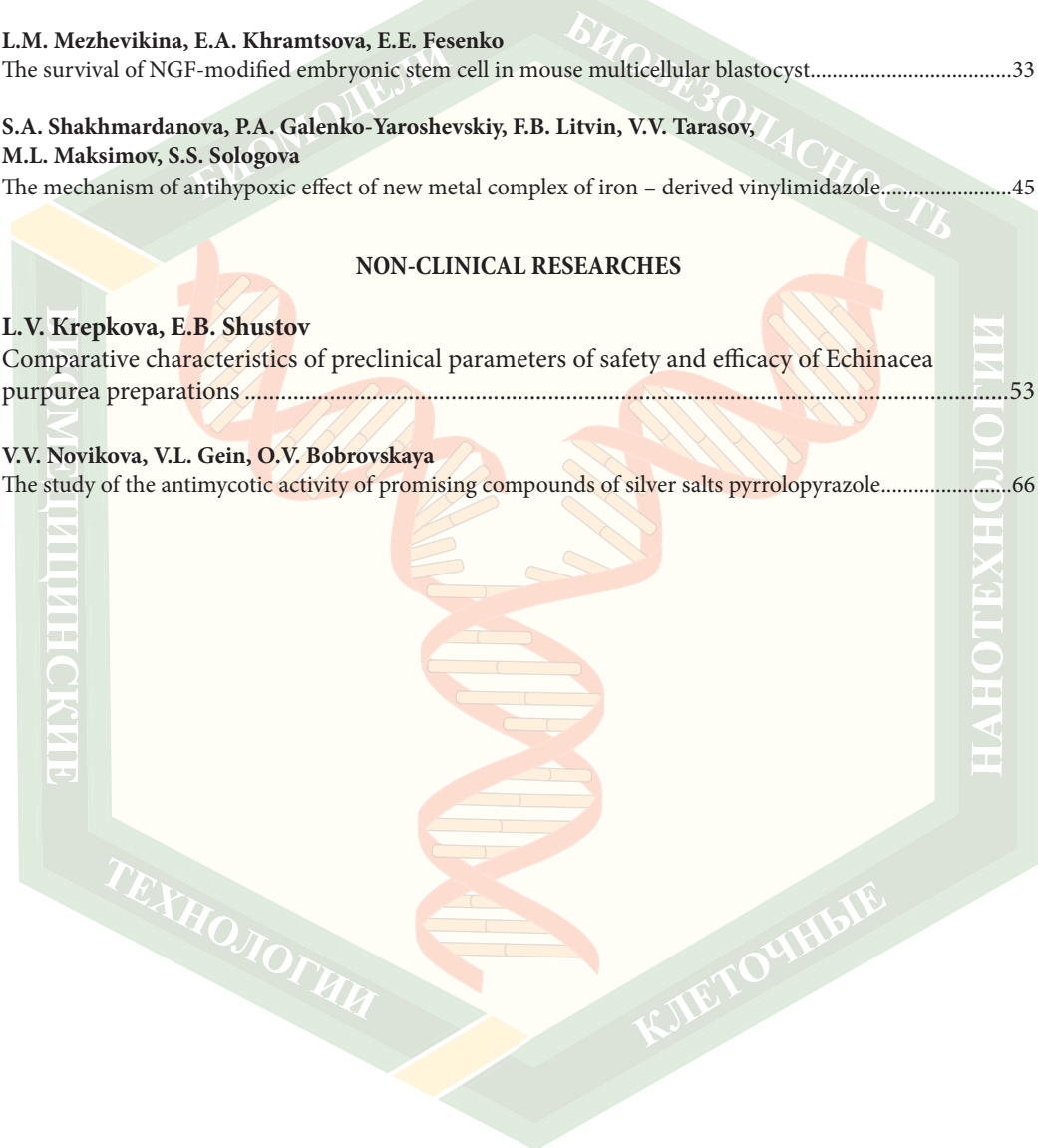
L.M. Mezhevikina, E.A. Khramtsova, E.E. Fesenko
The survival of NGF-modified embryonic stem cell in mouse multicellular blastocyst33

S.A. Shakhmardanova, P.A. Galenko-Yaroshevskiy, F.B. Litvin, V.V. Tarasov, M.L. Maksimov, S.S. Sologova
The mechanism of antihypoxic effect of new metal complex of iron – derived vinylimidazole45

NON-CLINICAL RESEARCHES

L.V. Krepkova, E.B. Shustov
Comparative characteristics of preclinical parameters of safety and efficacy of Echinacea purpurea preparations53

V.V. Novikova, V.L. Gein, O.V. Bobrovskaya
The study of the antimycotic activity of promising compounds of silver salts pyrrolopyrazole66





Адаптационные изменения у крыс при ежедневном выполнении физической нагрузки в методике «Бег на тредбане»

Д.Г. Иванов, Н.В. Александровская, Е.А. Афонькина, П.В. Ерошкин, А.Н. Семенов, Д.В. Бусыгин

ФГУП «НЦ «Сигнал», Москва

Контактная информация: Иванов Дмитрий Геннадьевич, dg1983@myrambler.ru

Изучались адаптационные изменения у крыс при ежедневном выполнении в течение четырех недель тренировочной (бег на тредбане 20 мин со скоростью 15 м/мин и углом подъема 15° 4 дня в неделю) и тестовой (бег до отказа с ускорением 0,6 м/мин², начальной скоростью 12 м/мин и углом подъема 15° 1 день в неделю) физических нагрузок. По результатам определения динамики уровня глюкозы и лактата в крови тестовая нагрузка соответствовала нагрузкам аэробной околомаксимальной зоны мощности, тренировочная – нагрузкам аэробной средней или низкой зон мощности. Адаптация к нагрузке в виде увеличения длительности бега до отказа была связана с гипертрофией мышц, увеличением числа эритроцитов в крови, уменьшением среднего объема эритроцита и ширины распределения эритроцитов по объему, снижением числа тромбоцитов, уменьшением числа сердечных сокращений и систолического давления. Физическая нагрузка не приводила к увеличению глюколотерантности, изменению уровня глюкозы в крови, содержания гликогена в мышце, не влияла на массу эпидидимального жира у крыс. Состояния утомления, анализируемого по массе левого надпочечника, тимуса и селезенки, уровню кортизола и мочевины в крови, активности аминотрансфераз и содержанию белка в печени, содержанию белка, молочной кислоты в мышцах, у крыс при выполнении физической нагрузки обнаружено не было.

Ключевые слова: крыса, тредбан, адаптация, физическая работоспособность.

Введение

Физическая работоспособность является интегральной характеристикой физиологического состояния, здоровья и благополучия человека. Поэтому при решении различных научных задач часто возникает необходимость моделировать многократные физические нагрузки человека на мелких лабораторных животных. Для этого в эксперименте широко применяются тредбаны.

Результаты, получаемые на моделях бега животных с использованием тредбанов, хорошо экстраполируются на человека в силу высокой гомологичности механизмов, обеспечивающих бег у человека и лабораторных животных. У человека [19] и грызунов [21] длительность выполнения бега имеет гиперболическую зависимость от скорости. Такая зависимость определяется тем, что до достижения определённого значения

скорости, называемого критической скоростью (КС), бег может выполняться человеком и животными неограниченно долго. Энергетически такая нагрузка обеспечивается за счёт аденозинтрифосфата (АТФ), получающегося в основном в результате аэробного окисления глюкозы. При этом уровень лактата, как меры анаэробного метаболизма глюкозы, у человека [7] и животных [21] в среднем не повышается до 4 ммоль/л, уровень потребления кислорода не превышает 79-80% от максимального потребления кислорода (VO_{2max}) [11, 18, 19]. При беге с критической скоростью у человека и мелких лабораторных животных регистрируется состояние, когда достигается максимально возможный уровень лактата в крови в результате равновесия процессов его поступления в кровь и захвата из крови [18, 21], которое определяется как максимальное устойчивое состояние по лактату (МУСЛ). В среднем, МУСЛ у человека и животных примерно равно 4 ммоль/л [15, 20] и соответствует уровню потребления кислорода 79-80% от VO_{2max} [11, 18, 19]. Бег со скоростью выше КС резко усиливает аэробное окисление глюкозы, что внешне проявляется в возрастании потребления кислорода у человека и животных [9, 19], а также запускает механизмы ресинтеза АТФ в результате анаэробного метаболизма глюкозы, сопровождающиеся образованием лактата. Это ведёт к быстрому накоплению лактата в крови и развитию утомления [18, 21]. КС и МУСЛ являются мерой аэробной работоспособности человека и животных [19, 21]. Это позволяет разделить физические нагрузки на низко- и высокоинтенсивные, адаптация к которым сопровождается разными биохими-

ческими и физиологическими сдвигами в организме. У человека [11] и животных [16] адаптация к нагрузкам разной интенсивности протекает схожим образом.

Некоторые авторы используют более детальную классификацию физических упражнений человека, выделяя 5 зон мощности аэробной нагрузки [5]. Нагрузки длительностью 3-10 мин, обеспечиваемые аэробной системой на 20-40%, относятся к зоне максимальной аэробной мощности. Потребление кислорода при выполнении таких нагрузок составляет 95-100% от VO_{2max} . Нагрузки длительностью 10-30 мин соответствуют зоне околосредней аэробной мощности (85-90% от VO_{2max}), вклад аэробной системы в их выполнение составляет 70-80%. Нагрузки длительностью 30-120 мин, обеспечиваемые аэробной системой на 95%, соответствуют зоне субмаксимальной аэробной мощности (70-80% от VO_{2max}). Нагрузки предельной длительности и мощности (120-240 мин, до 58 кДж/мин) принадлежат зоне средней аэробной мощности (55-65% от VO_{2max}), вклад аэробной системы в их энергообеспечение составляет 98%. К зоне малой аэробной мощности (<50% от VO_{2max}) относятся нагрузки длительностью более 240 мин, обеспечиваемые на 100% за счёт аэробной системы. При этом адаптационные изменения к аэробным нагрузкам различных зон мощности также являются специфичными [5].

Процесс моделирования предполагает установление соответствия между моделью и прототипом [2]. В случае моделирования физических нагрузок для валидации каждой конкретной лабораторной модели необходимо опреде-

лить тип нагрузки у животных, изучить адаптационные изменения показателей, характеризующих состояние органов и систем организма животных при выполнении этой физической нагрузки, а также установить эффект тренировок на способность выполнять нагрузку. Это позволяет судить о характере нагрузки и конструктивной валидности методики, расширяет возможность экстраполяции данных с животных на человека.

Вместе с этим регулярные физические нагрузки в виде бега до отказа могут стрессировать животных [23], вызывать повышение катаболизма белка в мышцах и повреждение мышечных волокон [27] и, в целом, приводить к состоянию хронического утомления, что также требуется учитывать при моделировании физических нагрузок в эксперименте.

Целью данной работы было проанализировать тип тестовой нагрузки, а также адаптационные изменения и степень утомления у крыс в ходе выполнения ежедневных физических нагрузок 5 дней в неделю в течение 4-х недель в методике «Бег на тредбане», используемой нами для моделирования работоспособности человека в эксперименте на животных.

Материалы и методы

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200-300 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали приказу Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей

лабораторной практики». Животные содержались по 6 особей в клетках Eurostandart type IV S (Tecniplast, Италия) при температуре воздуха 20-22°C, относительной влажности 40-60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8⁰⁰, потребляли корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм», Россия) и воду при свободном доступе. Депривация корма осуществлялась за 2 ч до физических нагрузок и за 12 ч до теста глюкозолептантности или выведения из эксперимента.

Экспериментальное исследование проводили в пяти сериях. Физическая нагрузка, выполняемая животными, во всех сериях была одинаковой.

Методику «Бег на тредбане» выполняли с использованием тредбана для крыс «Exer 3/6 Open Treadmill» (Columbus Instruments, США). Перед началом исследования крыс обучали бегу на тредбане: ежедневно в течение 4-х дней проводили ознакомительные тренировки бега со скоростью 12 м/мин в течение 10-ти мин.

После окончания курса ознакомительных тренировок проводили фоновое тестирование (далее – фон) работоспособности животных, формировали группы и начинали эксперимент. Физическую работоспособность животных определяли один раз в неделю, с 9⁰⁰ до 12⁰⁰. При этом первые 3 мин животное бежало со скоростью 12 м/мин, затем включали ускорение движения ленты 0,6 м/мин². При появлении признаков утомления животных, выражавшихся в неспособности поддерживать равномерный бег на тредбане (бег 7 сек вниз дорожки и/или 10 подряд неудачных попыток возобновить бег после падения на электроды, находящиеся под напря-

жением), электроды отключали. После этого наблюдали бег животного до отказа, т.е. до посадки на выключенные электроды. Длительность бега до появления признаков утомления и до отказа регистрировали секундомером с точностью 1 с.

Работоспособность животных тестировали 5 раз: в фоне, на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки эксперимента. 4 дня в неделю в нетестовые дни ежедневно с 9⁰⁰ до 12⁰⁰ животные подвергались тренировочным нагрузкам в виде бега в течение 20 мин со скоростью 15 м/мин. В течение всего эксперимента угол подъёма ленты относительно плоскости земли был равным 15°.

В первой серии исследовали динамику уровня глюкозы и лактата в крови крыс при однократном выполнении животными тестовой нагрузки. Для этого 12 животных, обученных бегу на тредбане, делили на 3 группы по 4 особи в каждой. Перед началом бега у всех животных из хвостовой вены капилляром отбирали 10 мкл крови для анализа базального уровня глюкозы и лактата (точка T0). После этого животных подвергали тестовой нагрузке на тредбане. У одной группы крыс повторный забор крови для анализа глюкозы и лактата проводили через 3 мин нагрузки (точка T2) в момент включения ускорения, у второй группы крыс забор крови осуществляли в момент появления признаков утомления (точка T3), соответствующий отключению электродов, у третьей группы кровь отбирали сразу после посадки животного на выключенные электроды (точка T4). Эксперимент повторяли 3 раза через двое суток, которые отводили для восстановления животных, при

этом время забора крови до нагрузки оставляли неизменным, а время повторного забора крови у животных в группах меняли по методу латинского квадрата. Уровень глюкозы и лактата определяли электрохимическим методом на аппарате «Dr. Meller» (Германия) с использованием реагентов «DiaSys» (Германия).

Во второй серии изучали влияние физической нагрузки на массу тела животных, систолическое (СД), диастолическое кровяное давление (ДД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС). Для этого животных делили на 2 группы по 12 животных: «сидячую» и «тренирующуюся». Крысы тренирующейся группы подвергались физической нагрузке, как описано выше. У крыс обеих групп ежедневно определяли массу тела с точностью до 1 г. Перед тренировкой животных на 9-е, 16-е, 23-и и 29-е сутки у 6-ти крыс в каждой группе измеряли СД и ДД (в мм.рт.ст.) и ЧСС (в уд/мин) фотоплетизмографическим методом [20], как среднее по результатам 10-ти измерений. Температура подогрева держателя составляла 30°C.

В третьей серии исследовали влияние физической нагрузки на относительную массу органов, гематологические и биохимические показатели, характеризующие состояние углеводного обмена и степени утомления. Животные были разделены на сидячую (n=29) и тренирующуюся группы (n=36). Крысы тренирующейся группы подвергались физической нагрузке, как описано выше. Тренирующихся животных выводили из эксперимента декапитацией на следующий день после каждого тестирования, вместе с ними выводили часть «сидячих» крыс.

Для весового анализа органов у декапитированных животных забирали тимус, левый надпочечник, селезёнку, правую и левую трёхглавые мышцы голени, эпидидимальный жир с двух сторон.

Кровь для гематологического анализа отбирали в пластиковые пробирки фирмы «Vacuette» (Австралия) с напылением K_3 ЭДТА. Гематологические показатели крови анализировали не позже чем через 1 ч на ветеринарном гематологическом анализаторе «Exigo» (Bohle Medical, Швеция).

Для биохимического анализа кровь животных отбирали в пластиковые пробирки с активатором свертывания крови «Z Serum Clot Activator» (Vacuette, Австралия). Образцы крови выдерживали 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали в течение 15 мин при 2800 об/мин. Полученную сыворотку замораживали и хранили при -20°C до использования. В сыворотке крови иммунорадиоактивным методом анализировали уровень кортизола (набор «РИА-Кортизол-НБ», ЗАО «НуклидБиоМед», Россия) тироксина (набор «РИА-Т4 общий-НБ», ЗАО «НуклидБиоМед», Россия) и трийодтиронина (набор «РИА-Т3 общий-НБ», ЗАО «НуклидБиоМед», Россия), уровень глюкозы определяли так же как в первой серии, уровень мочевины определяли уреазным методом (набор «DiaSys», Германия).

Кусочки левой боковой доли печени для биохимического анализа измельчали на гомогенизаторе ИКА Т 18 Ultra-Turrax при скорости пестика 10000 об/мин в течение 15 с в 1 М фосфатном буфере рН 7,8 в отношении 1:10 (масса/объем) на льду. В гомогенатах печени анализировали активность аланин-аминотрансферазы (АЛТ) и ас-

парагин-аминотрансферазы (АСТ) кинетическим динитрофенилгидрозиновым методом (набор «DiaSys», Германия) и содержание белка биуретовым методом (набор «DiaSys», Германия).

Гомогенат правой трёхглавой мышцы голени готовили, измельчая орган в течение 60 с при тех же условиях, что и печень. В гомогенатах мышцы определяли содержание лактата, как описано выше. Содержание гликогена в мышце определяли по концентрации глюкозы, измеряемой, как описано выше, в нейтрализованных 1 н HCl растворах, полученных после щелочного гидролиза 30 мин в 4 н КОН [3]. Содержание белка в гомогенатах мышцы определяли биуретовым методом (набор «DiaSys», Германия).

В четвёртой серии изучали влияние физической нагрузки на глюколотерантность животных. Для этого животных делили на «сидячую» ($n=6$) и «тренирующуюся» ($n=6$) группы. Крысы тренирующейся группы подвергались физической нагрузке, как описано выше. На следующий день после тестирования работоспособности на 14-е сутки оценивали глюколотерантность животных. Крысам обеих групп, лишённым доступа к корму в течение 12 ч, внутрижелудочно вводили водный р-р глюкозы в дозе 3 г/кг в удельном объёме 7,5 мл/кг. До введения глюкозы (фон), через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после введения у животных из хвостовой вены капилляром отбирали 10 мкл крови для анализа уровня глюкозы. Уровень глюкозы в крови анализировали описанным выше способом. Результаты исследования представляли в виде индекса гипергликемии (ИГ), рассчитанным для каждой временной точки по формуле:

$$\text{ИГ} = \frac{C_T - C_\Phi}{C_\Phi} \times 100\% ,$$

где C_T – уровень глюкозы в крови в момент времени T , C_Φ – уровень глюкозы в крови в фоне.

Площадь под кривой ИГ рассчитывали методом трапеций.

В пятой серии изучали влияние физической нагрузки на среднюю площадь поперечного сечения волокна икроножной мышцы и процентное распределение волокон в икроножной мышце по площади поперечного сечения. Животных делили на «сидячую» ($n=15$) и «тренирующуюся» группы ($n=12$). Крысы тренирующейся группы подвергались физической нагрузке (см. описание выше). На следующий день после тестирования, на 22-е и на 29-е сутки, половину животных из каждой группы выводили из эксперимента декапитацией. У крыс забирали правую и левую икроножные мышцы. Из средней части медиальной головки каждой мышцы иссекали образец толщиной 5-6 мм, который фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и заливали в парафиновый блок. Срезы блоков толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «Видео-Тест-Морфология 5.2» (Россия). В каждом препарате определяли площадь поперечных срезов не менее 120-130 волокон. Рассчитывали среднюю площадь поперечного среза волокна икроножной мышцы обеих лап и частоту распределения мышечных волокон по размеру у каждого животного.

Результаты измерения показателей представлены в виде среднего ариф-

метического и стандартной ошибки среднего. В случае отличий дисперсий показателей в группах по критерию Ливена множественные сравнения средних проводили по критерию Манна-Уитни с корректировкой по методу FDR-контроля [1]. Среднюю длительность бега до отказа и выполненную работу на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки эксперимента сравнивали с фоном с помощью критерия Т-Вилкоксона с корректировкой по методу FDR-контроля. Критические значения, соответствующие 5% уровню значимости при проведении процедуры FDR-контроля, указывали в нижнем индексе к «р». Отличия считали статистически значимыми, если полученное значение «р» было меньше своего критического значения. При отсутствии отличия дисперсии множественные сравнения средних значений показателей сидячей и тренирующейся групп проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим сравнением по методу Бонферрони. Для сравнения средних значений длительности бега, СД, ДД и ЧСС у животных сидячей и тренирующейся групп использовали критерий Манна-Уитни. Влияние сроков эксперимента и физической нагрузки на значения СД, ДД и ЧСС анализировали методом двухфакторного дисперсионного анализа. Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

По результатам исследований при выполнении однократной тестовой нагрузки длительность бега до появления признаков утомления у крыс и отключения электродов (точка T2) была рав-

на $23,7 \pm 5,4$ мин и не отличалась от длительности бега до посадки животного на электроды (точка Т3) – $26,7 \pm 5,9$ мин ($p=0,184$). Тестовая нагрузка повышала уровень лактата в крови животных (рис. 1) через 3 мин бега с постоянной скоростью 12 м/мин (точка Т1), а также в точках Т2 и Т3 ($p<0,001$ для каждого сравнения) относительно значения показателя до начала бега (точка Т0). Уровень лактата в крови крыс в точках Т1, Т2 и Т3 статистически значимо не отличался. Уровень глюкозы в крови крыс в точках Т1 ($p_{0,033}=0,007$), Т2 и Т3 ($p<0,001$ для каждого сравнения) был больше, чем в точке Т0. В точке Т2 уровень глюкозы был больше, чем в точке Т1, через 3 мин бега ($p_{0,025}=0,004$), хотя отличия уровня глюкозы в крови крыс в точках Т1 и Т3, а также Т2 и Т3 не обнаружено.

При повторных тестированиях работоспособности тренирующихся крыс

в течение 1 мес. длительность бега до отказа (далее – длительность бега) крыс превышала фоновое значение на 14-е ($p_{0,010}=0,005$), 21-е ($p_{0,005}=0,003$) и 28-е ($p_{0,015}=0,007$) сутки, но не отличалась от фона на 7-е сутки эксперимента. Средние значения длительности бега животных на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки эксперимента статистически значимо не отличались (рис. 2).

Масса тела животных сидячей и тренирующейся групп не отличалась статистически значимо во все дни эксперимента, т.е. выбранный режим тренировок и тестовых нагрузок не влиял на прирост массы тела крыс.

Значения СД, ДД и ЧСС у животных, подвергавшихся физическим нагрузкам, на 9-е, 16-е, 23-и и 29-е сутки эксперимента не отличались от значений показателей у «сидячих» животных при сравнении по критерию Манна-Уитни. Результаты двухфакторного

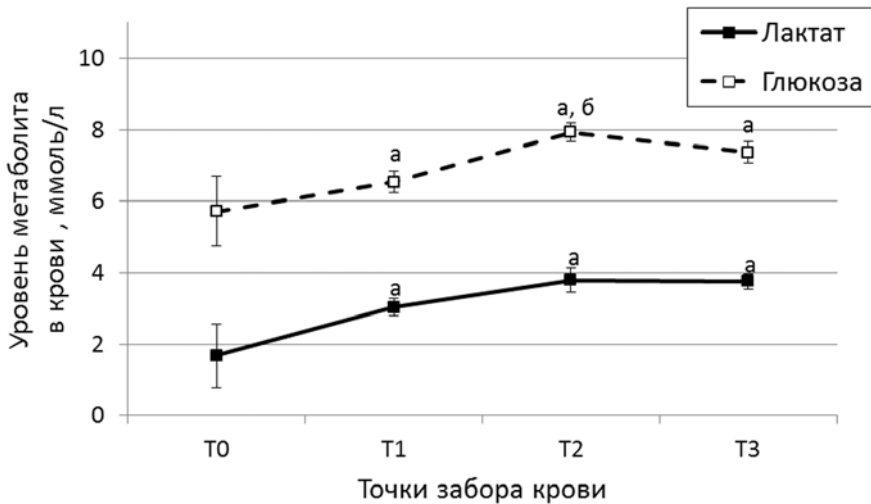


Рис. 1. Изменение уровня глюкозы и лактата в крови крыс при выполнении однократной тестовой нагрузки в методике «Бег на тредбане».

Примечание: а – отличие от точки Т0 статистически значимо при $p<0,05$; б – отличие от точки Т1 статистически значимо при $p<0,05$.

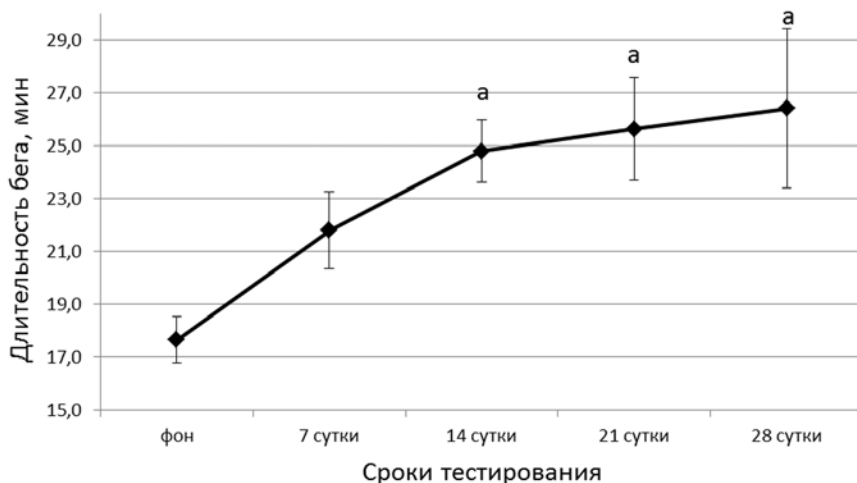


Рис. 2. Изменение длительности бега крыс, подвергавшихся физическим нагрузкам в методике «Бег на тредбане» в течение 28 суток.

Примечание: а – отличие от фона статистически значительно при $p < 0,05$.

дисперсионного анализа (тренировка \times сроки эксперимента по схеме 2×4) обнаружили меньшее СД у животных тренирующейся группы по сравнению с «сидячими» крысами в течение эксперимента ($125,8 \pm 7,7$ мм.рт.ст. ($n=24$) против $132,2 \pm 13,1$ мм.рт.ст. ($n=24$), $p=0,046$), при отсутствии разницы дисперсий по критерию Ливена ($p=0,159$). Сроки эксперимента, а также взаимодействие тренировки и сроков эксперимента не оказывали статистически значимого влияния на значение СД у крыс. Значения ДД у крыс не зависели от тренировки, сроков эксперимента и взаимодействия этих факторов. Значения дисперсий ЧСС в экспериментальных группах отличались ($p=0,028$), поэтому из выборки исключали одно максимальное и одно минимальное значения. Результаты дисперсионного анализа обнаружили меньшее ЧСС у животных тренирующейся группы по

сравнению с «сидячими» крысами в течение эксперимента ($354,0 \pm 23,8$ уд/мин ($n=23$) против $367,0 \pm 19,8$ уд/мин ($n=23$), $p=0,043$), при отсутствии разницы дисперсий по критерию Ливена ($p=0,055$). Также с увеличением сроков эксперимента наблюдалось снижение ЧСС у всех крыс ($p=0,031$), хотя взаимодействие тренировки и сроков эксперимента не было статистически значимым.

Исследования изменений массы левого надпочечника, тимуса, селезенки и эпидидимального жира у крыс, подвергавшихся физическим нагрузкам в методике «Бег на тредбане», обнаружили только уменьшение массы тимуса у тренирующихся крыс на 22-е сутки на 35,8% ($p=0,008$) по сравнению с «сидячими» животными (табл. 1). В остальные сроки эксперимента масса органов «тренирующихся» и «сидячих» животных не отличалась.

Масса органов «сидячих» крыс и животных, подвергающихся беговым нагрузкам в методике «Бег на тредбане»

Показатель	Сидячие	Тренирующиеся			
		8 суток	15 суток	22 суток	29 суток
Левый надпочечник, г	0,023±0,002 n=30	0,025±0,005 n=9	0,025±0,003 n=9	0,023±0,001 n=8	0,023±0,004 n=9
Селезёнка, г	0,99±0,056 n=30	0,955±0,072 n=9	1,025±0,07 n=9	0,78±0,048 n=9	0,85±0,027 n=9
Тимус, г	0,53±0,03 n=31	0,51±0,05 n=9	0,44±0,03 n=9	0,34±0,03 ^а n=9	0,40±0,02 n=9
Эпидидимальный жир, г	4,37±0,28 n=31	3,42±0,31 n=9	3,62±0,21 n=9	3,76±0,3 n=9	4,6±0,18 n=9
Правая трёхглавая мышца голени, г	1,27±0,035 n=31	1,15±0,046 n=9	1,287±0,028 n=9	1,32±0,052 n=9	1,53±0,04 ^{а,б,в} n=9
Левая трёхглавая мышца голени, г	1,29±0,03 n=31	1,183±0,038 n=9	1,33±0,03 n=9	1,31±0,077 n=9	1,52±0,047 ^{а,б} n=9

*Примечания:*а – отличие от «сидячих» животных статистически значимо, $p \leq 0,05$;б – отличие от крыс, тренирующихся 8 суток, статистически значимо, $p \leq 0,05$;в – отличие от крыс, тренирующихся 15 суток, статистически значимо, $p \leq 0,05$.

Масса правой трехглавой мышцы голени тренирующихся животных (табл. 1) на 29-е сутки была больше таковой у «сидячих» крыс (+20,5%, $p=0,001$), а также у тренирующихся животных на 8-е (+33,0%, $p=0,001$) и 15-е (+18,6%, $p=0,026$) сутки, но не отличалась от значения показателя у тренирующихся животных на 22-е сутки. Аналогично, масса левой трехглавой мышцы голени тренирующихся животных на 29-е сутки исследования была больше таковой у «сидячих» крыс (+17,8 %, $p=0,007$) и тренирующихся животных на 8-е сутки эксперимента (+28,8%, $p=0,001$). На 8-е, 15-е и 22-е сутки эксперимента массы правой и левой трёхглавых мышц голени тренирующихся животных не отличались от значений показателей у «сидячих» крыс, а также в группе тренирующихся животных.

На 22-е и 29-е сутки эксперимента число эритроцитов в крови животных, подвергавшихся физическим нагрузкам, было больше на 5,2% ($p_{0,020}=0,012$) и 5,7% ($p_{0,010}=0,002$) соответственно, чем у «сидячих» крыс (табл. 2), а также на 9,6% ($p_{0,015}=0,004$) и на 10,2% ($p_{0,005}=0,002$) превышало значения аналогичного показателя тренирующихся животных на 8-е сутки. Средний объём эритроцитов у тренирующихся животных на 8-е сутки превышал таковой у «сидячих» крыс на 4,1% ($p=0,033$). Вместе с тем у тренирующихся крыс на 29-е сутки средний объёма эритроцитов был меньше, чем на 15-е (-4,7%, $p=0,001$) и 22-е (-3,9%, $p=0,037$) сутки. Отличий среднего объёма эритроцитов у «сидячих» и «тренирующихся» крыс на 15-е, 22-е и 29-е сутки при сравнении попарно обнаружено не было. Ширина

Таблица 2

Гематологические показатели «сидячих» крыс и животных, подвергающихся беговым нагрузкам в методике «Бег на тредбане»

Показатель	Сидячие	Тренирующиеся			
		8 суток	15 суток	22 суток	29 суток
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,36±0,07 n=27	7,06±0,16 n=8	7,33±0,15 n=9	7,74±0,10 ^{а,б} n=9	7,78±0,05 ^{а,б} n=8
Средний объем эритроцита, фл	48,68±0,27 n=30	50,68±0,35 ^а n=8	49,53±0,61 n=9	49,09±0,69 n=9	47,20±0,63 ^{б,в} n=9
Ширина распределения эритроцитов, %	21,31±0,17 n=29	21,39±0,32 n=8	21,2±0,26 n=9	21,36±0,39 n=9	20,1±0,3 ^а n=9
Гематокрит, %	36,33±0,43 n=30	35,80±0,81 n=8	36,24±0,65 n=9	38,19±0,64 n=9	37,01±0,50 n=9
Гемоглобин, г/л	142,90±1,45 n=29	140,75±2,76 n=8	141,78±2,54 n=9	150,22±2,53 n=9	145,78±1,41 n=9
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	19,19±0,09 n=29	19,95±0,18 ^а n=8	19,4±0,23 n=9	19,3±0,25 n=9	18,6±0,18 ^{б,в} n=9
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л	392,76±1,17 n=29	394,00±1,55 n=8	391,89±1,92 n=9	393,33±0,33 n=6	394,44±3,11 n=9
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	415,9±10,5 n=27	384,6±21,9 n=8	411,4±27,9 n=9	483,0±36,3 n=8	310,8±17,5 ^{а,в,г} n=8
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	9,93±0,54 n=31	8,06±0,99 n=8	11,4±1,1 n=9	8,97±0,97 n=9	10,7±1,15 n=9
Лимфоциты, %	74,05±0,75 n=28	69,19±2,16 n=8	72,99±0,23 n=9	74,09±1,24 n=9	67,38±3,55 n=9
Гранулоциты, %	22,14±0,75 n=29	26,05±1,64 n=8	22,54±1,19 n=9	20,24±0,73 n=8	27,76±3,20 n=9
Клетки средней популяции, %	4,21±0,32 n=31	4,76±0,8 n=8	4,06±0,39 n=8	4,77±0,77 n=9	4,87±0,74 n=9

Примечания:

а – отличие от «сидячих» животных статистически значимо, $p \leq 0,05$;

б – отличие от крыс, тренирующихся 8 суток, статистически значимо, $p \leq 0,05$;

в – отличие от крыс, тренирующихся 15 суток, статистически значимо, $p \leq 0,05$;

г – отличие от крыс, тренирующихся 22 суток, статистически значимо, $p \leq 0,05$.

распределения эритроцитов по объёму у тренирующихся животных была меньше по сравнению с «сидячими» крысами только на 29-е сутки (-5,7%, $p=0,012$). Гематокрит и гемоглобин у тренирующихся животных не отличались от сопоставимых показателей у «сидячих» крыс во все дни эксперимента, а также у тренирующихся животных при сравнении друг с другом попарно. Среднее содержание гемоглобина в эритроците у тренирующихся животных только на 8-е сутки было больше, чем у «сидячих» крыс (+4,0%, $p=0,011$), средняя концентрация гемоглобина в эритроците не отличалась. Отличий обоих показателей у тренирующихся крыс при сравнении попарно в различные дни эксперимента не наблюдалось за исключением среднего содержания гемоглобина в эритроците у тренирующихся животных на 29-е сутки, которое было меньше, чем на 8-е (-6,8%, $p<0,001$) и 15-е (4,1%, $p=0,038$) сутки.

На 29-е сутки у тренирующихся животных зарегистрировано меньшее число тромбоцитов, чем у «сидячих» крыс (-25,3%, $p=0,003$). Также число тромбоцитов у тренирующихся животных было меньше на 29-е сутки, чем на 15-е (-24,5%, $p=0,033$) и 22-е (-35,7%, $p\leq 0,001$) сутки.

Значения числа лейкоцитов, а также процентного содержания лимфоцитов, гранулоцитов и клеток средней популяции в крови тренирующихся и «сидячих» животных ни в один из дней эксперимента не отличались друг от друга.

Статистически значимых отличий уровней тироксина и трийодтиронина в крови «сидячих» ($51,3\pm 13,4$ нмоль/л и $1,9\pm 0,4$ нмоль/л, $n=15$ соответственно) и тренирующихся животных на 8-е

($61,9\pm 26,4$ нмоль/л и $2,3\pm 0,4$ нмоль/л, $n=6$), 15-е ($38,4\pm 8,1$ нмоль/л и $1,5\pm 0,2$ нмоль/л, $n=3$), 22-е ($55,6\pm 19,3$ нмоль/л и $1,9\pm 0,4$ нмоль/л, $n=3$) и 29-е ($78,5\pm 55,4$ нмоль/л и $2,1\pm 0,7$ нмоль/л, $n=3$) сутки обнаружено не было.

На 15-е сутки у тренирующихся крыс наблюдалось больше кортизола в крови ($59,57\pm 6,30$ нмоль/л, $n=3$), чем у «сидячих» ($34,81\pm 1,80$ нмоль/л, $n=15$, $p<0,001$), а также у тренирующихся крыс на 8-е ($36,62\pm 1,61$ нмоль/л, $n=6$, $p=0,001$), 22-е ($30,90\pm 3,86$ нмоль/л, $n=3$, $p<0,001$) и 29-е ($29,33\pm 3,32$ нмоль/л, $n=3$, $p<0,001$) сутки. Отличия уровня кортизола в крови тренирующихся животных на 8-е, 22-е, 29-е сутки эксперимента и «сидячих» крыс при сравнении друг с другом не обнаружено.

На 15-е сутки эксперимента у «сидячих» животных уровень глюкозы ($4,48\pm 0,10$ ммоль/л, $n=6$) и лактата ($1,53\pm 0,18$ ммоль/л, $n=6$) в крови не отличался от тренирующихся крыс (глюкоза: $4,50\pm 0,29$ ммоль/л, $n=6$; лактат: $1,60\pm 0,08$ ммоль/л, $n=4$). В тесте толерантности значения ИГ у «сидячих» и тренирующихся 14 суток крыс не отличались статистически значимо через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после внутрижелудочного введения глюкозы. Площадь под кривой ИГ у «сидячих» крыс составила $6173,9\pm 679,2$ ммоль/л*мин ($n=6$) и не отличалась от таковой у тренирующихся крыс – $7760,6\pm 1409,3$ ммоль/л*мин ($n=6$). Корреляционный анализ методом Спирмена не выявил взаимосвязи между площадью под кривой ИГ и длительностью бега или выполненной работой у тренирующихся в течение 14 суток крыс.

Средние значения уровня глюкозы в сыворотке «сидячих» крыс

(5,32±0,19 ммоль/л, n=25) и тренирующихся животных на 8-е (5,19±0,31 ммоль/л, n=9), 15-е (5,24±0,22 ммоль/л, n=6), 22-е (4,82±0,36 ммоль/л, n=6) и 29-е (5,32±0,33 ммоль/л, n=6) сутки не отличались. Также не было обнаружено отличий содержания гликогена в трёхглавой мышце «сидячих» животных (3,14±0,37 мг/г, n=23) и тренирующихся крыс на 8-е (3,70±0,77 мг/г, n=9), 15-е (5,14±1,25 мг/г, n=6), 22-е (3,49±0,82 мг/г, n=6) и 29-е (3,90±0,16 мг/г, n=6) сутки, т.е. выполнение физической нагрузки не влияло на уровень глюкозы в крови, активность всасывания глюкозы мышцей и накопления гликогена в мышце животных.

Содержание белка в печени и мышце, уровень мочевины в крови «сидячих» и тренирующихся животных на 8-е, 15-е, 22-е и 29-е сутки не отличались (табл. 3). Таким образом, ежедневные физические нагрузки не влияли на содержание белка в печени и мышце, не усиливали катаболизм белка.

Активность АЛТ и АСТ в печени у «сидячих» и «тренирующихся» животных (табл. 3) на 8-е, 15-е, 22-е и 29-е сутки не отличалась. Активность АСТ в мышце тренирующихся животных на 8-е сутки была меньше, чем у «сидячих» крыс, в 5,7 раза (p<0,001), и чем у тренирующихся животных на 15-е (в 6,3 раза, p<0,001), 22-е (в 4,3 раза, p=0,046) и 29-е (в 5,9 раза, p<0,001) сутки. Это свиде-

Таблица 3

Показатели белкового обмена, активность аминотрансфераз и уровень лактата в мышце у «сидячих» крыс и животных, подвергающихся физическим нагрузкам в методике «Бег на тредбане»

Показатель	Сидячие	Тренирующиеся			
		8 суток	15 суток	22 суток	29 суток
АЛТ в печени, Ед./г бел.	320,25±16,7 n=31	324,78±39,6 n=9	306,63±23,39 n=9	324,54±33,15 n=9	341,91±46,87 n=9
АСТ в печени, Ед./г бел.	504,03±39,39 n=31	510,68±35,79 n=9	597,17±60,58 n=9	440,51±58,66 n=9	427,17±20,8 n=9
Белок в печени, г/л	35,94±0,95 n=31	36,44±0,78 n=9	35,11±1,81 n=9	37,33±2,07 n=9	38,78±1,12 n=9
АСТ в мышце, Ед./г бел.	1,49±0,12 n=14	0,26±0,11 ^а n=7	1,65±0,23 ^б n=7	1,00±0,12 ^б n=9	1,53±0,25 ^б n=7
Белок в мышце, г/л	12,77±0,23 n=30	12,22±0,57 n=9	12,89±0,35 n=9	12,33±0,44 n=9	13,22±0,28 n=9
Мочевина в сыворотке, ммоль/л	5,097±0,14 n=23	5,303±0,23 n=9	5,04±0,45 n=6	5,46±0,43 n=6	5,41±0,31 n=6
Лактат в мышце, мкмоль/г	119,41±2,18 n=30	118,97±4,38 n=9	131,14±2,78 n=9	129,19±4,10 n=9	131,76±3,67 n=9

Примечания:

а – отличие от «сидячих» животных статистически значимо, p≤0,05;

б – отличие от крыс, тренирующихся 8 суток, статистически значимо, p≤0,05.

тельству об отсутствии влияния кортизола на целевые органы и неучастии белка в энергообеспечении нагрузки. Средние значения содержания лактата в трёхглавой мышце, характеризующего активность гликолиза, у «сидячих» и тренирующихся крыс на 8-е, 15-е, 22-е, 29-е сутки не отличались.

Средняя площадь поперечного сечения мышечного волокна у «сидячих» крыс на 22-е ($2527,5 \pm 342,3$ мкм², n=10) и 29-е ($2466,4 \pm 225,1$ мкм², n=10) сутки не отличалась. У тренирующихся животных средняя площадь поперечного сечения мышечного волокна на 29-е сутки ($3193,1 \pm 196,3$ мкм², n=12) была больше ($p_{0,012}=0,005$), чем на 22-е сутки ($2235,0 \pm 232,5$ мкм², n=12). Площадь поперечного сечения мышечного волокна у тренирующихся и «сидячих» крыс на 22-е сутки не отличалась. На 29-е сутки у тренирующихся крыс значения показателя были больше, чем у «сидячих» животных ($p_{0,025}=0,025$). Распределение мышечных волокон по площади попе-

речного сечения у «сидячих» и тренирующихся животных на 22-е и 29-е сутки не отличалось (рис. 3), хотя у тренирующихся крыс на 29-е сутки наблюдался меньший, чем на 22-е сутки, процент волокон с площадью поперечного сечения 1000-2000 мкм² ($p_{0,012}=0,007$) и больший процент волокон с площадью поперечного сечения 3001-4000 мкм² ($p_{0,012}=0,011$).

Обсуждение результатов

На основании данных об изменении уровня глюкозы и лактата в крови можно констатировать, что в среднем животные садились на отключенные электроды в момент достижения уровня лактата в крови близкого к 4 ммоль/л, т.е. значения показателя существенно не превышали МУСЛ. Это позволяет полагать, что скорость, при которой животные отказывались от бега, соответствовала КС [21]. Уровень глюкозы в крови повышался от начала бега до времени появления признаков утомления и вы-

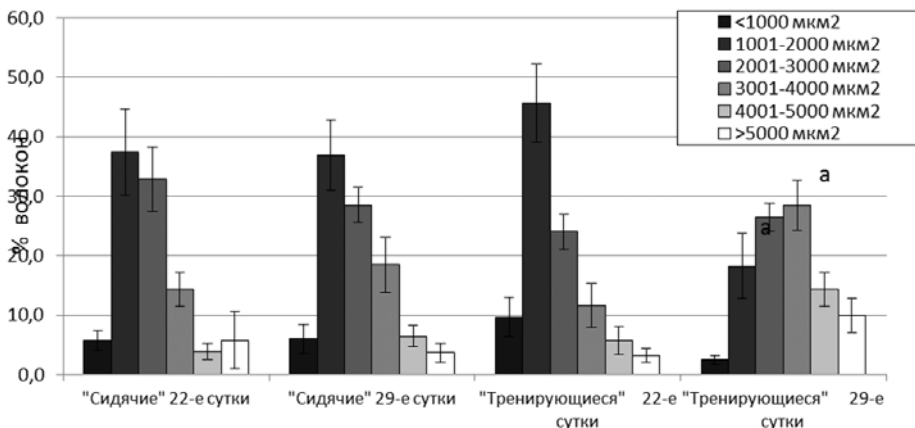


Рис. 3. Распределение мышечных волокон по площади поперечного сечения в средней части икроножной мышцы у «сидячих» и «тренирующихся» крыс на 22-е и 29-е сутки эксперимента.

Примечание: а – отличие от значений на 22-е сутки у тренирующихся крыс статистически значимо, $p < 0,05$.

ходил на плато до посадки животного на отключенные электроды, т.е. в процессе выполнения однократной тестовой нагрузки у животных не развивалось состояния острого утомления, характеризующегося снижением уровня глюкозы и резким увеличением уровня лактата в крови [6]. В целом, по данным изменения уровня глюкозы и лактата в крови и длительности выполнения, тестовая нагрузка в методике «Бег на тредбане» соответствовала аэробной нагрузке околомаксимальной зоны мощности у человека [5]. Скорость бега крыс при выполнении тренировочной нагрузки была ниже КС. В процессе тренировок визуально у крыс не регистрировали признаков утомления, поэтому тренировочную нагрузку в методике «Бег на тредбане» можно отнести к аэробной, соответствующей средней или низкой зонам мощности у человека [5].

Повышение работоспособности в результате тренировок, наблюдавшееся в проведённом исследовании в виде увеличения у животных длительности бега до отказа, свидетельствует об успешной адаптации животных к нагрузкам.

Адаптация к нагрузкам сопровождалась изменением ЧСС и СД, а также показателей эритроцитарного роста крови у крыс, что свидетельствует об участии кардио-респираторной системы животных в этом процессе. Аналогичное увеличение числа эритроцитов, уменьшение числа тромбоцитов и снижение среднего содержания гемоглобина в эритроците наблюдалось у крыс при выполнении плавания в течение 1 ч 3 раза в неделю 12 недель [7], которое на основании данных о влиянии груза на скорость достижения МУСЛ [26] относится к нагрузкам средней или низкой

анаэробной мощности. Снижение ЧСС и АД, наблюдавшееся в нашей работе, также характерно для нагрузок средней или низкой, а не околомаксимальной, аэробной мощности [16, 25]. Это указывает на то, что ведущую роль в увеличении работоспособности крыс в методике «Бег на тредбане» играли тренировки животных, а не тестовые нагрузки.

Адаптация животных к нагрузкам также происходила за счёт гипертрофии икроножных мышц, на что указывает увеличение массы этого органа и площади поперечного сечения мышечных волокон в мышце. В процессе тренировок площадь поперечного сечения мышечных волокон изменялась в сторону 3001-4000 мкм² за счёт уменьшения числа волокон с площадью поперечного сечения 1000-2000 мкм². По данным работы [13], площадь поперечного сечения волокон <2000 мкм² соответствует волокнам I и ПА типа, а 3001-4000 мкм² – волокнам II D/X типа. Поэтому можно предположить, что физическая нагрузка в методике «Бег на тредбане» приводила к смещению частоты мышечных волокон от I и ПА типа в сторону II D/X типа. Это также указывает на то, что адаптация была обусловлена нагрузками, отличными от аэробных околомаксимальных, т.к. нагрузки околомаксимальной и максимальной зон мощности ведут к гипертрофии и гиперплазии мышечных волокон I, ПА и II D/X типов [14, 15].

Необходимо отметить, что в проведённом исследовании в течение 4-х недель выполнения физических нагрузок у животных не наблюдалось изменения массы тела и снижения массы эпидидимального жира. Нагрузки не влияли на глюколотерантность крыс, уровень глюкозы в крови и мышце, содержание

гликогена в мышце. Хотя известно, что ежедневные тренировки, соответствующие по длительности и скорости бега диапазону средней и субмаксимальной аэробным мощностям, увеличивают поглощение глюкозы мышцами за счёт активации сигнального пути АМПК [10], приводят к гиперкомпенсации содержания гликогена в мышцах и печени [24, 27], снижают массу ретроперитонеального жира, уровень триглицеридов, свободных жирных кислот в крови животных в состоянии покоя [17]. Вероятно, отличие полученных результатов от литературных данных обусловлено тем, что животные в ходе тренировок не достигали максимального времени выполнения нагрузки. Похожий результат описан в работе [12], в которой тренировки средней аэробной мощности (55-60% от VO_{2max}) длительностью 1 ч в течение 8-ми недель, т.е. без достижения максимального времени выполнения нагрузки, не влияли на рост массы тела крыс, весовые характеристики легких, печени, сердца, селезенки, надпочечников.

Содержание общего белка в печени и мышце, уровень мочевины в крови тренирующихся крыс не отличались от таковых у «сидячих» животных, поэтому с высокой вероятностью можно предположить отсутствие катаболизма белка у крыс при выполнении физической нагрузки в методике «Бег до утомления». Отсутствие увеличения активности АЛТ и АСТ в печени и мышце также указывают на отсутствие катаболизма белка, т.к. эти ферменты катализируют реакции трансаминирования аминокислот, участвующие в катаболизме и анаболизме белка, и их активность в печени крыс повышается при гипокинезии [4]. Содержание лактата в мышце свидетельствует об от-

сутствии активации процессов гликолиза в органе. Нагрузки в методике «Бег до утомления» также не приводили к увеличению массы надпочечников, устойчивому изменению уровня кортикостероидов, тироксина и трийодтиронина в крови, уменьшению массы селезенки и тимуса, изменению числа лейкоцитов и лимфоцитарной формулы у крыс. В совокупности эти показатели [6] указывают на отсутствие развития хронического утомления у крыс в эксперименте и позволяют охарактеризовать физическую нагрузку в методике «Бег на тредбане» как физиологически адекватную.

Выводы

1. Тестовая нагрузка в методике «Бег на тредбане» в виде бега до отказа с начальной скоростью 12 м/мин, ускорением 0,6 м/мин² и углом подъёма дорожки 15° преимущественно обеспечивалась у крыс за счёт аэробного метаболизма глюкозы, а скорость, при которой животное отказывалось от бега, соответствовала критической скорости. По данным динамики уровня глюкозы и лактата в крови крыс при выполнении бега с возрастающей скоростью тестовая нагрузка в методике «Бег на тредбане» соответствовала нагрузке аэробной околомаксимальной зоне мощности у человека, а тренировочная нагрузка в виде 20-минутного бега со скоростью 15 м/мин и углом подъёма дорожки 15° была аналогична аэробной нагрузке средней или низкой зон мощности у человека.

2. Ежедневная физическая нагрузка в методике «Бег на тредбане», состоящая из тренировочной (4 дня в неделю) и тестовой нагрузок (1 день в неделю), приводила к увеличению работоспособности крыс. В результате трениро-

вок длительность бега при выполнении тестовой нагрузки возрасла в течение двух недель, до 14-х суток эксперимента, а затем выходила на плато.

3. Адаптация животных к нагрузке в методике «Бег на тредбане» достигалась за счет кардио-респираторной системы и гипертрофии мышц. При выполнении физической нагрузки в течение 28-ми суток у животных было отмечено увеличение числа эритроцитов и снижение числа тромбоцитов в крови, уменьшение, по результатам дисперсионного анализа, значений систолического давления и частоты сердечных сокращений, а также увеличение массы икроножных мышц и средней площади поперечного сечения мышечных волокон, уменьшение процентного содержания волокон с площадью поперечного сечения 1000-2000 мкм² и увеличения волокон с площадью поперечного сечения 3001-4000 мкм², что указывает на ведущую роль тренировочной нагрузки в адаптации животных.

4. Физическая нагрузка в методике «Бег на тредбане» не влияла на прирост массы тела крыс, массу эпидидимального жира, уровень глюкозы в крови, содержание гликогена в икроножной мышце, а также на глюкотолерантность животных, что свидетельствовало об отсутствии изменений углеводного и липидного метаболизма у крыс, подвергавшихся нагрузке.

5. Выполнение физической нагрузки в методике «Бег на тредбане» в течение 28-ми суток не приводило к развитию утомления. Нагрузка не изменяла активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой, гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной систем, не влияла на массу стресс-чувствительных органов и число

клеток лимфатического ростка в крови, не вызывала катаболизма белка и накопления лактата в мышце. Это позволяет охарактеризовать физическую нагрузку в методике «Бег на тредбане» как физиологически адекватную.

Список литературы

1. *Зайцева М.С., Иванов Д.Г., Александровская Н.В.* Работоспособность крыс в тесте «Плавание с грузом» и причины ее вариабельности // Биомедицина. 2015. № 4. С. 30-42.
2. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. - М.: Изд-во ВПК, 2007. – 320 с.
3. *Соловьева Г.А., Зайцева Н.Н., Теленёва В.И.* Углеводы и липиды // Практикум по биохимии. - М.: Изд-во Московского университета. 1989. С. 5-78.
4. *Ткаченко А.В.* Метаболические процессы в сердце и печени крыс при экспериментальной гипокинезии и их коррекция фитосиропом «Валеотон» // Вестник Харьковского национального университета. Серия: Биология. 2011. В. 14. № 971. С. 177-184.
5. *Фомин Н.А., Вавилов Ю.Н.* Физиологические основы двигательной активности. М.: Физкультура и спорт, 1991. – 224 с.
6. *Ament W., Verkerke G.J.* Exercise and Fatigue // Sports Med. 2009. V. 39. No. 5. P. 389-422.
7. *Baptista S., Piloto N., Reis F., Teixeira-de-Lemos E., Garrido A.P., Dias A., Lourenco M., Palmeiro A., Ferrer-Antunes C., Teixeira F.* Treadmill running and swimming imposes distinct cardiovascular physiological adaptations in the rat: focus on serotonergic and sympathetic nervous systems modulation // Acta Physiologica Hungarica. 2008. doi: 10.1556/APhysiol.2008.0002.
8. *Billat V.L., Sirvent P., Py G., Koralsztein J.P., Mercie J.* The concept of maximal lactate steady state a bridge between biochemistry, physiology and sport science // Sports Med. 2003. V. 33. No. 6. P. 407-426.
9. *Brooks G.A., White T.P.* Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise // J. Appl. Physiol.: respirat. environ. exercise physiol. 1978. V. 45. No. 6. P. 1009-1015.

10. *Chen Z.P., Stephens T.J., Murthy S., Canny B.J., Hargreaves M., Witters L.A., Kemp B.E., McConnell G.K.* Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans // *Diabetes*. 2003. V. 52. P. 2205-2212.
11. *Copp S.W., Hirai D.M., Musch T.I., Poole D.C.* Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment // *J. Physiol.* 2010. V. 588. No. 24. P. 5077-5087.
12. *Dantas E.M., Pimentel E.B., Gonçalves C.P., Lunz W., Rodrigues S.L., Mill J.G.* Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats // *Brazilian J. of medical and biological research*. 2010. V. 43. P. 515-521.
13. *Delp M.D., Duan C.* Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle // *J. Appl. Physiol.* 1996. V. 80. P. 261-270.
14. *Díaz-Herrera P., García-Castellano J.M., Torres A., Morcuende J.A., Calbet J.A.L., Sarrat R.* Effect of high-intensity running in rectus femoris muscle fiber in rats // *Journal of Orthopaedic research*. 2001. V. 19. P. 229-232.
15. *Díaz-Herrera P., Torres A., Morcuende J.A., García-Castellano J.M., Calbet J.A.L., Sarrat R.* Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats // *Histol. Histopathol.* 2001. V. 16. P. 29-35.
16. *Guerreiro L.F., Pereira A.A., Martins C.N., Wally C., Gonçalves C.A.N.* Swimming Physical Training in Rats: Cardiovascular Adaptation to Exercise Training Protocols at Different Intensities // *JEPonline*. 2015. V. 18. No. 1. P. 1-12.
17. *Haram P.M., Kemi O.J., Lee S.J., Bendheim M.O., Al-Share Q.Y., Waldum H.L., Gilligan L.J., Koch L.G., Britton S.L., Najjar S.M., Wisloff U.* Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity // *Cardiovascular research*. 2009. V. 81. P. 723-732.
18. *Jones A.M., Doust J.H.* The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state // *Medicine&Science in Sports&Exercise*. 1998. V. 30. No. 8. P. 1304-1313.
19. *Jones A.M., Vanhatalo A., Burnley M., Morton R.H., Poole D.C.* Critical Power: Implications for Determination of VO_{2max} and Exercise Tolerance // *Med. sci. sports exerc.* 2010. V. 42. No. 10. P. 1876-1890.
20. *Krege J.H., Hodgin J.B., Hagaman J.R., Smithies O.* A Noninvasive Computerized Tail-Cuff System for Measuring Blood Pressure in Mice // *Hypertension*. 1995. V. 25. P. 1111-1115.
21. *Manchado-Gobatto F.B., Gobatto C.A., Conterteze R.L., Papoti M., Araujo G.G., Mello M.A.R.* Determination of Critical Velocity and Anaerobic Capacity of Running Rats // *JEPonline*. 2010; 13(4):40-49.
22. *Monteiro M.F., Filho D.C.S.* Physical exercise and blood pressure control // *Rev. bras. med. esporte*. 2004. V. 10. No. 6. P. 517-519.
23. *Moraska A., Deak T., Spencer R.L., Roth D., Fleshner M.* Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats // *Am. J. Physiol. regulatory integrative comp. physiol.* 2000. V. 279. P. R1321-R1329.
24. *Nakatani A., Han D.H., Hansen P.A., Nolte L.A., Host H.H., Hickner R.C., Holloszy J.O.* Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats // *J. Appl. Physiol.* 1997. V. 82 (2). P. 711-715.
25. *Veras-Silva A.S., Mattos K.C., Gava N.S., Brum P.C., Negrao C.E., Krieger E.M.* Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats // *Am. J. Physiol. heart circ. physiol.* 1997. V. 273. No. 42. P. H2627-H2631.
26. *Voltarelli F.A., Gobatto C.A., Mello M.A.R.* Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test // *Braz. J. med. biol. res.* 2002. V. 35. No. 11. P. 1389-1394.
27. *Zendzian-Piotrowska M., Gorski J.* Metabolic adaptation to daily exercise of moderate intensity to exhaustion in the rat // *Eur. J. Appl. physiol.* 1993. V. 67. P. 77-82.

References

1. *Zajceva M.S., Ivanov D.G., Aleksandrovskaja N.V.* Rabotosposobnost' krysa v teste «Plavanie s gruzom» i prichiny ee variabel'nosti // *Biomedicina*. 2015. № 4. S. 30-42.
2. *Karkischenko N.N.* Alternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodelirovaniya. - M.: Izd-vo VPK, 2007. - 320 s.
3. *Solov'eva G.A., Zajceva N.N., Telepnjova V.I.* Uglevody i lipidy // *Praktikum po biohimii*. - M.: Izd-vo Moskovskogo universiteta. 1989. S. 5-78.
4. *Tkachenko A.V.* Metabolicheskie processy v serdce i pecheni krysa pri jeksperimental'noj gi-

- pokinezii i ih korekcija fitosiropom «Valeoton» // Vestnik Har'kovskogo nacional'nogo universiteta. Serija: Biologija. 2011. V. 14. № 971. S. 177-184.
5. **Fomin N.A., Vavilov Ju.N.** Fiziologicheskie osnovy dvigatel'noj aktivnosti. M.: Fizkul'tura i sport, 1991. – 224 s.
 6. **Ament W., Verkerke G.J.** Exercise and Fatigue // Sports Med. 2009. V. 39. No. 5. P. 389-422.
 7. **Baptista S., Piloto N., Reis F., Teixeira-de-Lemos E., Garrido A.P., Dias A., Lourenco M., Palmeiro A., Ferrer-Antunes C., Teixeira F.** Treadmill running and swimming imposes distinct cardiovascular physiological adaptations in the rat: focus on serotonergic and sympathetic nervous systems modulation // Acta Physiologica Hungarica. 2008. doi: 10.1556/APhysiol.2008.0002.
 8. **Billat V.L., Sirvent P., Py G., Koralsztein J.P., Mercie J.** The concept of maximal lactate steady state a bridge between biochemistry, physiology and sport science // Sports Med. 2003. V. 33. No. 6. P. 407-426.
 9. **Brooks G.A., White T.P.** Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise // J. Appl. Physiol.: respirat. environ. exercise physiol. 1978. V. 45. No. 6. P. 1009-1015.
 10. **Chen Z.P., Stephens T.J., Murthy S., Canny B.J., Hargreaves M., Witters L.A., Kemp B.E., McConnell G.K.** Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans // Diabetes. 2003. V. 52. P. 2205-2212.
 11. **Copp S.W., Hirai D.M., Musch T.I., Poole D.C.** Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment // J. Physiol. 2010. V. 588. No. 24. P. 5077-5087.
 12. **Dantas E.M., Pimentel E.B., Gonçalves C.P., Lunz W., Rodrigues S.L., Mill J.G.** Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats // Brazilian J. of medical and biological research. 2010. V. 43. P. 515-521.
 13. **Delp M.D., Duan C.** Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle // J. Appl. Physiol. 1996. V. 80. P. 261-270.
 14. **Díaz-Herreral P., Garcia-Castellano J.M., Torres A., Morcuende J.A., Calbet J.A.L., Sarrat R.** Effect of high-intensity running in rectus femoris muscle fiber in rats // Journal of Orthopaedic research. 2001. V. 19. P. 229-232.
 15. **Díaz-Herreral P., Torres A., Morcuende J.A., Garcia-Castellano J.M., Calbet J.A.L., Sarrat R.** Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats // Histol. Histopathol. 2001. V. 16. P. 29-35.
 16. **Guerreiro L.F., Pereira A.A., Martins C.N., Wally C., Gonçalves C.A.N.** Swimming Physical Training in Rats: Cardiovascular Adaptation to Exercise Training Protocols at Different Intensities // JEPonline. 2015. V. 18. No. 1. P. 1-12.
 17. **Haram P.M., Kemi O.J., Lee S.J., Bendheim M.O., Al-Share Q.Y., Waldum H.L., Gilligan L.J., Koch L.G., Britton S.L., Najjar S.M., Wisloff U.** Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity // Cardiovascular research. 2009. V. 81. P. 723-732.
 18. **Jones A.M., Doust J.H.** The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state // Medicine & Science in Sports & Exercise. 1998. V. 30. No. 8. P. 1304-1313.
 19. **Jones A.M., Vanhatalo A., Burnley M., Morton R.H., Poole D.C.** Critical Power: Implications for Determination of VO₂max and Exercise Tolerance // Med. sci. sports exerc. 2010. V. 42. No. 10. P. 1876-1890.
 20. **Krege J.H., Hodgin J.B., Hagaman J.R., Smithies O.** A Noninvasive Computerized Tail-Cuff System for Measuring Blood Pressure in Mice // Hypertension. 1995. V. 25. P. 1111-1115.
 21. **Manchado-Gobatto F.B., Gobatto C.A., Conartez R.L., Papoti M., Araujo G.G., Mello M.A.R.** Determination of Critical Velocity and Anaerobic Capacity of Running Rats // JEPonline. 2010; 13(4):40-49.
 22. **Monteiro M.F., Filho D.C.S.** Physical exercise and blood pressure control // Rev. bras. med. esporte. 2004. V. 10. No. 6. P. 517-519.
 23. **Moraska A., Deak T., Spencer R.L., Roth D., Fleshner M.** Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats // Am. J. Physiol. regulatory integrative comp. physiol. 2000. V. 279. P. R1321-R1329.
 24. **Nakatani A., Han D.H., Hansen P.A., Nolte L.A., Host H.H., Hickner R.C., Holloszy J.O.** Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats // J. Appl. Physiol. 1997. V. 82 (2). P. 711-715.

25. *Veras-Silva A.S., Mattos K.C., Gava N.S., Brum P.C., Negrao C.E., Krieger E.M.* Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats // *Am. J. Physiol. heart circ. physiol.* 1997. V. 273. No. 42. P. H2627-H2631.
26. *Voltarelli F.A., Gobatto C.A., Mello M.A.R.* Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test // *Braz. J. med. biol. res.* 2002. V. 35. No. 11. P. 1389-1394.
27. *Zendzian-Piotrowska M., Gorski J.* Metabolic adaptation to daily exercise of moderate intensity to exhaustion in the rat // *Eur. J. Appl. physiol.* 1993. V. 67. P. 77-82.

Adaptive changes in rats under everyday physical load in «The run on treadmill» method

**D.G. Ivanov, N.V. Alexandrovskaya, E.A. Afonkina, P.V. Eroshkin,
A.N. Semenov, D.V. Busiigin**

The adaptive changes in rats under 4 week's everyday training (4 days/week) and test (1 days/week) physical exercise on treadmill was investigated. The training exercise was consisted of 20 minutes run with velocity 15 m/min and incline 15°. The test exercise was 20-30 minutes run until exhaustion with acceleration 0,6 m/min², initial velocity 12 m/min and incline 15°. The test exercise was corresponded to submaximal intensity aerobic capacity zone, and training exercise was related to medium or low intensity aerobic capacity zone by results of measurements glucose and lactate blood level. The adaptation to load were associated with the muscle hypertrophy, erythrocytes increasing, mean corpuscles volume, red cell width distribution and platelets decreasing, reduction heart rate and values of systolic pressure. The physical exercise did not influence on glucose tolerance and glucose blood level, containing glucose and glycogen in gastrocnemius muscle, wet weight of epididymal fat in rats. After 4 weeks physical load did not influence on left adrenal, thymus and spleen weights, blood level of cortisol, thyroxin, triiodothyronine and urea, liver protein and amino transferases activity, muscle lactate, protein and aspartate amino transferase activity. Therefore we suggested that physical exercise did not produce fatigue in rat.

Key words: rat, treadmill, adaptation, physical exercise.

Перспективы клинического применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для регенерации хрящевой гиалиновой ткани

С.В. Коржикова¹, Е.В. Фролов¹, З.А. Тепляшин¹, В.Н. Воловенко²,
А.С. Тепляшин¹

¹ – Центр клеточных технологий ООО «Бьюти Плаза», Москва

² – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский Университет» Минздрава России, Ярославль

Контактная информация: Коржикова Светлана Васильевна, sv_yasil@mail.ru

Разработан биотрансплантат для внутрисуставного введения на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани (ЖТ) и гелевого носителя, способствующий регенерации хрящевой гиалиновой ткани. Выбор клеток основан на способности ММСК ЖТ дифференцироваться в клетки хрящевой ткани (хондробласты и хондроциты) при индукции к хондродифференцировке. Подобран оптимальный носитель для доставки клеток в область дефекта, по консистенции аналогичный синовиальной жидкости, поддерживающий жизнеспособность, пролиферативную активность и хондрогенные потенции ММСК внутри сустава. Продемонстрировано, что при внутрисуставном введении кроликам биотрансплантата, состоящего из аутологичных ММСК ЖТ и гелевого носителя на основе производных целлюлозы, происходит полноценная регенерация дефекта хрящевой гиалиновой ткани.

Ключевые слова: биотрансплантат, гиалиновый хрящ, дефект суставного хряща, дифференцировка, кролики, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

Введение

Благодаря активному развитию клеточной биологии, на сегодняшний день выделены и охарактеризованы практически все клеточные типы человеческого организма. Разрабатываются технологии, позволяющие использовать в медицине выделенные и размноженные в условиях *in vitro* клетки для восстановления поврежденных тканей и органов [5].

В частности, пристальное внимание исследователей направлено на изучение потенций мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) с целью их использования в репаративной медицине. ММСК отличаются относи-

тельной простотой выделения и культивирования, способностью пролиферировать в течение длительного времени *in vitro* и широким спектром дифференцировки в клетки тканей мезенхимного происхождения. Впервые ММСК были получены из костного мозга по их способности адгезироваться к поверхности культуральной посуды [6]. В последующие годы были отработаны методики выделения ММСК из плаценты, тимуса, дермы, фетальных тканей и др. Наиболее легкодоступным источником является жировая ткань [18].

Продемонстрировано, что благодаря своим выраженным потенциям к дифференцировке в клетки хрящевой гиалино-

вой ткани (хондробласты, хондроциты), ММСК ЖК являются перспективным материалом при создании препаратов для восстановления хрящевой ткани, выстилающей суставы [12].

При разработке биотехнологических способов восстановления дефектов гиалинового хряща с использованием клеточного материала основными задачами являются выбор наиболее подходящего источника клеток, способа их доставки в область повреждения и оптимального носителя с целью образования гиалиновой хрящевой ткани в дефектной области. Следует отметить, что исследования по созданию препаратов для лечения суставов с использованием популяций соматических клеток активно ведутся учеными многих стран. В результате получены различные продукты, предлагаемые для лечения заболеваний суставов [4, 7, 8, 11, 15]. Однако, при несомненных достоинствах полученных препаратов, все они имеют недостатки – такие, как нанесение дополнительных травм на здоровые участки органов при заборе клеточного материала, технические трудности при наращивании необходимого количества клеточного материала для трансплантации, что значительно увеличивает стоимость продукта, необходимость нежелательной обработки клеток индукторами дифференцировки перед трансплантацией, приводящей к неконтролируемым изменениям на молекулярном уровне, образованию волонистой хрящевой ткани и др.

Таким образом, разработки принципиально новых биотехнологических подходов для лечения дегенеративных заболеваний суставов остаются по-прежнему актуальными.

Целью работы было создание биотрансплантата для внутрисуставного введения на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани (ЖТ), способствующего регенерации хрящевой гиалиновой ткани, и оценка перспективности клинического применения ММСК для лечения дегенеративных заболеваний суставов.

Материалы и методы

ММСК из жировой ткани кролика и человека выделяли по разработанной ранее методике [17] с собственными модификациями [13, 14]. ММСК человека выделяли из жировой ткани, полученной во время проведения плановой операции липосакции, с информированного согласия пациента.

Жировую ткань тщательно промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), измельчали механически и подвергали ферментативной обработке 0,075% раствором коллагеназы тип I (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) в среде ДМЕМ (среда Игла в модификации Дульбекко) (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) с низким содержанием глюкозы (1 г/л) при 37°C в течение 30 мин. Коллагеназу отмывали эквивалентным объемом питательной среды (ДМЕМ, дополненной 10% эмбриональной сыворотки теленка) и центрифугировали при 1000 g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали и пропускали через фильтры с диаметром пор 100 мкм и 10 мкм соответственно для удаления клеточных остатков и получения гомогенной популяции клеток. Полученную клеточную суспензию высеивали во флаконы площадью 75 см² из расчета 10⁶ клеток/см². Доля прикрепившихся кле-

ток составляла приблизительно 1-1,5%. Культивировали ММСК в среде ДМЕМ, дополненной 10% эмбриональной сыворотки теленка (ЭСТ) (HyClone Fetal Bovine Serum Defined, США), однократным р-ром заменимых аминокислот и антибиотиками (100 ед./мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина) (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) при 37°C и 5% CO₂ в воздухе. Среду меняли каждые четверо суток и, по достижении конфлуэнтного монослоя, осуществляли субкультивирование: клетки снимали с субстрата 0,05% р-ром трипсин-ЭДТА (Gibco Invitrogen Life Technologies, США) и высевали на культуральные флаконы в ростовой среде из расчета 5x10⁶ клеток/см². Непосредственно перед процедурой подготовки трансплантата клетки снимали с субстрата, отмывали средой ДМЕМ без добавок, ресуспендировали в небольшом количестве физ. р-ра и подсчитывали в камере Горяева.

Результаты иммунофенотипирования клеточных популяций, выделенных из жировой ткани кролика и человека, проводили на цитометре Epics Elite Coulter по стандартной методике [16]. Популяции полученных клеток соответствовали по экспрессии поверхностных антигенов ММСК.

Время удвоения клеток, выделенных из жировой ткани человека и кролика, составило 54-62 и 52-60 ч соответственно.

В эксперименте оценивали разные варианты трансплантатов с целью изучения влияния различных факторов на процессы регенерации хрящевой гиалиновой ткани.

1. Ostenil® (TRB Chemedica, Германия-Швейцария) – изотонический р-р, содержащий 10,0 мг гиалуроната на-

трия, использующийся в ортопедии при лечении дегенеративных и травматических изменений синовиальных суставов. Для введения в один сустав использовали 400 мкл Ostenil®.

2. Гель «Линтекс-Мезогель» (далее – Мезогель) на основе производных целлюлозы (ООО «Линтекс», Россия) – 2,2% р-р, использующийся в медицине на органах и тканях, имеющих серозное покрытие (в т.ч. на суставах). Для введения в один сустав использовали 400 мкл Мезогеля.

3. ММСК кролика – выделяли из жировой ткани кролика, наращивали *in vitro* до необходимого количества, осадок клеток суспендировали в физ. р-ре. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в физ. р-ре, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

4. ММСК кролика+Мезогель – ММСК жировой ткани кролика вводили в 2,2% Мезогель, суспендировали до гомогенного состояния. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в Мезогеле, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

5. ММСК человека – выделяли из жировой ткани человека, наращивали *in vitro* до необходимого количества, осадок клеток суспендировали в физ. р-ре. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в физ. р-ре, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

6. ММСК человека+Мезогель – ММСК жировой ткани человека вводили в 2,2% Мезогель, суспендировали до гомогенного состояния. Для введения в один сустав использовали 400 мкл суспензии клеток в Мезогеле, из расчета 10⁵ клеток на 1 кг массы животного.

Исследования по созданию биотрансплантатов проводились в Центре клеточных технологий ООО «Бьюти Плаза». Эксперимент с животными проводился на базе вивария НИИ животноводства им. Л.К. Эрнста. Для эксперимента в ФГБНУ НИИ ПЗК им. В.А. Афанасьева были закуплены самцы кроликов (21 особь) породы советская шиншилла в возрасте 8 мес. массой тела 4,0-4,5 кг. Каждый кролик содержался в отдельной клетке, со свободным доступом к воде, с соблюдением всех зооигиенических параметров. Кормление животных осуществлялось стандартным полнорационным комбикормом и зеленым кормом в соотношении 1:1, смена воды производилась дважды в сутки. Выживаемость животных в эксперименте после проведения всех манипуляций составила 100%.

Моделирование дефекта гиалинового хряща у кроликов проводили путем хирургического вмешательства под общей анестезией с применением правил асептики и антисептики в стерильной операционной. В качестве наркотического вещества применялся Рометар (Bioveta, Чешская Республика) и Золетил (Virbac Sante Animale, Франция) по весу животного из расчета 0,1 мл на килограмм массы. Место оперативного вмешательства – левый коленный сустав кролика. На внутренней суставной поверхности бедренной кости скальпелем срезали часть гиалинового хряща длиной около 1 см и шириной примерно 1,5 мм. Затем рана закрывалась в обратном порядке.

Введение трансплантатов производили через 7 суток после нанесения дефекта путем внутрисуставных инъекций однократно. В контрольной группе

животных восстановление нанесенного дефекта проходило естественным образом, без введения какого-либо препарата. Для изучения в динамике процесса регенерации хрящевой ткани после введения препаратов производили вывод животных из эксперимента (по одному животному из каждой группы) на 14-е, 28-е и 56-е сутки, и изолировали костно-хрящевой композит сустава, на который был нанесен дефект. Морфологический анализ проводили визуально, а гистологический – путем стандартного окрашивания парафиновых срезов гематоксилин-эозином.

Результаты и их обсуждение

Основанием для выбора линии клеток при разработке биотрансплантата послужили собственные исследования, демонстрирующие потенциалы ММСК к цитодифференцировке в ткани мезодермального происхождения [2, 3, 12]. Было показано, что ММСК, выделенные из костного мозга и жировой ткани, обладают выраженными потенциалами к дифференцировке в клетки хрящевой ткани – хондробласты и хондроциты. Однако жировая ткань является более доступным источником клеток, поэтому при создании биотрансплантата нами были использованы ММСК, выделенные из неё.

Известно, что при введении в организм культивированные *in vitro* клетки испытывают большой стресс, при этом часть клеток гибнет и элиминируется. Для того, чтобы максимально минимизировать этот процесс, был подобран носитель для доставки клеток в область дефекта. В качестве вариантов носителя для клеток рассматривались гель «Коллаген ультра», препараты гиалуроно-

вой кислоты («Остенил», «Гиалуром») и «Линтекс-Мезогель» – гелеобразные препараты, используемые в медицинской практике при комплексном лечении дегенеративных заболеваний суставов, приближенные по консистенции к синовиальной жидкости, заполняющей сустав. Теоретическим обоснованием выбора данных препаратов было их применение в ортопедии и гелеобразная консистенция, благодаря которой они могли выполнять функцию «каркаса» для эффективной защиты клеток на время их адаптации и приживания внутри сустава.

В серии предварительных экспериментов *in vitro* при сокультивировании ММСК с выбранными препаратами было продемонстрировано, что «Линтекс-Мезогель», в отличие от остальных препаратов, максимально способствовал поддержанию жизнеспособности,

пролиферативной активности и хондрогенных потенциалов ММСК ЖТ. «Линтекс-Мезогель» – рассасывающийся противоспаечный стерильный гель, состоящий из производных целлюлозы, используемый в медицине на органах и тканях, имеющих серозное покрытие (в т.ч. на суставах) [1]. При попадании в организм гель всасывается в ткани и выделяется, не вызывая общетоксического, аллергизирующего и местно-раздражающего действия (токсикологическое заключение ГУН ВНИИМТ №34/27 от 18.01.2005 г.).

В доклиническом исследовании были апробированы различные варианты препаратов для внутрисуставного введения (табл.) с целью восстановления дефекта гиалинового хряща: биотрансплантаты на основе аутогенного и ксеногенного клеточного материала (ММСК кролика и человека); клетки с носителем и без

Таблица

Влияние состава препарата для внутрисуставного введения на восстановление дефекта гиалинового хряща

№ группы	Кол-во кроликов в группе	Состав препарата, введенного внутри-суставно	Визуальная оценка дефекта гиалинового хряща (суток после введения препарата)		
			14	28	56
1 Контроль	3	-	-	-	-
2	3	ММСК человека + Мезогель	+/--	+/-	++/-
3	3	ММСК кролика + Мезогель	+	+	+
4	3	Остенил	-	-	-
5	3	ММСК кролика	+/--	+/-	+/-
6	3	Мезогель	-	-	+/--
7	3	ММСК человека	-	+/--	+/--

Примечания: «-» – дефект остался в неизменном виде; «+» – дефект восстановился; «+/-» – частичное восстановление дефекта.

носителя; препараты, используемые в ортопедии (Остенил, «Линтекс-Мезогель»). Контролем служила группа животных, в которой дефект хряща восстанавливался естественным путем.

Разница в результатах при введении клеток без носителя и с носителем подтверждает наши предположения о важности правильного выбора носителя. Эффективность регенерации гиалинового хряща на 56-е сутки после введения ММСК кролика оказалась значительно ниже по сравнению с ММСК кролика

с носителем, та же тенденция наблюдалась и при ксеногенной трансплантации (ММСК человека / ММСК человека с носителем). Аутогенный биотрансплантат (ММСК кролика с носителем) оказался самым эффективным: уже на 28-е сутки после инъекции дефект полностью восстанавливался (рис. 1), тогда как при ксеногенной трансплантации (ММСК человека с носителем) даже на 56-е сутки дефект восстанавливался только частично (рис. 2), что согласуется с литературными данными [9].

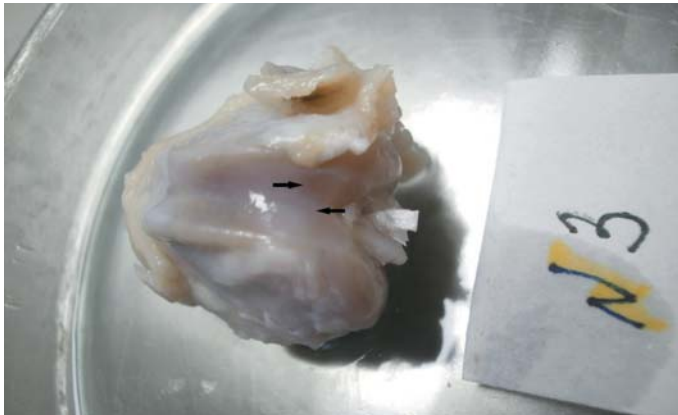


Рис. 1. ММСК кролика + Мезогель, 28 суток после внутрисуставного введения трансплантата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

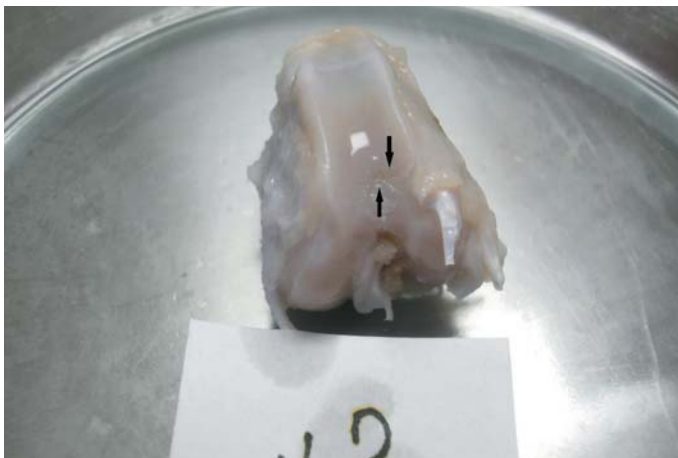


Рис. 2. ММСК человека + Мезогель, 56 суток после внутрисуставного введения трансплантата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

В контрольной группе (рис. 3) и в группе кроликов, которым в область дефекта вводили Остенил (рис. 4), на

56-е сутки дефект остался в неизменном виде. В группе с Мезогелем (рис. 5) восстановление было незначительным, что

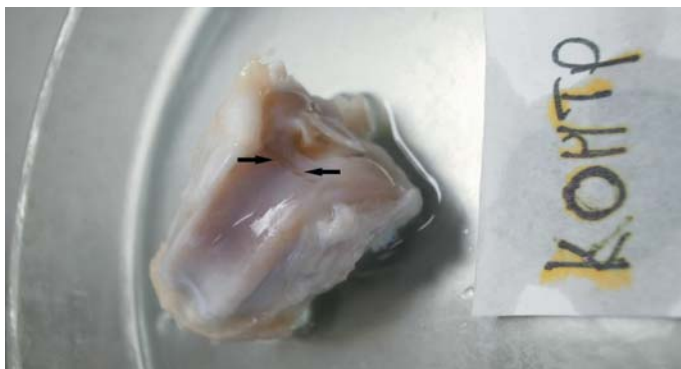


Рис. 3. Контроль, 63 суток после нанесения дефекта (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

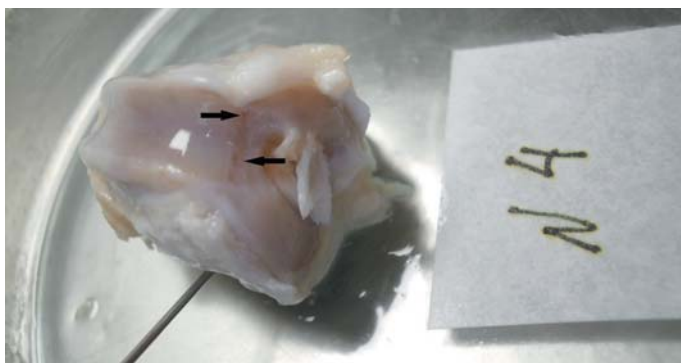


Рис. 4. Остенил, 56 суток после внутрисуставного введения препарата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

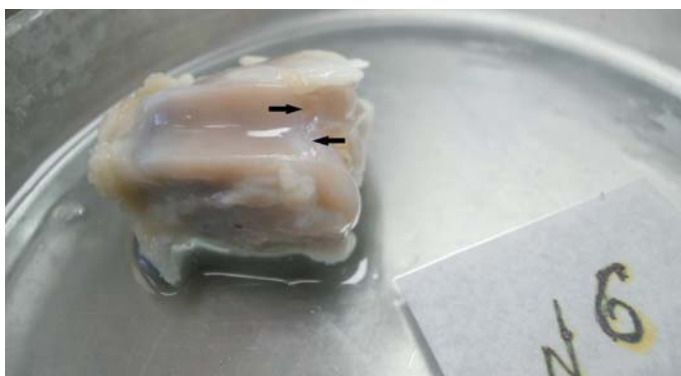


Рис. 5. Мезогель, 56 суток после внутрисуставного введения препарата (стрелками обозначено место нанесения дефекта).

демонстрирует низкую эффективность стандартных манипуляций при лечении заболеваний суставов.

Известно, что в организме разрушенный гиалиновый хрящ из-за особенностей своего метаболизма восстанавливается очень медленно и только с образованием волокнистой хрящевой ткани [10]. В этом случае функциональная активность дефектного сустава остается нарушенной. Поэтому главной целью при лечении болезней суставов является восстановление хрящевой гиалиновой ткани.

В нашем эксперименте у всех животных из группы 3 произошло зарастание дефекта хрящевой тканью уже на 28-е сутки после внутрисуставного введения препарата на основе аутологичных ММСК. Гистологический анализ участка хрящевой ткани, взятой из области восстановленного дефекта, в случае применения аутогенного биотрансплантата (ММСК кролика с носителем) показал полное восстановление дефекта хрящевой гиалиновой тканью (рис. 6).

Заключение

Быстрое и качественное восстановление дефекта гиалинового хряща в случае введения биотрансплантата, содержащего аутологичные ММСК ЖТ и гелевый носитель, подтверждают высокую степень эффективности использования собственных региональных стволовых клеток для восстановления утраченной функции сустава. Кроме того, показано, что применение аутобиотрансплантата безопасно, малоинвазивно, малотравматично и легко воспроизводимо.

Перспективность клинического применения ММСК при лечении дегенеративных заболеваний суставов очевидна. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности биомедицинских клеточных продуктов при лечении дегенеративных заболеваний суставов по сравнению с общепринятыми в ортопедии методами, т.к. способствуют репарации гиалиновой хрящевой ткани. В данном исследовании продемонстрирована возможность репарации хрящевой гиалиновой ткани с использо-

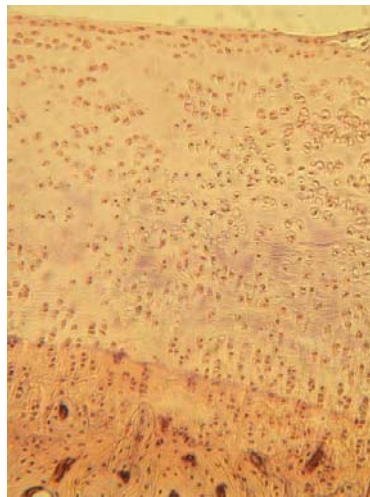


Рис. 6. Гиалиновая хрящевая ткань. Гистологический срез хрящевой ткани из области восстановленного дефекта, окраска гематоксилин-эозином, ув. x200.

ванием ММСК ЖТ, однако механизмы этого процесса нуждаются в дальнейшем изучении.

Список литературы

1. **Вербицкий Д.А., Жуковский В.А., Немилев В.Е., Слепцов И.В., Жуковская И.И.** Способ получения геля на основе карбоксиметилцеллюлозы. 2007. Патент РФ № 2352584.
2. **Тепляшин А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Ростовская М.С., Чупикова Н.И., Васюнина Н.Ю., Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Савченкова И.П.** Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека в клетки хрящевой ткани при культивировании их в трехмерных матриксах OPLA *in vitro* // Цитология. 2007. № 49 (7). С. 544-51.
3. **Тепляшин А.С., Чупикова Н.И., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Ростовская М.С., Савченкова И.П.** Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки // Цитология. 2005. № 47(7). С. 637-643.
4. **Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S.** Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering // Nat. clin. pract. rheumatol. 2006. No. 2. Pp. 373-382.
5. **Farr J., Cole B., Hawan A., et al.** Clinical cartilage restoration: evolution and overview // Clin. Orthop. Relat. Res. 2011. No. 469. Pp. 2696-2705.
6. **Fridenshtein A.J., Deriglazova U.F., Kulagina N.N., et al.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method // Exp. Hematol. 1974. No. 2. Pp. 83-92.
7. **Kobayashi T., Ochi M., Yanada S., Ishikawa M., Adachi N., Deie M., Arihiro K.** A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair // Arthroscopy. 2008. No. 24(6). Pp. 9-76.
8. **Niemeyer P., Lenz P., Kreuz P.C., Salzmann G.M., Sdkamp N.P., Schmal H., Steinwachs M.** Chondrocyte-seededyte I/III collagen membrane for autologous chondrocyte transplantation: prospective 2-year results in patients with cartilage defects of the knee joint // Arthroscopy. 2010. No. 26. Pp. 1074-1082.
9. **Poncelet A.J., Denis D., Gianello P.** Cellular xenotransplantation // Curr. opin. organ. transplant. 2009. No. 14. Pp. 168-174.
10. **Shapiro F., Kolde S., Glimsher M.** Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage // J. Bone. Joint Surg. 1993. No. 75. Pp. 532-553.
11. **Steinwachs M.R., Kreuz P.C.** Clinical results of autologous chondrocyte transplantation (ACT) using a collagen membrane. In: Cartilage surgery and future perspectives. - Springer Berlin, Heidelberg, New York. 2003. Pp. 37-48.
12. **Teplyashin A.S., Korzhikova S.V., Sharifulina S.Z., Chupikova N.I., Rostovskaya M.S., Vasyunina N.Y., Savtchenkova I.P.** Engineering cartilage-like tissue using adipose-derived adult stem cells and collagen scaffolds // Tissue Engineering. 2006. No. 12. P. 1117.
13. **Teplyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. United States Patent No. 7,915,039 B2.
14. **Teplyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. European patent No. 1 733 027 B1.
15. **Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., et al.** Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees // Osteoarthritis cartilage. 2002. No. 10. Pp. 199-206.
16. **Zeile G.** Intracytoplasmic immunofluorescence in multiple myeloma // Cytometry. 1980. No. 1. Pp. 37-41.
17. **Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., de Ugarte D.D., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraiser J.K., Benhaim P., Hedrik M.H.** Human adipose tissue is source of multipotent stem cells // Mol. biol. cell. 2002. No. 13. Pp. 4279-4295.
18. **Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrik M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue Eng. 2001. No. 7. Pp. 211-226.

References

1. **Verbickij D.A., Zhukovskij V.A., Nemilov V.E., Slepcov I.V., Zhukovskaja I.I.** Sposob poluchenija gelja na osnove karboksimetilcelljulozy. 2007. Patent RF № 2352584.
2. **Tepljashin A.S., Korzhikova S.V., Sharifulina S.Z., Rostovskaja M.S., Chupikova N.I., Vasjunina N.Ju., Andronova N.V., Treshhalina E.M., Savchenkova I.P.** Differencirovka mezenhimnyh stvolovyh kletok kostnogo mozga cheloveka v kletki hrjashhevoj tkani pri kul'tivirovanii ih v trehmernyh matriksah OPLA *in vitro* // Citologija. 2007. № 49 (7). S. 544-51.
3. **Tepljashin A.S., Chupikova N.I., Korzhikova S.V., Sharifulina S.Z., Rostovskaja M.S., Savchenkova I.P.** Sravnitel'nyj analiz dvuh

- kletocnyh populacij s fenotipom, podobnym mezenhimnym stvolovym kletkam, vydelenykh iz raznyh uchastkov podkozhno-zhirovoj kletchatki // *Citologija*. 2005. № 47(7). S. 637-643.
4. **Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S.** Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering // *Nat. clin. pract. rheumatol.* 2006. No. 2. Pp. 373-382.
 5. **Farr J., Cole B., Dhawan A., et al.** Clinical cartilage restoration: evolution and overview // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2011. No. 469. Pp. 2696-2705.
 6. **Fridenshtein A.J., Deriglazova U.F., Kulagina N.N., et al.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method // *Exp. Hematol.* 1974. No. 2. Pp. 83-92.
 7. **Kobayashi T., Ochi M., Yanada S., Ishikawa M., Adachi N., Deie M., Arihiro K.** A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair // *Arthroscopy*. 2008. No. 24(6). Pp. 9-76.
 8. **Niemeyer P., Lenz P., Kreuz P.C., Salzmann G.M., S'dkamp N.P., Schmal H., Steinwachs M.** Chondrocyte-seeded type I/III collagen membrane for autologous chondrocyte transplantation: prospective 2-year results in patients with cartilage defects of the knee joint // *Arthroscopy*. 2010. No. 26. Pp. 1074-1082.
 9. **Poncelet A.J., Denis D., Gianello P.** Cellular xenotransplantation // *Curr. opin. organ. transplant.* 2009. No. 14. Pp. 168-174.
 10. **Shapiro F., Kolde S., Glimsher M.** Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage // *J. Bone. Joint Surg.* 1993. No. 75. Pp. 532-553.
 11. **Steinwachs M.R., Kreuz P.C.** Clinical results of autologous chondrocyte transplantation (ACT) using a collagen membrane. In: *Sartilage surgery and future perspectives*. - Springer Berlin, Heidelberg, New York. 2003. Pp. 37-48.
 12. **Teplyashin A.S., Korjikova S.V., Sharifulina S.Z., Chupikova N.I., Rostovskaya M.S., Vasyunina N.Y., Savtchenkova I.P.** Engineering cartilage-like tissue using adipose-derived adult stem cells and collagen scaffolds // *Tissue Engineering*. 2006. No. 12. P. 1117.
 13. **Teplyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. United States Patent No. 7,915,039 B2.
 14. **Teplyashin A.S.** Method for obtaining mesenchymal stem cells. 2011. European patent No. 1 733 027 B1.
 15. **Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., et al.** Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees // *Osteoarthritis cartilage*. 2002. No. 10. Pp. 199-206.
 16. **Zeile G.** Intracytoplasmic immunofluorescence in multiple myeloma // *Cytometry*. 1980. No. 1. Pp. 37-41.
 17. **Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., de Ugarte D.D., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraiser J.K., Benhaim P., Hedrik M.H.** Human adipose tissue is source of multipotent stem cells // *Mol. biol. cell*. 2002. No. 13. Pp. 4279-4295.
 18. **Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrik M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* 2001. No. 7. Pp. 211-226.

Prospects of clinical application of multipotent mesenchymal stromal cells for regeneration of hyaline cartilaginous tissue

S.V. Korzhikova, E.V. Frolov, Z.A. Teplyashin, V.N. Volovenko, A.S. Teplyashin

Developed biotransplant for intra-articular introduction multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) adipose tissue (AT) and gel media to promote regeneration of hyaline cartilage tissue. Selection of cells based on the ability of MMSCs to differentiate into adipose cartilage cells (chondroblasts and chondrocytes) for induction to chondrodysplastic. Optimal carrier to deliver the cells in the defect, the consistency is similar to synovial fluid, supporting the viability, proliferative activity and chondrogenic potential of MSC inside the joint. It is demonstrated that with intra-articular introduction of rabbits biotransplant consisting of autologous MMSC AT and gel media on the basis of derivatives of cellulose is a complete regeneration of the defect with hyaline cartilaginous tissue.

Key words: biological transplant, hyaline cartilage, joint cartilage defect, differentiation, rabbits, multipotent mesenchymal stromal cells.

Выживаемость NGF-модифицированных эмбриональных стволовых клеток мышцы в составе многоклеточной бластоцисты

Л.М. Межевикина, Е.А. Храмцова, Е.Е. Фесенко

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Московская область

Контактная информация: Межевикина Людмила Михайловна, mezhevikina@rambler.ru

Исследовано влияние микроокружения на рост и выживаемость NGF-модифицированных эмбриональных стволовых клеток (NGF-ЭСК) мышцы с экспрессией зеленого флуоресцирующего белка GFP в составе многоклеточной бластоцисты. Показано, что после микроинъекции NGF-ЭСК мигрируют и встраиваются преимущественно в область расположения клеток внутренней клеточной массы (ВКМ). Они продуцируют NGF и GFP и могут пролиферировать в составе химерной бластоцисты. При увеличении длительности культивирования химерных бластоцист до 120 ч наблюдается снижение интенсивности флуоресценции белка GFP, секреция NGF не обнаруживается.

Полагаем, что это происходит в результате перепрограммирования NGF-ЭСК под влиянием клеток ВКМ, в результате чего подавляется экспрессия NGF/GFP и, следовательно, преждевременная дифференцировка ЭСК в направлении нейроэктодермы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что микроокружение и клеточные взаимодействия играют решающую роль в процессах перехода NGF-ЭСК из состояния плюрипотентности к нейральной дифференцировке, которая является базовой на ранних стадиях развития.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, микроинъекция, бластоциста, плюрипотентность, дифференцировка, фактор роста нервов (NGF).

Введение

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мышцы и их клональные потомки, полученные путем генетических модификаций, служат моделями для изучения механизмов роста и дифференцировки, получения химерных и трансгенных животных, исследования функций генов. Являясь производными клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) на стадии бластоцисты, ЭСК сохраняют в культуре *in vitro* и после микроинъекции (МИ) в бластоцисту свой плюрипотентный потенциал, могут дифференцироваться в клетки и ткани взрослого организма [7-9, 12, 17]. Метод МИ ЭСК в бластоцисты является одним из приемов для обновления линии и получения

гомогенной клеточной популяции [1, 24]. Он нашел применение и для изучения пластичности тканеспецифичных стволовых клеток [14, 21]. В частности, установлено, что нейральные стволовые клетки встраиваются преимущественно в гемопоэтическую линию клеток зародышей и взрослых мышей, в меньшей степени – в ткани нервной системы [11].

На данный момент получены клоны нейральных и мезенхимных стволовых клеток костного мозга, модифицированные геном *Ngf*, ответственным за продукцию фактора роста нервов NGF (Nerve Growth Factor) [26]. Этот фактор необходим для поддержания жизнеспособности периферических нейронов, происходящих из нервного гребня, и

нейронов головного мозга [22]. Он участвует в формировании болевой чувствительности [16] и в процессах обучения [6]. Во взрослом организме NGF является регулятором воспалительных процессов [20]. Клетки-продуценты NGF после трансплантации могут выживать и дифференцироваться в нейроноподобные производные [13]. Такие культуры могут представлять интерес для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Целью данной работы было исследование особенностей встраивания NGF-модифицированных ЭСК мыши (NGF-ЭСК) в состав многоклеточной бластоцисты, а также влияния эндогенной продукции NGF на рост эмбриональных клеток после выхода бластоцисты из оболочки.

Для выявления динамики распределения NGF-ЭСК на разных стадиях предимплантационного развития мы провели модельные эксперименты *in vitro*.

Материалы и методы

Объекты исследования. В опытах использовали инбредных мышей линии NMRI, полученных из питомника филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пушино, Московская обл.). Клоны NGF-ЭСК были получены с любезного разрешения зав. лабораторией генетики соматических клеток, д.б.н., проф. И.А. Гривенникова (Институт молекулярной генетики РАН, Москва). Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Федерации Европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных

исследованиях (Federation of European Laboratory Animal Science Association, FELASA).

Выделение зародышей на стадии бластоцисты. Для выделения бластоцист использовали метод гормональной стимуляции самок в возрасте 8-10 недель путем введения 10 ед. фолликуло-стимулирующего (Мосапроген, Россия) и, через 52 ч, 10 ед. хорионического гонадотропного гормона (ХГГ) человека (Московский эндокринный завод). После введения ХГГ самок подсаживали к самцам из расчета 1:1. Утром на следующий день отбирали животных с копулятивными пробками. День обнаружения пробки считали первым днем беременности. Зародыши на стадиях бластоцисты выделяли из рогов матки на 3,5 день после обнаружения копулятивной пробки.

Выделение и культивирование бластоцист проводили в среде Виттена на основе бикарбонатного буфера [18], модифицированной с помощью органического буфера HEPES для стабилизации pH 7,2 при работе с эмбрионами на открытом воздухе (модифицированная среда Виттена, МСВ). Отбор эмбрионов на стадии средней и поздней бластоцисты проводили под инвертированным микроскопом с модификацией объектива по Хоффману (Olympus, тип IX-70, Япония). При этом учитывали размеры полости бластоцист, наличие неповрежденной блестящей оболочки (*zona pellucida*), прозрачность перивителлинового пространства, расположение клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофобласта (ТБ) относительно друг друга.

Культивирование NGF-ЭСК. Для культивирования использовали среду ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы 4,5 г/л (Биолот, Россия),

2 mM L-глутамин (Helicon); 1 mM Напирувата; 0,1 mM 2-меркаптоэтанола (Gibco, США); 1 mM заменимых аминокислот (ПанЭко, Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США). В среду дополнительно добавляли 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF мыши (Sigma, США). Культивирование проводили на 60 мм чашках Петри (Nunc), предварительно покрытых 0,1% р-ром желатина. Максимальная длительность культивирования стволовых клеток в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) составляла 72 ч. Клетки перед МИ оценивали по морфологии и по максимальной GFP-флуоресценции при длине волны 488 нм. Интенсивность флуоресценции GFP определяли с помощью встроенного светофильтра для Axiovert 40 CFL (Германия).

Микроинъекция (МИ) ЭСК. В полость каждой бластоцисты вводили по 50 нл МСВ (контроль) и/или 10-12 стволовых клеток в таком же объеме МСВ (опыт). Процедуру МИ проводили на микроманипуляторе «TransferMan NK» (Erpendorf, Германия), совмещенным с инвертированным микроскопом Olympus (Япония) с настройками объективов по Хоффману. Использовали стандартные капилляры VacuTips и TransferTips (ES) с внутренним диаметром 15 мкм для переноса ЭСК в полость бластоцисты (Erpendorf, Германия).

Морфофункциональная оценка бластоцист после МИ. Морфологию бластоцист оценивали через каждые 24 ч культивирования в МСВ путем прямых микроскопических наблюдений. Максимальная длительность культивирования бластоцист до образования первичных колоний (ПК) составляла 120 ч. Регистрировали число эмбрионов, вышед-

ших из *z. pellucida* и сформировавших ПК, локализацию инъецированных клеток в бластоцисте и ПК, размеры и количество клеток ВКМ и ТБ. В качестве контроля использовали интактные бластоцисты, не подвергавшиеся МИ.

Цитохимическое выявление эндогенных щелочных фосфатаз (ЭЩФ). Для этого ПК фиксировали охлажденным ацетоном в течение нескольких секунд, подсушивали на воздухе, после чего инкубировали в течение 1 ч при 37°C в р-ре с α -нафтол-AS-BI-фосфатом (ICN, Calbiochem) и красителем ВВ синим (ICN, Calbiochem). Окрашивание колоний свидетельствовало о высоком плюрипотентном потенциале клеток.

Дифференцировка клеток в ПК. Дифференцированные клетки в составе ПК выявляли через 72, 96 и 120 ч культивирования по экспрессии тканеспецифических маркера NGF и фактора плюрипотентных клеток Nanog. Исследования проводили под инвертированным микроскопом Axiovert 40 CFL (Zeiss, Германия). Число клеток, меченных FITC, относили к общему числу клеток в ПК, меченных Hoechst33258, их соотношение выражали в процентах.

Выявление Nanog и FGF. Колонии фиксировали в 2,5% р-ре глутарового альдегида на фосфатном буфере (PBS) при температуре 37°C в течение 60 мин. Затем фиксированные препараты трижды промывали в PBS и дополнительно фиксировали в течение 30 мин охлажденным до -20°C абсолютным этиловым спиртом. После фиксации препараты тщательно промывали в PBS, покрывали блокирующим р-ром (5% р-р бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере с добавлением флуоресцентного красителя Hoechst33258 в разведении 1:1000).

В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела кролика против факторов Nanog и NGF (Santa Cruz Biotechnology, США, 1:500). В качестве вторичных антител использовали козы антитела против кролика, конъюгированные с флуоресцентным красителем FITC (Jackson ImmunoResearch laboratories, США, 1:200). После каждой процедуры клетки отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Клетки, меченные антителами, выявляли с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DM6000B» с использованием лазеров 494-518 нм для FITC и 353-365 нм для Hoechst33258. В качестве позитивного контроля для флуоресценции FITC использовали первичные эмбриональные фибробласты мыши. Для отрицательного контроля первичные антитела заменялись фетальной бычьей сывороткой.

Анализ изображения. Подсчет клеток в ПК производили с помощью про-

граммы «ImageJ» версии 1.48 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) с дополнительной установкой инструментов для автоматизации анализа изображений. Размеры ПК определяли с помощью программ «PhotoM» и «Photoshop SC6». Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.0. Для сравнения средних значений использовали двухфакторный дисперсионный анализ (тест Холм-Сидака). Цифровые данные представлены в виде относительных величин, их средних значений и указания стандартной ошибки (SE). Динамику развития эмбрионов оценивали с помощью критерия Пирсона (метод χ^2).

Результаты и их обсуждение

Для МИ использовали NGF-ЭСК с сопряженной экспрессией фактора роста нервов NGF и зеленого флуоресцирующего белка GFP (рис. 1Г). Было

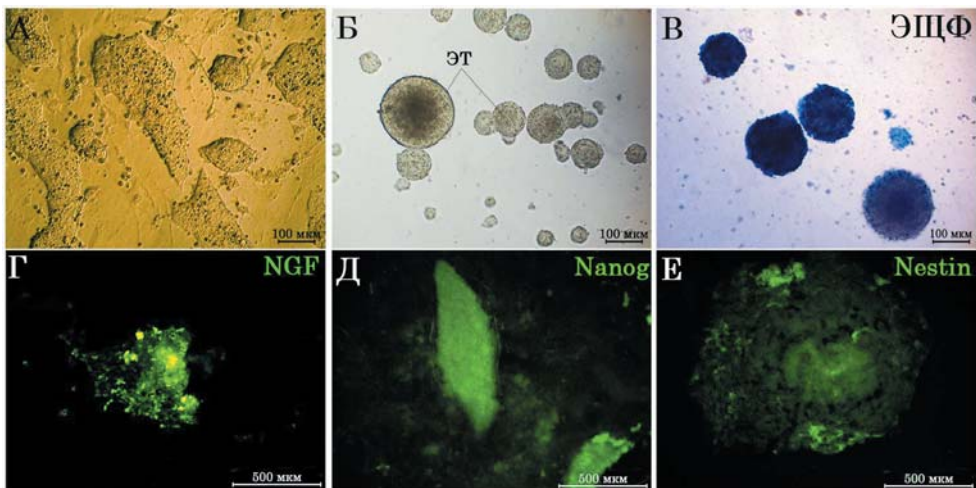


Рис. 1. Морфология эмбриональных стволовых клеток мыши линии R1 (А) и их NGF-трансфицированных потомков (Б) через 72 ч культивирования в среде для стволовых клеток с добавлением 10 нг/мл цитокина LIF. В – тест на активность эндогенной щелочной фосфатазы (ЭЩФ), Г, Д, Е – иммунофлуоресцентный анализ продукции NGF и специфических белков-маркеров Nanog и Nestin соответственно. Антитела меченные FITC. ЭТ – эмбрионное тело.

установлено, что в отличие от ЭСК линии R1, растущих в присутствии цитокина LIF колониями (рис. 1А), их трансфицированные NGF-потомки растут и размножаются *in vitro* в суспензии с образованием эмбриоидных тел (рис. 1Б). Через 72 ч культивирования эмбриоидные тела достигают сравнительно больших размеров (100-300 мкм), адгезируют на поверхности культуральной чашки и формируют колонию (рис. 1Г, Д, Е). В течение этого времени NGF-ЭСК обнаруживают положительную реакцию на выявление ЭЩФ (рис. 1В) и транскрипционного фактора плюрипотентных клеток Nanog (рис. 1Д), продуцируют фактор ранней нейральной дифференцировки – Nestin (рис. 1Е). Та-

кие клетки отбирали для МИ по морфологии и интенсивности флуоресценции GFP, что позволило контролировать их расположение в составе многоклеточной бластоцисты (рис. 2).

МИ проводили в полость средних и поздних бластоцист, поскольку на этих стадиях эмбрионы мышей устойчивы к механическому и осмотическому стрессу [1, 4]. Влияние NGF-ЭСК на развитие химерных бластоцист оценивали по двум основным критериям: 1) способности выходить из оболочки (хетчинг от англ. «hatching» – вылупление из яйца); 2) эффективности образования ПК, представляющей собой единую популяцию взаимодействующих клеток ВКМ и трофобласта (ТБ) в системе *in vitro*.

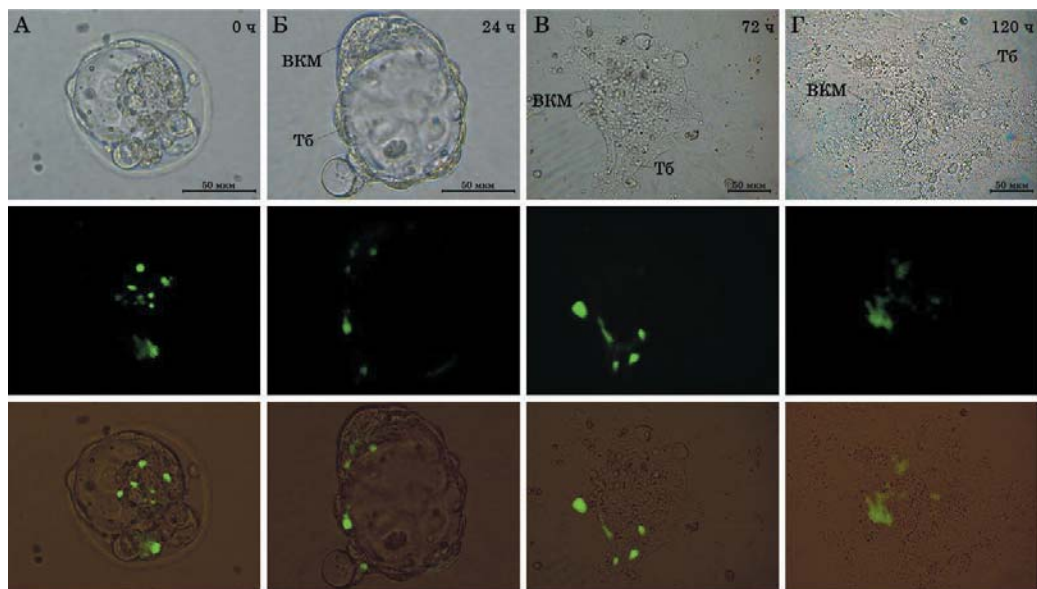


Рис. 2. Идентификация NGF-ЭСК мыши с экспрессией зеленого флуоресцентного белка GFP в химерной бластоцисте мыши: А – морфология бластоцисты сразу после микроинъекции; Б – через 24 ч после хетчинга *in vitro* (стадия расширенной или экспандированной бластоцисты без оболочки), В – через 72 ч и Г – 120 ч культивирования бластоцисты в виде первичной колонии. I ряд – бластоциста в проходящем свете, II ряд – флуоресценция белка GFP при длине волны синего света 488 нм, III ряд – проходящий свет и синий свет. ВКМ – клетки внутренней клеточной массы, ТБ – полярные клетки трофобласта. Ув. x20.

Результаты этих исследований показали, что сразу после МИ происходит резкое сокращение внутреннего объема бластоцисты за счет быстрого выхода избытка жидкости в перивителлиновое пространство (рис. 2А). При этом увеличивается объем перивителлинового пространства и наблюдается перераспределение клеток ТБ и ВКМ относительно друг друга. Клетки ВКМ, расположенные в виде компактной группы на одном из полюсов бластоцисты, перемешиваются с более крупными полярными клетками ТБ. Несмотря на такие серьезные нарушения морфологии, NGF-ЭСК обнаруживаются после МИ не в полости бластоцисты, а среди клеток ТБ и ВКМ (рис. 2А). Судя по нашим наблюдениям и расчетным данным, их число в составе химерных бластоцист не увеличивается в течение первых суток культивирования. В это время происходит восстановление морфологии бластоцисты и осуществляется их хетчинг, сопровождающийся потерей оболочки и накачиванием жидкости во внутренней полости (рис. 2Б).

В контрольной группе бластоцист, не подвергавшихся МИ, хетчинг происходит с задержкой по времени, как правило, на 2-3 сутки культивирования. Интактные и химерные бластоцисты различались между собой только по эффективности хетчинга и колониеобразования *in vitro* (рис. 2В). Через 72 ч культивирования NGF-ЭСК обнаруживались преимущественно в области расположения клеток ВКМ. Там они компактизовались в отдельную группу, и только небольшая их часть выявлялась в виде разрозненно светящихся 3-4 клеток на периферии колонии, образованной более крупными

клетками ТБ (рис. 2В). При увеличении длительности культивирования до 120 ч в химерных бластоцистах обнаруживались, с одной стороны, более слабая интенсивность флуоресценции белка GFP, с другой, – явное увеличение количества NGF-ЭСК в области расположения клеток ВКМ (рис. 2Г).

В этих экспериментах не было выявлено негативного влияния продукции белка GFP и NGF на развитие химерных бластоцист *in vitro*. Прямой подсчет клеток ВКМ и ТБ в первичных колониях показал, что процедура МИ оказывает стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию (табл.). Введение в полость бластоцисты 50 мкл МСВ (контроль) или в таком же объеме 10-12 стволовых клеток (опыт) способствовало более активному росту клеток ВКМ и ТБ по сравнению с интактными бластоцистами. Разрастание интактных бластоцист осуществлялось в основном за счет более интенсивной пролиферации ТБ, о чем свидетельствовало изменение соотношения клеток ТБ/ВКМ с 4,9 до 7,2 в течение 24 ч инкубирования *in vitro* (119/24 и 276/38 соответственно). После инъекции МСВ этот показатель оставался практически без изменений в пределах 6,0-6,25. В опытной группе бластоцист, напротив, показатель соотношения ТБ/ВКМ снижался с 6,0 до 5,3 (218/36 и 328/61 соответственно). Такая ситуация возможна в результате стимулирующего влияния NGF-ЭСК на рост клеток ВКМ в составе ПК (табл.).

Мы предположили, что в этом случае возможно как индукционное действие клеток ВКМ на митотическую активность NGF-ЭСК в составе химерной бластоцисты, так и влияние эндогенной продукции NGF на клеточную

Таблица

Число клеток ТБ и ВКМ в первичных колониях, развившихся из бластоцист мышей линии NMRI в культуре *in vitro*

Количество бластоцист	Клетки ТБ		Клетки ВКМ	
	72 ч	96 ч	72 ч	96 ч
Контроль (МИ МСВ, n=8)	202,8±29,0 ^a	261,5±21,3	33,4±5,1	41,8±8,7
Опыт (МИ NGF-ЭСК, n=7)	218,4±28,9 ^b	328,0±20,8 ^c	36,4±5,7	61,8±10,7 ^c
Интактная бластоциста (n=10)	119,4±44,7 ^{a,b}	276,5±31,6	24,2±1,9 ^c	38,48±3,2

Примечание: контроль – микроинъекция в полость бластоцисты 50 мкл модифицированной среды Виттена (МСВ, рН=7,2), опыт – микроинъекция 10-12 NGF-ЭСК в таком же объеме МСВ. ТБ – клетки трофобласта, ВКМ – клетки внутренней клеточной массы, n – количество инъецированных бластоцист. ^{a,b,c}- достоверность различий (p < 0,05).

пролиферацию. Из литературных данных известно, что клетки ВКМ играют важную роль в поддержании стабильности свойств ТБ [18]. При нарушении их взаимодействия с ТБ происходит потеря пролиферативной активности в результате эндорепликации ДНК, приводящей к полиплоидии и трансформации в первичные гигантские клетки трофобласта.

Детальный анализ химерных бластоцист подтвердил, что через 72 ч культивирования NGF-ЭСК локализуются в непосредственно близости от клеток ВКМ (рис. 3а), сохраняют способность продуцировать NGF (рис. 3б) и фактор Nanog (рис. 4а, б). По расположению NGF-ЭСК на очень близком расстоянии друг от друга можно судить о митотической активности (рис. 4б). Через 120 ч

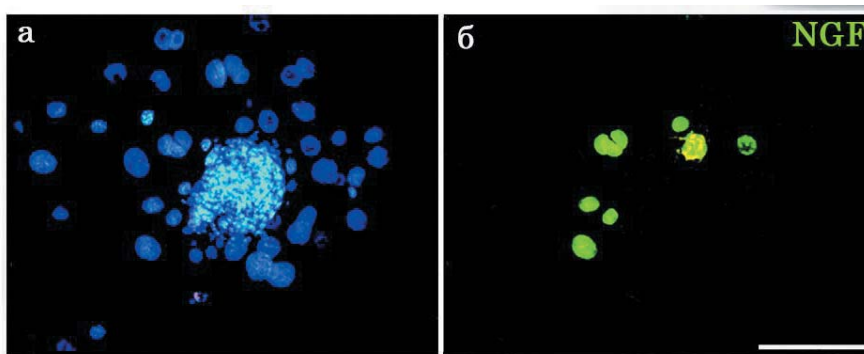


Рис. 3. NGF-позитивные стволовые клетки, встроенные в эмбриональную колонию после микроинъекции: а – ядра клеток, меченные флуоресцентным красителем Hoechst 33258; б – NGF-позитивные клетки, экспрессирующие зеленый флуоресцирующий белок GFP, меченые FITC. Длительность культивирования первичных колоний – 72 ч. Шкала – 50 мкм.

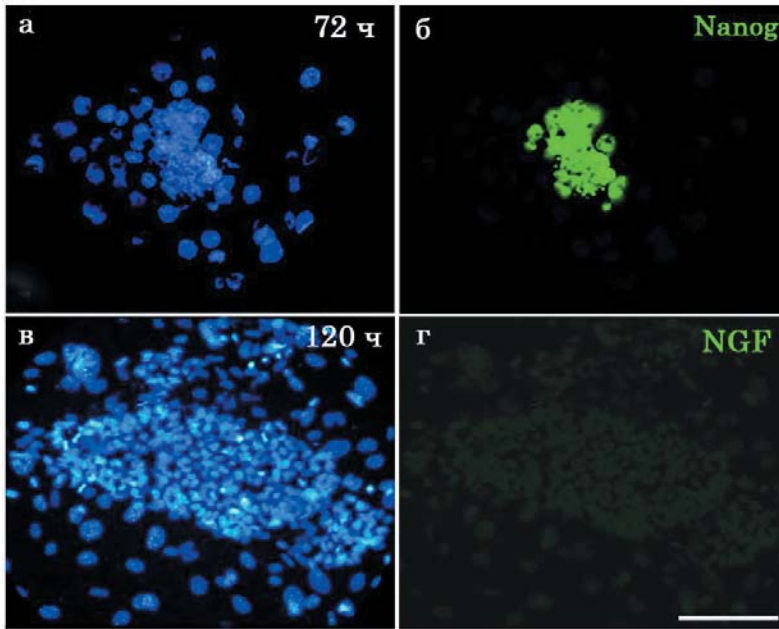


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркера плюрипотентности *Nanog* и нейротрофического фактора *NGF* в первичных колониях, развившихся из химерных NGF-ЭСК бластоцист: а, б – колония через 72 ч после хетчинга бластоцисты из *Z. pellucida*; в, г – отсутствие экспрессии NGF через 120 ч культивирования *in vitro*. Ядра клеток, меченые Hoechst 33258 (а, в); антитела, меченые FITC (б, г). Шкала – 100 мкм.

культивирования продукция эндогенного белка NGF в химерных бластоцистах не обнаруживалась (рис. 4г).

Таким образом, в ходе наших исследований было установлено, что NGF-ЭСК в составе многоклеточной бластоцисты обладают пролиферативной активностью, способны мигрировать после выхода бластоцисты из оболочки и встраиваться преимущественно в область расположения клеток ВКМ. Другое, не менее важное, наблюдение касается снижения интенсивности флуоресценции GFP и секреции NGF при увеличении длительности культивирования химерных бластоцист до 120 ч (рис. 2Г, рис. 4г). Белок GFP широко используется как прижизненный маркер для обнаружения клеток в гетерогенных

популяциях [25]. Известно также, что он нетоксичен и обладает стабильным свечением [2, 3, 5, 23]. Наблюдаемое в нашем случае снижение интенсивности флуоресценции GFP, по всей видимости, происходит под влиянием паракринной регуляции со стороны клеток ВКМ, которые могут перепрограммировать ЭСК со сменой паттернов экспрессии генов, ответственных за продукцию GFP и NGF. Такое предположение согласуется с данными о том, что встраивание чужеродных клеток в бластоцисту может приводить к изменению их эпигенетического статуса и, следовательно, профиля генетической экспрессии [17].

Очевидно, перепрограммирование NGF-ЭСК в составе химерной бластоцисты направлено на подавление экс-

прессии NGF и преждевременной нейральной дифференцировки до момента имплантации бластоцисты в матку. Этот фактор начинает синтезироваться в эмбриональных клетках только во время закладки нервной трубки [22]. Однако рецепторы к нейротрофинам обнаруживаются на более ранних стадиях развития, начиная с яйцеклетки [15, 19], что подтверждают наши данные о влиянии NGF-ЭСК на пролиферацию клеток ВКМ и ТБ (табл.). Ранние эмбрионы мышей, в т.ч. и бластоцисты, чувствительны к действию NGF, хотя этот фактор необходим в большей степени для поддержания жизнеспособности периферических нейронов, происходящих из нервного гребня, и нейронов головного мозга [22]. Эмбрионы мышей с нокаутом по гену *Ngf*^{-/-} и дефицитом NGF могут имплантироваться в матку и выживать в организме матери. Их гибель происходит на 4-й неделе после рождения в результате задержки развития верхних цервикальных и спинных ганглиев (до 70%), значительного снижения диаметра нейронов [10].

Выводы

NGF-модифицированные ЭСК в составе многоклеточной бластоцисты восстанавливают свойства плюрипотентности под влиянием паракринной регуляции клеток ВКМ. При этом ЭСК теряют способность продуцировать NGF. Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что микроокружение и клеточные взаимодействия играют решающую роль в процессах перехода NGF-ЭСК из состояния плюрипотентности к нейральной дифференцировке, которая является базовой на ранних стадиях развития.

Список литературы

1. *Межевикина Л.М., Храмцова Е.В., Смолихина Т.И., Капралова И.В., Косовский Г.Ю.* Использование метода микроинъекции для повышения эффективности выделения первичных колоний из бластоцист инбредных линий мышей в условиях *in vitro* // Биомедицина. - 2016. - № 1. - С. 25-36.
2. *Сахарова Н.Ю., Межевикина Л.М., Смирнов А.А., Вихлянцева Е.Ф.* Анализ действия синего света на морфофункциональное состояние бластоцист при культивировании *in vitro* с использованием мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2014. - № 1. - С. 52-56.
3. *Смирнов А.А., Шишова Н.В., Сахарова Н.Ю., Селезнева И.И., Малащенко А.М.* Локализация зеленого флуоресцирующего белка в доимплантационных зародышах мышей // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2008. - № 1. - С. 39-44.
4. *Храмцова Е.А., Межевикина Л.М., Фесенко Е.Е.* Роль клеток трофобласта в регуляции выживаемости бластоцист мыши *in vitro* после микроинъекции и осмотического шока // Биофизика. - 2014. - Т. 49. - Вып. 2. - С. 314-321.
5. *Artus J., Hadjantonakis A.K.* Troika of the mouse blastocyst: lineage segregation and stem cells // *Curr Stem Cell Res. Ther.* - 2012. - V. 7. - No. 1. - Pp. 78-91.
6. *Berry A., Bundocci E., Alleva E.* NGF, brain and behavior plasticity // *Neural. Plast.* - 2012. - V. - 2012. - 784040 p.
7. *Bradley A.* Production and analysis of chimeric mice // In: *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach* (ad. Robertson E.J.). - 1987. - Oxford, Washington, DS: IRL Press. - Pp. 113-152.
8. *Brook F.A., Gardner R.L.* The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1997. - V. 94. - Pp. 5709-5712.
9. *Cassidy R., Frisen J.* Stem cells on the brain // *Nature.* - 2001. - V. 412. - Pp. 690-691.
10. *Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C., Chen K.S., Pitts-Meek S., Armanini M.P., Ling L.H., McMahon S.B., Shelton D.L., Levinson A.D., Philips H.S.* Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain

- cholinergic neurons // *Cell*. - 1994. - V. 76. - No. 6. - Pp. 1001-1011.
11. **Harder F., Kirchof N., Petrovic S., Wiese S., Müller A.M.** Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts // *Exp. Hematol.* - 2004. - V. 32. - No. 7. - Pp. 673-682.
 12. **Hochedlinger K., Jaenisch R.** Nuclear reprogramming and pluripotency // *Nature*. - 2006. - V. 441. - Pp. 1061-1067.
 13. **Hu Y., Zhang Y., Tian K., Xun C., Wang S., Li D.** Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor dual gene modification on rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells *in vitro* // *Mol. Med. Rep.* - 2016. - V. 13. - No. 1. - Pp. 49-58.
 14. **Jiang R., Huang B., Jin C., Song G., Zhong X., Yuan J., Xiang P., He Y., Liu B., Sun X., Zhang Y., Ge J.** A potential model for studding the plasticity and reprogramming of human epidermal stem cells through preimplantation blastocyst microinjection // *Cell Biol. Int.* - 2008. - V. 32. - No. 12 - Pp. 1567-1573.
 15. **Kawamura K., Kawamura N., Fukuda J., Kumagai J., Hsueh A.J., Tanaka T.** Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor // *Dev. Biol.* - 2007. - V. 311. - No. 1. - Pp. 147-158.
 16. **Kelleher J.H., Tewari D., McMahon S.B.** Neurotrophic factors and their inhibitors in chronic pain treatment // *Neurobiol. Dis.* - 2016 (pii: S0969-9961(16)30071-7).
 17. **Madich A., Richardson G.D., Jahoda C.A.B.** Contribution of GFP Expressing Dermal Papillae Cells to the Formation of Chimeric Embryos and their Survival in Uterine Environment // *British Biotechnology J.* - 2016. - V. 12. - No. 2. - Pp. 1-12.
 18. **Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R.** Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual // Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York. - 2003.
 19. **Pei Y.** Effect of nerve growth factor (NGF) on the development of preimplantation rabbit embryos *in vitro* // *Vet. Res. Commun.* - 2010. - V. 34. - No. 1. - Pp. 11-18.
 20. **Pezet S., McMahon S.B.** Neurotrophins: mediators and modulators of pain // *Annu. Rev. Neurosci.* - 2006. - V. 29. - Pp. 507-538.
 21. **Soncin F., Ward C.M.** The function of E-cadherin in stem cell pluripotency and self-renewal // *Genes*. - 2011. - V. 2. - No. 1. - Pp. 229-259.
 22. **Wyatt T.J., Rossi S.L., Siegenthaler M.M., Frame J., Robles R., Nistor G., Keirstead H.S.** Human motor neuron progenitor transplantation leads to endogenous neuronal sparing in 3 models of motor neuron loss // *Stem Cells Int.* - 2011. - V. 2011. - Pp. 207230.
 23. **Xenopoulos P., Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K.** Live imaging fluorescent proteins in early mouse embryos // *Methods Enzymol.* - 2012. - V. 506. - Pp. 361-389.
 24. **Xu H., Yi B.A., Wu H., Bock C., Gu H., Lui K.O., Park J.H., Shao Y., Riley A.K, Domian I.J., Hu E., Willette R., Lepore J., Meissner A., Wang Z., Chien K.R.** Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature // *Cell Res.* - 2012. - V. 22. - No. 1. - Pp. 142-54.
 25. **Zhang S., Ma C., Chalfie M.** Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins // *Cell*. - 2004. - V. 119. - No. 1. - Pp. 137-144.
 26. **Zhu S.X., Huang S.Y., Su Y.M., Cai P.** Growth and expression of rat bone marrow mesenchymal stem cells modified by nerve growth factor in diabetic rat bladders // *Mol. Med. Rep.* - 2013. - V. 7. - No. 6. - Pp. 1791-1799.

References

1. **Mezhevikina L.M., Hramcova E.V., Smolihina T.I., Kapralova I.V., Kosovskij G.Ju.** Ispol'zovanie metoda mikroin#ekcii dlja povyshenija jeffektivnosti vydelenija pervichnyh kolonij iz blastocist inbrednyh linij myshej v uslovijah *in vitro* // *Biomedicina*. - 2016. - № 1. - C. 25-36.
2. **Saharova N.Ju., Mezhevikina L.M., Smirnov A.A., Vihljanceva E.F.** Analiz dejstvija sinego sveta na morfofunkcional'noe sostojanie blastocist pri kul'tivirovanii *in vitro* s ispol'zovaniem myshej, nesushhh gen uluchshennogo zelenogo fluorescirujushhego belka (EGFP) // *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. - 2014. - № 1. - C. 52-56.
3. **Smirnov A.A., Shishova N.V., Saharova N.Ju., Selezneva I.I., Malashenko A.M.** Lokalizacija zelenogo fljuorescirujushhego belka v doimplantacionnyh zarodyshah myshej // *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. - 2008. - № 1. - C. 39-44.
4. **Hramcova E.A., Mezhevikina L.M., Fesenko E.E.** Rol' kletok trofoblata v reguljácii vyzhivaemosti blastocist myshi *in vitro* posle mikroinjekcii i osmoticheskogo shoka // *Biofizika*. - 2014. - T. 49. - Vyp. 2. - S. 314-321.

5. **Artus J., Hadjantonakis A.K.** Troika of the mouse blastocyst: lineage segregation and stem cells // *Curr Stem Cell Res. Ther.* – 2012. – V. 7. – No. 1. – Pp. 78-91.
6. **Berry A., Bundocci E., Alleva E.** NGF, brain and behavior plasticity // *Neural. Plast.* - 2012. - V. - 2012. – 784040 p.
7. **Bradley A.** Production and analysis of chimeric mice // In: *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach* (ed. Robertson E.J.). – 1987. - Oxford, Washington, DS: IRL Press. - Pp. 113-152.
8. **Brook F.A., Gardner R.L.** The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. - V. 94. - Pp. 5709-5712.
9. **Cassidy R., Frisen J.** Stem cells on the brain // *Nature.* – 2001. – V. 412. - Pp. 690-691.
10. **Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C., Chen K.S., Pitts-Meek S., Armanini M.P., Ling L.H., McMahon S.B., Shelton D.L., Levinson A.D., Philips H.S.** Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons // *Cell.* - 1994. - V. 76. - No. 6. - Pp. 1001-1011.
11. **Harder F., Kirchhof N., Petrovic S., Wiese S., Müller A.M.** Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts // *Exp. Hematol.* - 2004 - V. 32. - No. 7. - Pp. 673-682.
12. **Hochedlinger K., Jaenisch R.** Nuclear reprogramming and pluripotency // *Nature.* - 2006. - V. 441. - Pp. 1061-1067.
13. **Hu Y., Zhang Y., Tian K., Xun C., Wang S., Li D.** Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor dual gene modification on rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells *in vitro* // *Mol. Med. Rep.* – 2016. - V. 13. – No. 1. - Pp. 49-58.
14. **Jiang R., Huang B., Jin C., Song G., Zhong X., Yuan J., Xiang P., He Y., Liu B., Sun X., Zhang Y., Ge J.** A potential model for studding the plasticity and reprogramming of human epidermal stem cells through preimplantation blastocyst microinjection // *Cell Biol. Int.* – 2008. - V. 32. – No. 12 – Pp. 1567-1573.
15. **Kawamura K., Kawamura N., Fukuda J., Kumagai J., Hsueh A.J., Tanaka T.** Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor // *Dev. Biol.* - 2007. - V. 311. - No. 1. - Pp. 147-158.
16. **Kelleher J.H., Tewari D., McMahon S.B.** Neurotrophic factors and their inhibitors in chronic pain treatment // *Neurobiol. Dis.* – 2016 (pii: S0969-9961(16)30071-7).
17. **Madich A., Richardson G.D., Jahoda C.A.B.** Contribution of GFP Expressing Dermal Papillae Cells to the Formation of Chimeric Embryos and their Survival in Uterine Environment // *British Biotechnology J.* – 2016. - V. 12. – No. 2. – Pp. 1-12.
18. **Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R.** Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual // Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York. - 2003.
19. **Pei Y.** Effect of nerve growth factor (NGF) on the development of preimplantation rabbit embryos *in vitro* // *Vet. Res. Commun.* – 2010. – V. 34. – No. 1. – Pp. 11-18.
20. **Pezet S., McMahon S.B.** Neurotrophins: mediators and modulators of pain // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – V. 29. – Pp. 507-538.
21. **Soncin F., Ward C.M.** The function of E-cadherin in stem cell pluripotency and self-renewal // *Genes.* – 2011. - V. 2. - No. 1. - Pp. 229-259.
22. **Wyatt T.J., Rossi S.L., Siegenthaler M.M., Frame J., Robles R., Nistor G., Keirstead H.S.** Human motor neuron progenitor transplantation leads to endogenous neuronal sparing in 3 models of motor neuron loss // *Stem Cells Int.* – 2011. - V. 2011. – Pp. 207230.
23. **Xenopoulos P., Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K.** Live imaging fluorescent proteins in early mouse embryos // *Methods Enzymol.* – 2012. – V. 506. – Pp. 361-389.
24. **Xu H., Yi B.A., Wu H., Bock C., Gu H., Lui K.O., Park J.H., Shao Y., Riley A.K, Domian I.J., Hu E., Willette R., Lepore J., Meissner A., Wang Z., Chien K.R.** Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature // *Cell Res.* – 2012. – V. 22. – No. 1. – Pp. 142-54.
25. **Zhang S., Ma C., Chalfie M.** Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins // *Cell.* – 2004. – V. 119. – No. 1. – Pp. 137-144.
26. **Zhu S.X., Huang S.Y., Su Y.M., Cai P.** Growth and expression of rat bone marrow mesenchymal stem cells modified by nerve growth factor in diabetic rat bladders // *Mol. Med. Rep.* – 2013. – V. 7. – No. 6. – Pp. 1791-1799.

The survival of NGF-modified embryonic stem cell in mouse multicellular blastocyst

L.M. Mezhevikina, E.A. Khramtsova, E.E. Fesenko

We investigated the effect of the microenvironment on the growth and survival of NGF-modified embryonic stem cells (NGF-ESC) with the expression of green fluorescent protein GFP in mouse multicellular blastocyst. Our results show that after the microinjection (MI), NGF-ESC migrate and co-culture primarily in the region of inner cell mass (ICM). They produce NGF and GFP and are capable for proliferation in chimeric blastocyst. However, if the cultivation period is prolonged to 120 hours, the decrease in the intensity of GFP fluorescence strength and NGF secretion is observed. We conjecture that this occurs as a result of reprogramming of NGF-ESC under the influence of ICM leading to the suppression of NGF/GFP expression and, therefore, earlier differentiation of ESC towards the neuroectoderm. Obtained results indicate that the microenvironment and cellular interaction play a key role in transferring NGF-ESC from the state of pluripotency to the neutral differentiation which is basic during the early stages of development.

Key words: embryonic stem cells, microinjection, blastocyst, pluripotency, differentiation, nerve growth factor (NGF).

Механизм антигипоксического действия нового металлокомплекса железа – производного винилимидазола

С.А. Шахмарданова¹, П.А. Галенко-Ярошевский², Ф.Б. Литвин³,
В.В. Тарасов¹, М.Л. Максимов¹, С.С. Сологова¹

¹ – ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

² – ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

³ – ФГБОУ ВПО Смоленская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, Смоленск

Контактная информация: к.б.н. Шахмарданова Светлана Анатольевна, lebedeva502@yandex.ru

В экспериментах на лабораторных животных (белые нелинейные мыши и крысы) изучено новое металлокомплексное соединение железа – производное винилимидазола под шифром «Тетравим» с антигипоксической активностью. Показано, что однократное внутрибрюшинное введение Тетравима в дозе 50 мг/кг не изменяет показатели гемограммы, приводит к снижению окислительного обмена, предотвращению гипогликемии, возникающей в условиях острой гипобарической гипоксии (ОГБГ), улучшению гемодинамики и эффективности кислородного обмена в тканях, уменьшению негативного воздействия ОГБГ на показатели микроциркуляции.

Ключевые слова: антигипоксанты, металлокомплекс железа, гипоксия, окислительный обмен, гемограмма, микроциркуляция.

Введение

Металлокомплексное соединение железа на основе винилимидазола [тетра(1-винилимидазол) железа трихлорид] под шифром «Тетравим» синтезировано в лаборатории акад. Б.А. Трофимова Иркутского института химии имени А.Е. Фаворского СО РАН. В настоящее время показана антигипоксическая активность данного комплекса в широком диапазоне доз (5-250 мг/кг) на моделях острой гипоксии разного генеза (гипобарической, гемической, гистотоксической, гипоксии с гиперкапнией) [9, 16].

Железо – эссенциальный экологически значимый и жизненно необходимый

организму элемент. Он является индуктором перекисного окисления липидов, мощным активатором кроветворения и незаменимым компонентом гемоглобина, миоглобина, ферритина, гемосидерина, лактоферрина и др. белков, обеспечивающих необходимый уровень системного и клеточного метаболизма, принимает участие в транспорте кислорода, окислительно-восстановительных реакциях, входит в состав более ста ферментов (цитохромы, каталазы, пероксидазы, железосеропротеиды и др.), играет важную роль в процессах выделения энергии, ферментативных реакциях, метаболизме холестерина [4, 7, 18, 20, 21]. Роль винилимидазола как лиганда в из-

учаемом металлокомплексе, по-видимому, заключается в обеспечении высокой биодоступности железа.

Цель исследования – изучить влияние Тетравима на окислительный и углеводный обмен, показатели гемограммы, изменения микроциркуляции и определить возможное направление по изучению механизма его антигипоксического действия.

Материалы и методы

Синтез тетравима описан ранее [11]. Структурная формула представлена на рис. 1. ЛД₅₀ для мышей составляет 1625 мг/кг [9, 16].

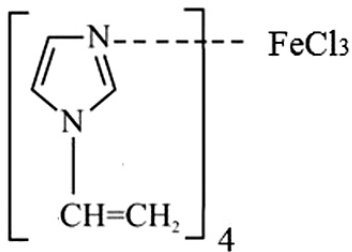


Рис. 1. Структурная формула Тетравима.

Исследования проведены на 120-ти белых нелинейных половозрелых мышах-самцах массой 18-23 г и 40-ка белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180-220 г в соответствии со статьей 11-й Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964), Правилами надлежащей лабораторной практики (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли согласно требованиям ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лаборатор-

ной практики (GLP)» [12]. Животных доставляли из Филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.) и содержали на стандартной диете в условиях свободного доступа к водопроводной очищенной воде. Эксперименты проводили после 20-дневной адаптации в виварии. Животных содержали в соответствии с нормами группового размещения в вентилируемых клетках при температуре 18-20°C и относительной влажности воздуха 60-70% в условиях естественного-искусственного 12-часового цикла освещения.

Тетравим вводили однократно в/б за 1 ч до начала эксперимента в эффективной антигипоксической дозе 50 мг/кг. Контрольные животные тем же путем и в тот же срок получали равный объем дистиллированной воды.

Острую гипобарическую гипоксию (ОГБГ) у мышей вызывали пребыванием на «высоте» 7500 м в электровакуумной печи в течение 20-ти мин. Скорость «подъема» составляла 50 м/с.

Интенсивность окислительного обмена у мышей оценивали по параметрам потребления кислорода и ректальной температуры с использованием разбавителя окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола (DNP) в дозе 5 мг/кг [5]. Потребление кислорода мышами определяли в аппарате закрытого типа конструкции С.В. Миропольского в течение 9-12 мин после предварительной адаптации животных в респираторной камере (10 мин). Количество потребляемого мышами кислорода считывали в мл за 1 мин [13]. Ректальную температуру мышам измеряли с помощью электрического медицинского термометра.

Содержание глюкозы в сыворотке крови мышей регистрировали на биохимическом анализаторе CLIMA MC-15 (RAL, Испания). Морфологические показатели крови мышей, содержание гемоглобина и гематокрита определяли на гематологическом 18-параметровом анализаторе-автомате Exell 18 (Drew, Нидерланды). Забор крови производили из сосудов шеи декапитированного животного через 1 ч после введения Тетравима в условиях нормоксии и после пребывания животных в условиях ОГБГ (20 мин).

Параметры микрогемодинамики и оксигенации крови в системе микроциркуляции оценивали, одновременно используя лазерную доплеровскую флоуметрию и оптическую тканевую оксиметрию. Измерения проводили с помощью многофункционального лазерного диагностического комплекса «ЛАКК-М» (НПП «Лазма», Россия). Капиллярный кровоток оценивали на наружной поверхности кожи бедра задней конечности крысы. Регистрировали показатель микроциркуляции (M), который показывает динамическую характеристику микро-

циркуляции – изменение потока крови в единицу времени в исследуемом объеме ткани около 1 мм³ в относительных перфузионных единицах (пф. ед.), индекс перфузионной сатурации кислорода в микрокровоотоке ($Sm=SO_2/M$, где SO_2 – сатурация микрокровоотока, M – среднее значение перфузии), параметры удельного потребления кислорода тканями ($U=SpO_2/SO_2$, где SpO_2 – сатурация артериальной крови) и эффективность кислородного обмена (E) [8].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Excel XP и STATISTICA 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при $p<0,05$ по сравнению с контрольными значениями.

Результаты и их обсуждение

Изменения показателей окислительного обмена у мышей после введения Тетравима, DNP и их сочетания по сравнению с контрольной группой представлены на рис. 2, 3.

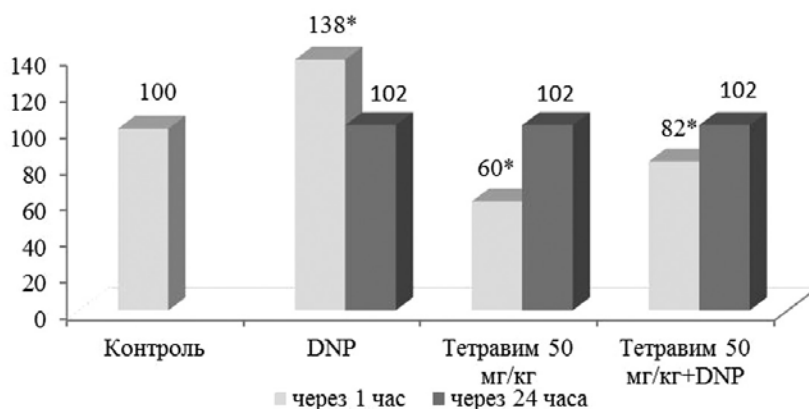


Рис. 2. Влияние Тетравима (50 мг/кг), DNP (5 мг/кг) и их сочетаний на потребление кислорода мышами (n=10).

Примечание: приведены значения в % к контролю, принятому за 100%; * – различия достоверны при $p<0,05$.

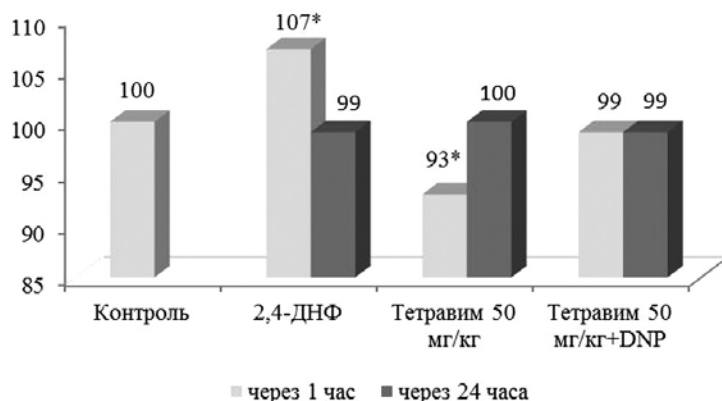


Рис. 3. Влияние Тетравима (50 мг/кг), DNP (5 мг/кг) и их сочетаний на ректальную температуру мышей (n=10).

Примечание – как на рис. 2.

Тетравим снижал потребление кислорода и уменьшал неблагоприятное влияние на этот показатель DNP. Уменьшение параметров окислительного обмена под влиянием Тетравима, возможно, является одной из причин резистентности организма животных к кислородной недостаточности. Известно, что в состоянии пониженного обмена организм приобретает устойчивость к неблагоприятным воздействиям внешней и внутренней среды [10, 15]. Наряду с другими факторами защиты организма в условиях дефицита кислорода целесообразно применение веществ, снижающих интенсивность метаболизма [2, 14].

По всей видимости, Тетравим влияет на механизмы образования энергии в организме через усиление анаэробного пути при кратковременном подавлении аэробного окислительного фосфорилирования. Однако эти предположения требуют проведения дополнительных исследований. Восстановление газообмена спустя сутки после введения соединения можно объяснить его значи-

тельным выведением к этому сроку и/или образованием метаболитов, не влияющих на потребление кислорода. Получение энергии более экономичным путем можно объяснить тем, что соединение вмешивается в механизм сопряжения окисления с фосфорилированием в митохондриях. Поэтому можно предполагать, что исследованный металлокомплекс благоприятно влияет на функции митохондрий в экстремальных условиях, уменьшая разобщение окисления с фосфорилированием [16].

В условиях ОГБГ содержание глюкозы в крови мышей уменьшалось на 25% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями. Уровень глюкозы у животных, которым вводили Тетравим в дозе 50 мг/кг, не изменялся. У мышей, получавших исследуемое металлокомплексное соединение за 1 ч до воздействия гипоксии, концентрация глюкозы практически не отличалась от контрольной группы и на 40% была выше по сравнению с животными, которым не вводили Тетравим до воздействия ОГБГ ($p < 0,05$).

Поскольку главной мишенью для гипоксии является энергетический обмен [6], кислородная недостаточность может быть причиной нарушения различных энергозависимых процессов в клетке и приводить к дисбалансу в обмене веществ, в частности, глюкозы [3]. Тетравим не влиял на содержание глюкозы в крови мышей, но предотвращал гипогликемию, возникающую в условиях ОГБГ.

Воздействие ОГБГ увеличивало содержание эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, что повышает кислородную емкость крови и на уровне организма является компенсаторным приспособлением, выработанным в процессе эволюции в условиях недостатка кислорода [1]. На фоне введения Тетравима в дозе 50 мг/кг в условиях нормоксии и ОГБГ не происходило статистически значимого изменения морфологических показателей крови, гемоглобина и гематокрита (см. табл. 1).

Доставка O₂ к тканям зависит от возможностей системы кровообращения [19], а микроциркуляторное русло является ключевым звеном сопряжения местных тканевых и интегральных систем регуляции структурно-функционального гомеостаза, обеспечивающим соответствие поставки энергетических субстратов и кислорода метаболическим запросам клетки [17]. Под воздействием ОГБГ показатель «М» снижался в 4 раза, что связано с первоочередным перераспределением кровотока в жизненно важные органы, повышением агрегационной активности эритроцитов и тромбоцитов, а также увеличением вязкости цельной крови и плазмы. Вслед за ограничением перфузии в кожных покровах экспериментальных животных закономерно снижаются и показатели транскапиллярного обмена (Sm, U и E), поскольку клетки покровных тканей отличаются повышенной устойчивостью к недостатку кислорода. Спустя 1 ч после введения Тетра-

Таблица 1

Влияние Тетравима (50 мг/кг), ОГБГ и их сочетаний на показатели гемограммы, гемоглобина и гематокрита

Показатель	Контроль	ОГБГ		Тетравим		ОГБГ+Тетравим	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Лейкоциты, x10 ⁹ г/л	5,8±0,3	5,9±1,1	102	6,5±0,2	112	6,5±0,7	112
Лимфоциты, x10 ⁹ г/л	4,3±0,5	4,4±0,3	102	4,9±0,5	114	5,0±0,4	116
Моноциты, x10 ⁹ г/л	1,0±0,1	0,9±0,1	90	1,1±0,1	110	1,1±0,3	110
Гранулоциты, x10 ⁹ г/л	0,5±0,1	0,6±0,1	112	0,5±0,1	100	0,5±0,2	100
Эритроциты, x10 ¹² г/л	5,6±0,5	7,1±0,3	127*	6,1±0,3	109	5,6±0,2	100
Гемоглобин, г/л	131,0±3,9	152,0±1,2	116*	125,0±6,7	96	144±4,1	110
Гематокрит, %	30,2±2,5	34,8±0,2	115*	28,8±3,0	95	30,1±1,2	99
Тромбоциты, x10 ⁹ г/л	375,0±28,0	338,0±19,0	90	338,0±23,0	90	405,0±14,0	108

Примечание: * – различия достоверны при p<0,05.

Влияние Тетравима (50 мг/кг), ОГБГ и их сочетаний на микрогемодинамику и тканевую оксигенацию

Вещество и характер воздействия	М (пф. ед.)		Sm (отн. ед.)		U (отн. ед.)		E (отн. ед.)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Контроль	13,3±1,4	100	4,8±0,58	100	1,9±0,39	100	25,2±1,2	100
ОГБГ	3,1±0,8	23*	3,9±0,23	81*	0,9±0,21	47*	13,5±0,8	54*
Тетравим	17,0±1,2	128*	4,7±0,30	98	2,0±0,70	105	35,3±2,4	140*
Тетравим+ОГБГ	13,7±1,0	103	5,0±0,90	104	2,0±0,45	105	27,5±1,9	109

вима его действие резко ослабевает, что проявляется восстановлением микрокровотока и биогенеза на микроциркуляторном уровне (см. табл. 2).

Выводы

1. Однократное в/б введение Тетравима в дозе 50 мг/кг вызывает уменьшение энергетических запросов организма, повышает его устойчивость к недостатку кислорода, увеличивая, тем самым, продолжительность жизни в условиях острой гипоксии. Тетравим воздействует на функции митохондрий в экстремальных условиях путем уменьшения разобщения окисления с фосфорилированием.

2. Исследуемый металлокомплекс предотвращает гипогликемию, возникающую в условиях ОГБГ, и не изменяет показатели гемограммы.

3. Введение экспериментальным животным Тетравима в дозе 50 мг/кг сопровождается формированием адаптационных процессов на уровне системы микроциркуляции, направленных на ограничение притока крови в обменное звено и снижение обмена кислорода на клеточном уровне.

4. Указанные изменения могут являться факторами механизма антигипоксического действия нового металлокомплекса железа под шифром «Тетравим».

Список литературы

1. Антонов В.С., Богомолова Н.В., Волков А.С. Автоматизация гематологического анализа. Интерпретация показателей гемограммы. – Саратов: Изд-во Сарат. мед. ун-та, 2008. 194 с.
2. Безкицкий Э.Н., Емушинцев П.А., Грошилин С.М. Расширение функциональных возможностей организма водолазов путем комбинированного применения ГБО и гипоксической тренировки // Мат. V Всерос. конф. «Мед.-физиол. пробл. экологии человека». – Ульяновск, 2011. С. 111-113.
3. Германова Э.Л. Нарушения энергетического обмена при гипоксии и их коррекция с помощью сукцинатсодержащего соединения проксипин: дис. ... канд. биол. наук. – М., 2008. 172 с.
4. Громова О.А., Торшин И.Ю., Хаджидис А.К. Анализ молекулярных механизмов воздействия железа (II), меди, марганца в патогенезе железодефицитной анемии // Клини. фармакология и фармакоэкономика. 2010. № 1. С. 1-9.
5. Егорова С.Е. Влияние производного 1-алкенилимидазола под шифром Аллим-1, 2,4-динитрофенола и их сочетаний на некоторые показатели окислительного обмена мышей // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2013. Т. 93. № 5. С. 138-140.
6. Кацура В.А., Долго-Сабуров В.Б., Башарин В.А., Бонитенко Е.Ю., Лапина Н.В. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их фармакотерапии // MEDLINE.RU. 2010. Т. 11. № 2. С. 611-634.
7. Керимкулова Н.В., Торшин И.Ю., Громова О.А. и др. Систематический анализ молекулярно-физиологических эффектов синергичного воздействия железа, марганца и меди на соединительную ткань // Гинекология. 2012. Т. 14. № 6. С. 51-60.

8. **Крупаткин А.И., Сидоров В.В., Баранов В.В.** Колебательный контур регуляции линейной скорости капиллярного кровотока // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2007. Т. 6. № 3. С. 148.
9. **Лебедева С.А.** Сравнительная оценка антигипоксической активности нового металлокомплекса железа // Инновации в современной фармакологии / мат-лы IV Съезда фармакологов России. - Казань. 2012. С. 116.
10. **Новиков В.Е., Левченко О.С., Парфенов Э.А.** Фармакологические свойства нового антигипоксанта pQ-4 // Бюлл. сибирской медицины. 2006. С. 65-67.
11. **Трофимов Б.А., Самойлов Н.Н., Бабаниязов Х.Х., Станкевич В.К., Нечипоренко С.П. и др.** Производные 1-алкенилимидазола. Патент РФ № 2397175/23, 20.08.2010.
12. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
13. **Сапоцкий И.В.** Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). - М., 1970. 344 с.
14. **Сороко С.И., Бурых Э.А.** Внутрисистемные и межсистемные перестройки физиологических параметров при острой экспериментальной гипоксии // Физиол. человека. 2004. Т. 30. № 2. С. 58-66.
15. **Чернилевский В.Е.** Проблема гипобиоза и продления жизни // Сборник МОИП № 41. Секция геронтологии. - М., 2008. С. 105-123.
16. **Шахмарданова С.А.** Исследование острой токсичности и антигипоксической активности новых металлокомплексов железа // Саратовский научно-медицинский журнал. Т. 11. № 1. 2015. С. 146-150.
17. **Шилов В.Н.** Молекулярные механизмы структурного гомеостаза. - М.: Интерсигнал, 2006. 288 с.
18. **Cadet E., Gadenne M., Capront D., et al.** Donnes recentes sur metabolisme du fer: un etat de transition // Rev. Med. 2005. No. 26. Pp. 315-324.
19. **Corral L., Javierre C., Blasi J., et al.** Combined intermittent hypobaric hypoxia and muscle electro-stimulation: a method to increase circulating progenitor cell concentration? // J. Transl. Med. 2014. Vol. 19. Pp. 12-17.
20. **Defrere S., Lousse J.C., Gonzalez-Ramos R., et al.** Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis // Mol. Hum. Reprod. 2008. Vol. 14(7). P. 377.
21. **Dimitrov J.D., Vassilev T.L., Andre S., et al.** Functional variability of antibodies upon-oxidative processes // Autoimmun Rev. 2008. Vol. 7(7). Pp. 574-578.

References

1. **Antonov V.S., Bogomolova N.V., Volkov A.S.** Avtomatizacija gematologicheskogo analiza. Interpretacija pokazatelej gemogrammy. - Saratov: Izd-vo Sarat. med. un-ta, 2008. 194 s.
2. **Bezishkij Je.N., Emushincev P.A., Groshilin S.M.** Rasshirenie funkcional'nyh vozmozhnostej organizma vodolazov putem kombinirovannogo primeneniya GBO i gipoksicheskoj trenirovki // Mat. V Vseros. konf. «Med.-fiziol. probl. jekologii cheloveka». - Ul'janovsk, 2011. S. 111-113.
3. **Germanova Je.L.** Narusheniya jenergeticheskogo obmena pri gipoksii i ih korrekciya s pomoshh'ju sukcinatsoderzhashhego sodineniya proksipin: dis. ... kand. biol. nauk. - M., 2008. 172 s.
4. **Gromova O.A., Torshin I.Ju., Hadzhidis A.K.** Analiz molekulyarnyh mehanizmov vozdeystviya zheleza (II), medi, marganca v patogeneze zhelezodeficitnoj anemii // Klin. farmakologiya i farmajekonomika. 2010. № 1. S. 1-9.
5. **Egorova S.E.** Vlijanie proizvodnogo 1-alkenilimidazola pod shifrom Allim-1, 2,4-dinitrofenola i ih sochetanij na nekotorye pokazateli okislitel'nogo obmena myshej // Bjulleten' VSNC SO RAMN. 2013. T. 93. № 5. S. 138-140.
6. **Kashuro V.A., Dolgo-Saburov V.B., Basharin V.A., Bonitenko E.Ju., Lapina N.V.** Nekotorye mehanizmy narusheniya biojenergetiki i optimizacija podhodov k ih farmakoterapii // MEDLINE.RU. 2010. T. 11. № 2. S. 611-634.
7. **Kerimkulova N.V., Torshin I.Ju., Gromova O.A. i dr.** Sistematicheskij analiz molekulyarnofiziologicheskikh jeffektov sinergichnogo vozdeystviya zheleza, marganca i medi na soedinitel'nuju tkan' // Ginekologija. 2012. T. 14. № 6. S. 51-60.
8. **Krupatkin A.I., Sidorov V.V., Baranov V.V.** Kolebatel'nyj kontur reguljacii linejnoj skorosti kapilljarnogo krovotoka // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikroциркуляция. 2007. Т. 6. № 3. С. 148.
9. **Lebedeva S.A.** Sravnitel'naja ocenka antigipoksicheskoj aktivnosti novogo metallokompleksa zheleza // Innovacii v sovremennoj farmakologii / mat-ly IV Sjezda farmakologov Rossii. - Kazan'. 2012. S. 116.

10. *Novikov V.E., Levchenkova O.S., Parfenov Je.A.* Farmakologicheskie svojstva novogo antigipoksanta pQ-4 // *Bjull. sibirskoj mediciny.* 2006. S. 65-67.
11. *Trofimov B.A., Samojlov N.N., Babanijazov H.H., Stankevich V.K., Nechiporenko S.P. i dr.* Proizvodnye 1-alkenilimidazola. Patent RF № 2397175/23, 20.08.2010.
12. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomedicinskih issledovanijah / pod red. N.N. Karkischenko, S.V. Gracheva. - M.: Profil'-2S. 2010. 358 s.
13. *Sanockij I.V.* Metody opredelenija toksichnosti i opasnosti himicheskikh veshhestv (toksikometrija). - M., 1970. 344 s.
14. *Soroko S.I., Buryh Je.A.* Vnutrisistemnye i mezhsistemnye perestrojki fiziologicheskikh parametrov pri ostroj jeksperimental'noj gipoksii // *Fiziol. cheloveka.* 2004. T. 30. № 2. S. 58-66.
15. *Chernilevskij V.E.* Problema gipobioza i prodlenija zhizni // *Sbornik MOIP № 41. Sekcija gerontologii.* - M., 2008. S. 105-123.
16. *Shahmardanova S.A.* Issledovanie ostroj toksichnosti i antigipoksicheskoj aktivnosti novyh metalokompleksov zheleza // *Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal.* T. 11. № 1. 2015. S. 146-150.
17. *Shilov V.N.* Molekuljarnye mehanizmy strukturnogo gomeostaza. - M.: Intersignal, 2006. 288 s.
18. *Cadet E., Gadenne M., Capront D., et al.* Donnes recentes sur metabolisme du fer: un etat de transition // *Rev. Med.* 2005. No. 26. Pp. 315-324.
19. *Corral L., Javierre C., Blasi J., et al.* Combined intermittent hypobaric hypoxia and muscle electro-stimulation: a method to increase circulating progenitor cell concentration? // *J. Transl. Med.* 2014. Vol. 19. Pp. 12-17.
20. *Defrere S., Lousse J.C., Gonzalez-Ramos R., et al.* Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis // *Mol. Hum. Reprod.* 2008. Vol. 14(7). P. 377.
21. *Dimitrov J.D., Vassilev T.L., Andre S., et al.* Functional variability of antibodies upon oxidative processes // *Autoimmun Rev.* 2008. Vol. 7(7). Pp. 574-578.

The mechanism of antihypoxic effect of new metal complex of iron – derived vinylimidazole

**S.A. Shakhmardanova, P.A. Galenko-Yaroshevskiy, F.B. Litvin,
V.V. Tarasov, M.L. Maksimov, S.S. Sologova**

New metal-complex compound of iron derived vinylimidazole under the code of “Tetravim” with antihypoxic activity was studied in experiments on laboratory animals (white nonlinear mice and rats). It is shown that a single intraperitoneal introduction Tetravim at a dose of 50 mg/kg does not alter the performance of a haemogram, leads to a decrease in oxidative metabolism, the prevent of hypoglycemia that occur under conditions of acute hypobaric hypoxia (AGBH), improves hemodynamics and efficiency of oxygen exchange in the tissues, reduce the negative impact AGBH on parameters of microcirculation.

Key words: antihypoxants, metal-complex of iron, hypoxia, oxidative metabolism, haemogram, microcirculation.



Сравнительная характеристика доклинических параметров безопасности и эффективности препаратов эхинацеи пурпурной

Л.В. Крепкова¹, Е.Б. Шустов²

¹ – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Москва

² – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Контактная информация: Крепкова Любовь Вениаминовна, krepkova2011@yandex.ru

Методом УФ-спектрофотометрии показано, что различные лекарственные препараты из наземной части эхинацеи пурпурной (Эстифан, Эхинацея-ВИЛАР, а также измельченное сырьё указанного растения, фасованного в фильтр-пакеты) имеют близкие характеристики спектров поглощения, типичные для оксикоричных кислот, которые по литературным данным определяют их иммуностимулирующую активность. Показано, что для этих препаратов также схожими являются показатели их фармакологической активности и безопасности, выявленные в ходе доклинического исследования. Лекарственные препараты, полученные из одного вида растительного сырья, имеющие схожий состав основных групп биологически активных веществ, одинаковые фармакологические свойства, способ приготовления, лекарственную форму и показания к применению, могут рассматриваться как аналоги по составу и действию, что позволяет оптимизировать проведение доклинической оценки их безопасности и эффективности.

Ключевые слова: биомедицинские исследования, доклинические исследования, лекарственная безопасность, УФ-спектрофотометрия, эхинацея пурпурная.

Введение

В последние годы на отечественном фармацевтическом рынке появилось огромное количество однотипных (аналогичных) фитопрепаратов, созданных на основе одних и тех же видов растительного сырья, в одинаковых лекарственных формах, со сходными путями введения и показаниями к медицинскому применению. Кроме того, из одного вида лекарственного сырья с помощью различных химико-технологических методов получают стандартизованные

лекарственные средства в различных лекарственных формах, содержащие аналогичные группы основных действующих веществ и проявляющие одинаковые фармакологические свойства. Все эти препараты различаются по степени изученности и качеством проведенных экспериментальных исследований, которые не всегда или в неполной мере свидетельствуют об их безопасности: часто отсутствуют данные по мутагенности, репротоксичности, канцерогенности, аллергизирующих свойствах и

иммунотоксичности [12]. Кроме того, к ним не может быть применен термин «воспроизведенный препарат», предусмотренный Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и от 22.12.2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств», т.к. они могут в значительной мере отличаться друг от друга по качественному и количественному составу действующих веществ.

При этом осуществление контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения на всех этапах их обращения, включая доклинические исследования, является одним из приоритетов, на котором основывается стратегия лекарственного обеспечения населения России на период до 2025 г.

Для выполнения поставленных данным документом (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 13 февраля 2013 г. № 66) задач требуется пересмотр определенных методических рекомендаций по оценке их безопасности при доклиническом изучении и предложений по внесению рекомендаций в действующие нормативные документы по их регистрации.

Хорошо известно, что разработка лекарственных средств растительного происхождения – это длительный и многоэтапный процесс, включающий патентный поиск, предварительное фитохимическое изучение, разработку рационального способа получения фитосубстанций, фармакологический скрининг, углубленное фитохимическое изучение, создание современных лекарственных форм, исследование специфической фармакологической активности,

изучение безопасности. Он более сложен, чем при создании синтетических препаратов и требует много времени и материальных затрат. Стоимость доклинических исследований в сертифицированной лаборатории зависит от объема и глубины исследований. В США или в Европе она может достигать 10 млн долларов, в России она гораздо ниже и может доходить до 50 млн руб.

Правильное планирование эксперимента с применением комплексного подхода, включающего оценку как лекарственного растительного сырья, так и лекарственных средств, созданных на его основе, и определение оптимального объема доклинических исследований, позволит сократить сроки их проведения, минимизировать количество животных, используемых для осуществления необходимых научных целей, и в итоге сократить стоимость доклинических исследований. Это, в свою очередь, требует разработки критериев, по которым должна быть проведена оценка исследуемых объектов.

Одним из таких критериев для фитопрепаратов является содержание в них биологически активных веществ. Хорошо известно, что характерной особенностью лекарственных средств растительного происхождения является их способность к синтезу и накоплению разнообразных биологически активных веществ, относящихся к различным классам химических соединений, которые обуславливают широкий спектр их фармакологических свойств. Поэтому одним из показателей качества фитопрепаратов является определение суммы экстрактивных (действующих) веществ, коррелирующих с фармакологической активностью [6, 15, 19].

Гарантией качества и важнейшим условием полноценного использования препаратов растительного происхождения в медицинской практике, обеспечивающим их эффективность и безопасность, является стандартизация как лекарственного растительного сырья, так и лекарственных средств, полученных из него.

Целью настоящего исследования являлось подтверждение схожести состава основных групп биологических активных веществ лекарственных препаратов, полученных из травы эхинацеи пурпурной (Эстифана и Эхинацея-ВИЛАР, а также измельченного сырья указанного растения, фасованного в фильтр-пакеты), для выбора программы и проведения их доклинического изучения безопасности.

Материалы и методы

Для исследования были отобраны три лекарственных препарата, полученных в ФБГНУ ВИЛАР из надземной части эхинацеи пурпурной: Эстифан (рег. № 94/229/2) и Эхинацея-ВИЛАР (рег. № 001678/01-2003), а также измельченное сырье указанного растения, фасованное в фильтр-пакеты для приготовления настоя (рег. № 94/229/11), предназначенных для приема внутрь в качестве средств для повышения иммунитета. Эстифан – экстракт сухой, полученный из высушенной травы эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench) семейства Астровые (Сложноцветные) *Asteraceae* (*Compositae*). Эхинацея-ВИЛАР – сок свежей травы эхинацеи пурпурной, который в качестве консерванта содержал этиловый спирт не

менее 18%. Эхинацеи пурпурной трава представляла собой сухое измельченное сырье, фасованное в фильтр-пакеты по 1,5 г и рекомендуемое для приготовления настоя *ex tempore*.

Фармакологическая активность лекарственных препаратов, созданных из надземной части эхинацеи пурпурной, обусловлена присутствием комплекса биологически активных веществ различной природы, в т.ч. оксикоричных кислот, полисахаридов, алкиламинов, флавоноидов и др. По данным литературы, иммуностимулирующее действие указанных препаратов в основном обеспечивается присутствием суммы оксикоричных кислот, поэтому стандартизация лекарственного растительного сырья эхинацеи пурпурной и препаратов, созданных из него, была проведена по этому показателю.

Количественное определение суммы оксикоричных кислот проводили методом УФ-спектрофотометрии [11] при длине волны 328 нм в пересчете на цикориевую кислоту на приборе Cary 100 Scan («Varian», США).

Программа доклинического токсикологического изучения препаратов из эхинацеи пурпурной предусматривала полный объем исследований (оценка общетоксического действия и возможных алергизирующих, иммунотоксических, мутагенных свойств и репродуктивной токсичности препарата). Доклиническое изучение безопасности указанных выше препаратов выполняли с использованием лабораторных животных (мыши линии BALB/c, крысы Wistar и морские свинки-альбиносы), полученных из питомника Филиала «Андреевка» ФГБУН ИЦБМТ ФМБА России. Исследования выполнялись

согласно Правилам надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г.), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [18], согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [8]. Токсикологическое исследование проводилось в соответствии с методическими рекомендациями МЗ РФ [9]. Протоколы экспериментов были одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР.

Результаты исследований

По разработанной унифицированной методике количественного определения суммы оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту оценён характер полученных спектров поглощения исследуемых растворов препаратов в УФ-области, при этом наблюдались идентичные рисунки спектров с максимумом поглощения при длине волны 328 ± 2 нм для всех трех исследуемых объектов (рис. 1-3). Полученные результаты включены в утвержденные государственные стандарты качества – фармакопейные статьи.

Это доказывает наличие во всех исследуемых объектах биологически активных веществ фенольной природы, в т.ч. включающих производные оксикоричных кислот, что позволило их сравнить и выбрать оптимальные программы доклинического исследования.

При однократном введении субстанции Эстифана в желудок мышам,

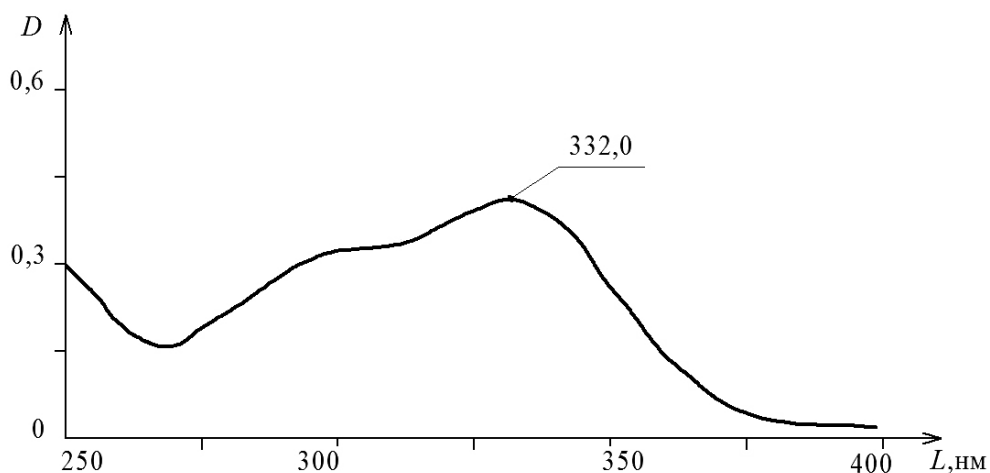


Рис. 1. УФ-спектр исследуемого раствора экстракта свежей травы эхинацеи пурпурной. L – длина волны, D – оптическая плотность.

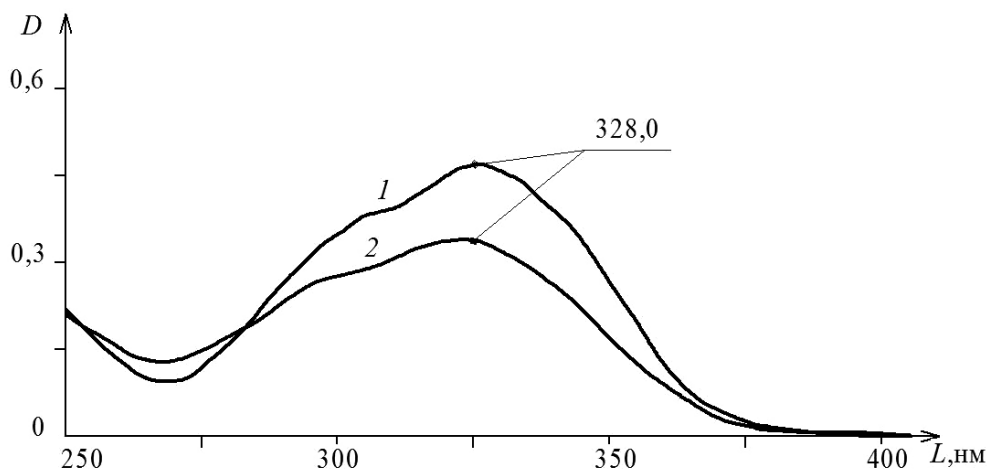


Рис. 2. УФ-спектр исследуемого раствора цикориевой кислоты (1) и субстанции Эстифана (2). L – длина волны, D – оптическая плотность.

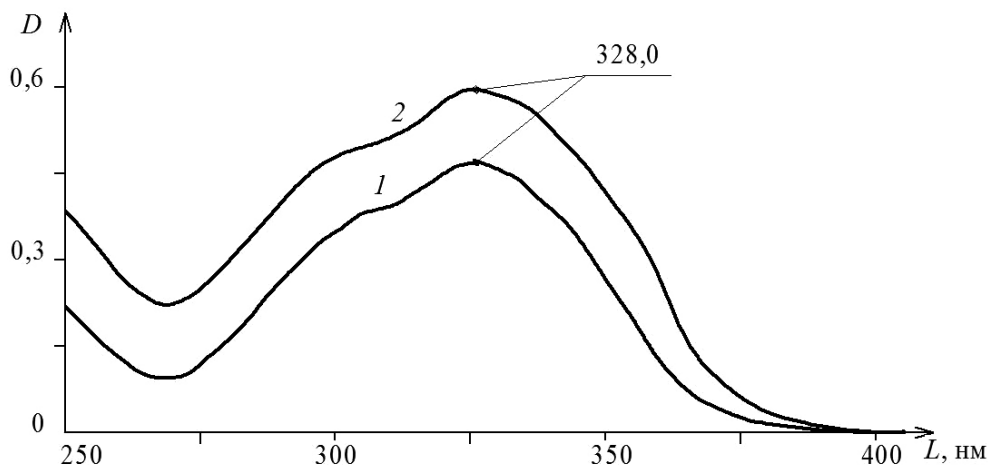


Рис. 3. УФ-спектр исследуемого раствора цикориевой кислоты (1) и Эхинацеи-ВИЛАР (2). L – длина волны, D – оптическая плотность.

крысам и морским свинкам в дозах до 16000 мг/кг признаков интоксикации и гибели животных не наблюдалось. При внутрибрюшинном введении субстанции Эстифана среднесмертельные дозы установлены в диапазоне 3200-3400 мг/кг. Полученные данные свидетельствуют о низкой токсичности субстанции Эстифана.

Под влиянием длительного введения в течение 6 мес. субстанции Эстифана в желудок крысам-самцам в дозах 50, 500 и 1500 мг/кг (5-, 50- и 150-кратные суточные терапевтические дозы) не выявлено каких-либо признаков, свидетельствующих о токсическом действии Эстифана на гематологические показатели, функцию

печени, почек и поджелудочной железы экспериментальных животных, нефро- и кардиотоксического действия препарата. Вместе с тем отмечалось умеренное увеличение массы тела животных, получавших препарат, по сравнению с контролем. Результаты патогистологического изучения внутренних органов крыс подтвердили отсутствие повреждающего действия Эстифана во всех испытанных дозах. Отмеченные участки гиперплазии тимуса и выраженность маргинальной зоны в фолликулах селезенки у крыс, получавших препарат в дозах 50 и 500 мг/кг, являлись подтверждением проявления иммуностимулирующего действия Эстифана.

В тестах общей анафилаксии, реакции гиперчувствительности замедленного типа и конъюнктивальной пробы на морских свинках у Эстифана не обнаружено аллергизирующих свойств.

Установлено, что Эстифан при введении в желудок мышам и крысам в течение 4-х недель в дозах 50 и 500 мг/кг, а также при 4-кратном внутрибрюшин-

ном введении мышам в дозах 1 и 10 мг/кг обладал выраженным иммуностимулирующим действием на гуморальное звено системы иммунитета [4], статистически достоверно увеличивая количество АОК в селезенке и обратный титр ГА в сыворотке крови (рис. 4).

Эстифан не проявлял эмбриотоксических и тератогенных свойств при введении крысам в желудок в дозах 50, 250 и 1000 мг/кг с 6-го по 16-й день беременности и в дозе 500 мг/кг – с 1-го по 19-й день беременности, а также не оказывал повреждающего действия на генеративную функцию крыс. Установлено также, что Эстифан не обладал мутагенной активностью в тесте учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей.

При однократном внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении мышам и крысам Эхинацея-ВИЛАР является малотоксичным препаратом. Показатели LD_{50} соответственно составляли более 1400 и 1600 мг/кг (внутрибрюшинно) и 1600 и 2600 мг/кг (внутрижелудочно) в пересчете на сухой остаток. Следует отметить,

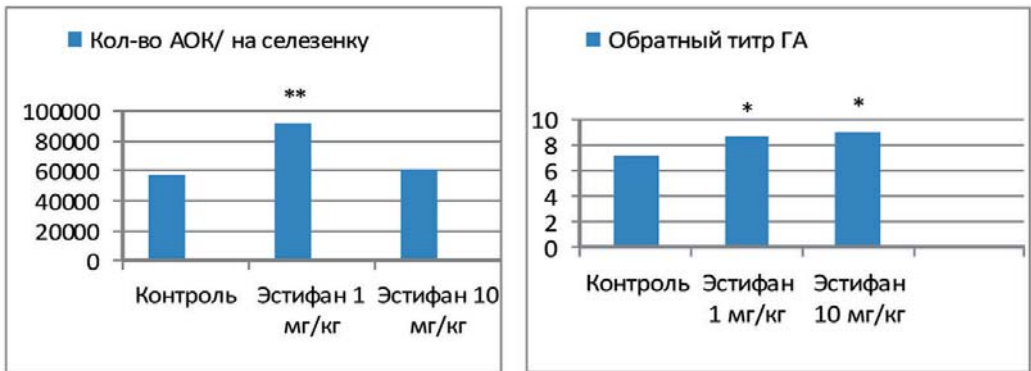


Рис. 4. Показатели гуморального иммунитета мышей при внутрибрюшинном введении Эстифана. АОК – антителообразующие клетки, ГА – гемагглютинины. Отличия от контроля достоверны, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

что картина интоксикации препаратом определялась присутствием в его составе этанола. При исследовании хронической (гемато-, гепато-, нефро-, кардио-) и специфических (мутагенность, аллергенность, иммуно-, эмбрио-, репродуктивная) видов токсичности установлено, что препарат Эхинацея-ВИЛАР не обладал исследуемыми видами токсичности, не вызывал тератогенных, мутагенных эффектов и аллергенности [3].

При однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении настоя эхинацеи пурпурной травы в разведении 1:10 мышам и крысам обоего пола не удалось определить среднесмертельные дозы препарата в связи с ограничением вводимого объема. В трехмесячном хроническом эксперименте при внутрижелудочном введении крысам в дозах 8,6 и 43 мл/кг (терапевтическая и пятикратная терапевтическая дозы) установлено, что настой в разведении 1:75, согласно инструкции по медицинскому применению, не влиял

на общее состояние и поведение крыс, а также на гематологические показатели. Полученные данные свидетельствуют о хорошей переносимости настоя эхинацеи и об отсутствии у него повреждающего действия (по данным использованных биохимических тестов, функционального состояния почек в условиях водной нагрузки и параметрам ЭКГ-исследований) на состояние важнейших органов и систем организма подопытных животных. Патогистологическое исследование, проведенное в конце хронического эксперимента, не выявило токсического действия настоя эхинацеи травы в испытанных дозах на внутренние органы крыс, а также его раздражающего действия на ЖКТ подопытных животных. У настоя травы эхинацеи не обнаружено аллергизирующих свойств [3].

Известная по данным литературы иммуностимулирующая активность лекарственных средств на основе эхинацеи была подтверждена и в наших исследованиях (табл. 1).

Таблица 1

Показатели гуморального иммунитета ($M \pm m$) мышей при 4-недельном внутрибрюшинном введении субстанции лекарственных средств из эхинацеи пурпурной

Группа (препарат)	Доза	Кол-во антителообразующих клеток (на селезенку)	Обратный титр гемагглютининов
Контроль		54920±2400	8,0±0,4
Эстифан	50 мг/кг	73240±4800*	12,4±0,6*
Эстифан	500 мг/кг	102030±5700*	14,6±0,6*
Эхинацея-ВИЛАР	1 мг/кг	75321±4293*	18,0±1,3*
Эхинацеи травы настой	8,6 мл/кг	77222±4140*	11,7±0,7*
Эхинацеи травы настой	43 мл/кг	84925±4940*	12,6±0,8*

Примечание: * – отличие от уровня контроля достоверно ($p < 0,05$), критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Обсуждение результатов

Препараты эхинацеи пурпурной (Иммунал, Эхинобене, Эхинация Гексал, Эхинация композитум С, Эхинацин, Эхинацея Галенофарм, Эхинацея-ВИЛАР, Эхинацея Парафарм, Эхинацея, Эхинацея с витамином С, эхинацеи пурпурной трава) являются самыми популярными иммуностимулирующими препаратами амбулаторного применения [13].

Все части растения содержат полисахариды, эфирное масло (цветки – до 0,5%, трава – до 0,35%, корни – от 0,05 до 0,25%). В корнях обнаружены гликозид эхинакозид, цикориевая кислота (дикофеллинная кислота), среди сопутствующих фенилпропаноидов обнаружены также производные винной кислоты, кофейная и хлорогеновая кислоты. Интересно, что в молекуле эхинакозида легко обнаруживается фрагмент салидрозида – одного из компонентов корневища родиолы розовой. Именно это вещество может обуславливать выявленные тонизирующие свойства эхинацеи пурпурной [14]. Второй группой биологически активных соединений следует считать полисахариды (гетероксиланы, арабиноксиланы, арабинорамногалактитаны), обладающие иммуностимулирующей активностью. В качестве третьей группы биологически активных соединений следует рассматривать алкаамиды (алкиламиды) – полиеновые или полиацителеновые соединения с изобутиламидным остатком.

Сопутствующие вещества травы эхинацеи пурпурной представлены также флавоноидами (кверцетин, кемпферол и различные глюкозиды), эфирным маслом (до 0,6%), основными компонентами которого являются борнеол, борнилацетат, кариофиллен, кариофилленоксид и др. В траве и корневищах содержатся также

инулин (в корневищах – до 6%), бетаин (0,1%), смолы (около 2%), органические кислоты (пальмитиновая, линолевая, церотиновая), а также фитостерины, дубильные вещества, сапонины. Всё растение богато ферментами, микроэлементами (селен, кобальт, серебро, молибден, цинк, марганец и др.) и макроэлементами (калий, кальций) [16].

Основными действующими веществами эхинацеи, обладающими иммуностимулирующей активностью, являются оксикоричные кислоты и полисахариды, которые стимулируют костномозговое кроветворение, в результате чего увеличивается количество лейкоцитов и повышается их фагоцитарная активность [17]. Препараты эхинацеи применяются для стимуляции иммунитета при неосложненных острых инфекционных заболеваниях, при наличии отдельных признаках вторичного иммунодефицита – для профилактики вероятного заболевания в предэпидемический и эпидемический период. Длительность приема в клинической практике – от 1 до 8 недель.

Способность лейкоцитов активно поглощать и переваривать бактерии под влиянием эхинацеи возрастает на 30-45%; в целом же иммунный ответ под влиянием эхинацеи возрастает на 50-120%. При приеме эхинацеи повышается уровень специфических антител, нейтрализующих вирусы и бактерии, а также увеличивается продукция неспецифического противовирусного соединения – интерферона. Это действие проявляется не только у взрослых, но и у детей с неустановившейся иммунной системой, а также у лиц преклонного возраста, у которых функции этой системы в связи с общим старением организма снижены.

При изучении препаратов эхинацеи из неочищенного свежего сока растения в опытах *in vitro* показана стимуляция выработки макрофагами цитокинов: IL-1, TNF- α и IL-6 и усиление антителозависимой цитотоксичности мононуклеаров периферической крови под действием экстракта эхинацеи. В эксперименте на лабораторных животных экстракт корня эхинацеи при систематическом добавлении в пищу в течение 1-2 недель вызывал достоверное увеличение абсолютного числа НК-клеток и моноцитов красного костного мозга и селезенки. Иммуномодулирующий эффект также демонстрирует изменение лизосомальной и пероксидазной активности брюшинных макрофагов и клеток селезенки мыши при применении водноспиртовых экстрактов корня различных видов эхи-

нацеи. Полисахариды эхинацеи пурпурной повышают резистентность иммунодефицитных мышей к инфекции *Candida albicans* и *Listeria monocytogenes*, предполагается возможность применения препаратов эхинацеи для лечения оппортунистических инфекций. Полисахариды эхинацеи пурпурной также стимулируют цитотоксичность макрофагов в отношении опухолевых и микробных клеток [17].

Выявленная в нашем исследовании иммуностимулирующая активность препаратов эхинацеи (табл. 1) соответствует литературным данным [2, 5, 10].

Сопоставление результатов оценки различных видов токсичности препаратов из травы эхинацеи пурпурной представлено в табл. 2.

Таблица 2

Основные параметры безопасности лекарственных препаратов эхинацеи пурпурной в доклиническом исследовании

Параметр безопасности	Эстифан	Эхинацея-Вилар	Настой травы эхинацеи
<i>Острая токсичность</i>			
LD ₅₀ при внутривенном введении, мг/кг	>16000	>2100	Не определена
LD ₅₀ при внутрибрюшинном введении, мг/кг	3300	>1500	Не определена
Уровень острой токсичности	Низкий	Низкий, соответствует дозе этилового спирта	Низкий
<i>Хроническая токсичность и специфические виды токсичности</i>			
Гематотоксичность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Гепатотоксичность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Нефротоксичность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Кардиотоксичность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Иммунотоксичность	Не выявлена, подтверждены иммуностимулирующие свойства	Не выявлена, подтверждены иммуностимулирующие свойства	Не выявлена, подтверждены иммуностимулирующие свойства
Эмбриотоксичность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Тератогенность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Мутагенность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Репродуктивная токсичность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена
Аллергенность	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена

Анализ данных табл. 2 показывает, что изученные препараты эхинацеи пурпурной характеризуются низкой токсичностью. Различия в острой токсичности для препаратов Эстифан и Эхинацея-ВИЛАР связаны с тем, что второй препарат представляет собой сок и содержит этиловый спирт, проявляющий свое токсическое действие. Важно отметить, что показатели острой токсичности этого препарата практически полностью соответствуют острой токсичности этилового спирта. Следовательно, содержащиеся в препарате Эхинацея-ВИЛАР экстрактивные вещества эхинацеи не проявили своего собственного токсического действия (также как и при исследовании настоя). В условиях хронических экспериментов при введении препаратов эхинацеи в высоких дозах не было выявлено их общетоксического действия и специфических видов токсичности.

Заключение

Проведенное исследование показало, что, используя стандартизированные подходы к оценке состава биологически активных компонентов в препаратах растительного происхождения (или их фармацевтических субстанциях), можно выявить их аналогичность известным, хорошо изученным и имеющим большой опыт применения лекарственным препаратам из того же растительного сырья. В случае совпадения при этом путей введения, показаний к применению, лекарственной формы, близости рекомендуемых суточных доз, такие лекарственные препараты из растительного сырья могут считаться аналогами ранее внедренных в медицинскую практику.

Исследование показало, что для растительных препаратов-аналогов, изготовленных из одного и того же (или ботанически близкого) растительного сырья, в условиях стандартизированного доклинического исследования выявляются однотипные (или полностью совпадающие) характеристики целевой фармакологической активности (главного действия, являющегося целью применения препарата) и безопасности применения.

Наличие одних и тех же основных групп биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье эхинацеи пурпурной и препаратах, созданных из него (Эстифан и Эхинацея-ВИЛАР), подтвержденное проведением физико-химических методов анализа, включенных в утвержденные государственные стандарты качества – фармакопейные статьи, позволило сравнить их между собой и дало основание для составления оптимальных программ их доклинического исследования.

Для новых лекарственных препаратов, созданных из хорошо изученного ранее растительного сырья, для которых установлены препараты-аналоги по основным группам биологически активных веществ и фармакологической активности, имеющие научное подтверждение их эффективности и безопасности при доклиническом исследовании и клиническом применении, допустимым является проведение доклинических исследований безопасности по сокращенной программе, включающей изучение общетоксического действия и аллергенности.

Для разработки программ доклинического токсикологического изучения таких фитопрепаратов необходимо по-

лучить полную и объективную информацию о растении, на основе которого создан препарат, способе выделения (фитохимический или биотехнологический) и составе основных групп биологически активных веществ, основных фармакологических свойствах, составе лекарственных форм, способе приготовления, диапазоне действующих доз, длительности курсового назначения с лечебной целью, установленные ранее для аналогов побочные нежелательные явления и др. данные, характеризующие безопасность клинического применения.

Использование методического подхода с выявлением для новых потенциальных фитопрепаратов-аналогов по составу основных групп биологически активных веществ и фармакологическому действию из числа уже применяемых в клинической практике, индивидуальный подход при разработке программ по их доклиническому токсикологическому изучению позволяют иметь исчерпывающую информацию по их безопасности, которая дает основания для получения разрешения Минздрава России на проведение клинических испытаний и последующее внедрение в медицинскую практику.

Список литературы

1. *Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Шкаренков А.А., Боровкова М.В., Бочарова И.В., Ярцев Д.П., Гнутов В.Б.* Экспериментальное изучение травы эхинацеи пурпурной / Мат-лы межд. конф. «Генетические ресурсы лекарственных и аромомасляных растений» // Сб. науч. тр. ВИЛАР. - М., 2004. С. 252-254.
2. *Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Шкаренков А.А., Боровкова М.В., Бочарова И.В., Гнутов В.Б.* Изучение иммунотоксических свойств препаратов из травы эхинацеи пурпурной / VIII-й Межд. съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». - Миккели, Финляндия, 2004. С. 61-65.
3. *Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Шкаренков А.А., Ярцев Д.П., Гнутов В.Б.* Токсикологическое изучение лекарственного средства эхинацея-ВИЛАР / Мат-лы XI Российского национального Конгресса «Человек и лекарство». - М., 2004. С. 767.
4. *Крепкова Л.В., Бортникова В.В., Боровкова М.В., Сокольская Т.А.* Доклиническое токсикологическое исследование фитопрепаратов из эхинацеи пурпурной травы // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. № 1. С.178-184.
5. *Крепкова Л.В., Бортникова В.В., Боровкова М.В., Сумарокова Н.А.* Токсикологическое изучение лекарственных средств на основе эхинацеи пурпурной / Тез. докл. III съезда токсикологов России. - М., 2008. С. 507-508.
6. *Маркарян А.А.* Основные принципы составления и стандартизации комплексных средств растительного происхождения // Проблемы управления здравоохранением. 2003. Т. 13. № 6. С. 78-81.
7. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 13 февраля 2013 г. № 66 «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации».
8. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1, Ч. 2. - М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. *Сакович Г.С., Колхир В.К., Енютина Е.Ю., Шкаренков А.А., Стихин В.А., Алибеков С.Д., Омельницкий П.П., Багинская П.И., Сенина Т.А., Трумпе Т.Е., Боровкова М.В., Глазова Н.Г., Лескова Т.Е.* Разработка эстифана, препарата иммуностимулирующего действия из эхинацеи пурпурной / Сборник научн. Тр. ВИЛАР: Химия, технология, медицина. - М., 2000. С. 400-412.
11. Спектрофотометрия в УФ и видимых областях. ГФ XIII, ОФС 1.2.1.1.0003.15. М., 2015.
12. *Тутельян В.А., Самылина И.А., Хотимченко С.А., Гравель И.В., Булаев В.М.* Оценка безопасности лекарственного растительного сырья в БАДах и фитопрепаратах // Фармация. 2009. № 1. С. 3-5.

13. ФАРМ-индекс. 2017. № 402. 191 с.
14. **Фисенко В.М., Маняхин А.Ю., Хасина Э.И.** Влияние настойки эхинацеи пурпурной на физическую работоспособность экспериментальных животных в условиях внешней гипертермии // Психофармакология и биологическая наркологи́я. 2007. Т. 7. Спец. вып. Ч. 2. С. 1993.
15. **Шемерянкина Т.Б., Сокольская Т.А., Даргаева Т.Д.** Требования к стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на его основе // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 3. С. 9-12.
16. Эхинацея пурпурная [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://sp-lipetsk.ru/shop.php?op=article&id=72>, свободный. - Загл. с экрана. - Яз. рус., англ.
17. **Birt D.F., Widrechner M.P., Lalone C.A.** Echinacea in infection // Am. J. Clin. nutr. 2008. V. 87. No. 2. P. 488-492.
18. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986.
19. **Wagner H.** New approaches in phytopharmacological research // Pure Appl. Chem. 1999. V. 71. No. 9. P. 1649-54.
- References**
1. **Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Shkarenkov A.A., Borovkova M.V., Bocharova I.V., Jarcev D.P., Gnutov V.B.** Jeksperimental'noe izuchenie travy jehinacei purpurnoj / Mat-ly mezhd. konf. «Geneticheskie resursy lekarstvennyh i aromomasljanyh rastenij» // Sb. nauch. tr. VILAR. - M., 2004. S. 252-254.
2. **Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Shkarenkov A.A., Borovkova M.V., Bocharova I.V., Gnutov V.B.** Izuchenie immunotoksicheskih svojstv preparatov iz travy jehinacei purpurnoj / VIII-j Mezhd. sjezd «Aktual'nye problemy sozdaniya novyh lekarstvennyh preparatov prirodnoho proishozhdenija». - Mikkeli, Finljandija, 2004. S. 61-65.
3. **Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Shkarenkov A.A., Jarcev D.P., Gnutov V.B.** Toksikologicheskoe izuchenie lekarstvennogo sredstva jehinaceja-VILAR / Mat-ly HI Rossijskogo nacional'nogo Kongressa «Chelovek i lekarstvo». - M., 2004. S. 767.
4. **Krepkova L.V., Bortnikova V.V., Borovkova M.V., Sokol'skaja T.A.** Doklinicheskoe toksikologicheskoe issledovanie fitopreparatov iz jehinacei purpurnoj travy // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2012. № 1. S.178-184.
5. **Krepkova L.V., Bortnikova V.V., Borovkova M.V., Sumarokova N.A.** Toksikologicheskoe izuchenie lekarstvennyh sredstv na osnove jehinacei purpurnoj / Tez. dokl. III sjezda toksikologov Rossii. - M., 2008. S. 507-508.
6. **Markarjan A.A.** Osnovnye principy sostavlenija i standartizacii kompleksnyh sredstv rastitel'nogo proishozhdenija // Problemy upravlenija zdavoohraneniem. 2003. T. 13. № 6. S. 78-81.
7. Prikaz Ministerstva zdavoohranenija RF ot 13 fevralja 2013 g. № 66 «Ob utverzhenii Strategii lekarstvennogo obespechenija naselenija Rossijskoj Federacii na period do 2025 goda i plana ee realizacii».
8. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomedicinskih issledovanijah / pod red. N.N. Karkischenko, S.V. Gracheva. - M.: Profil'-2S. 2010. 358 s.
9. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Ch. 1, Ch. 2. - M.: Grif i K, 2012. 944 s.
10. **Sakovich G.S., Kolhir V.K., Enjutina E.Ju., Shkarenkov A.A., Stihin V.A., Alibekov S.D., Omel'nickij P.P., Baginskaja P.I., Senina T.A., Trumpe T.E., Borovkova M.V., Glazova N.G., Leskova T.E.** Razrabotka jestifana, preparata immunostimulirujushhego dejstvija iz jehinacei purpurnoj / Sbornik nauchn. Tr. VILAR: Himija, tehnologija, medicina. - M., 2000. S. 400-412.
11. Spektrofotometrija v UF i vidimyh oblastjah. GF XIII, OFS 1.2.1.1.0003.15. M., 2015.
12. **Tutel'jan V.A., Samylina I.A., Hotimchenko S.A., Gravel' I.V., Bulaev V.M.** Ocenka bezopasnosti lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja v BADah i fitopreparatah // Farmacija. 2009. № 1. S. 3-5.
13. ФАРМ-индекс. 2017. № 402. 191 с.
14. **Fisenko V.M., Manjahin A.Ju., Hasina Je.I.** Vlijanie nastojki jehinacei purpurnoj na fizicheskuju rabotosposobnost' jeksperimental'nyh zhivotnyh v uslovijah vneshnej gipertermii // Psihofarmakologija i biologicheskaja narkologija. 2007. T. 7. Spec. vyp. Ch. 2. S. 1993.
15. **Shemerjankina T.B., Sokol'skaja T.A., Dargaeva T.D.** Trebovanija k standartizacii lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja i fitopreparatov na ego osnove // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2010. № 3. S. 9-12.

16. Jehinaceja purpurnaja [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://sp-lipetsk.ru/shop.php?op=article&id=72>, svobodnyj. - Zagl. s jekrana. - Jaz. rus., angl.
17. *Birt D.F., Widrlechner M.P., Lalone C.A.* Echinacea in infection // Am. J. Clin. nutr. 2008. V. 87. No. 2. P. 488-492.
18. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986.
19. *Wagner H.* New approaches in phytopharmacological research // Pure Appl. Chem. 1999. V. 71. No. 9. P. 1649-54.

Comparative characteristics of preclinical parameters of safety and efficacy of *Echinacea purpurea* preparations

L.V. Krepkova, E.B. Shustov

UV spectrophotometry studies have shown that various pharmaceutical drugs of *Echinacea purpurea* (Estifan, *Echinacea-VILAR*, and its purified crude drug (pharmaceutical form) possess similar spectral characteristics, typical of hydroxy-cinnamic acids, which according to the literature, determine their immunotropic activity. There have been shown that these drugs possess similar biological properties as well as safety indexes during preclinical studies. The medicines obtained from one species of plant raw materials, with similar composition of the main groups of biologically active substances, the same pharmacological properties, method of preparation, dosage form and indications, can be considered as analogues to the composition and action that allows to optimize the preclinical evaluation of their safety and efficacy.

Key words: biomedical research, preclinical studies, drug safety, UV spectrophotometry, *Echinacea purpurea*.

Изучение антимикотической активности перспективных соединений ряда серебряных солей пирролопиразолов

В.В. Новикова, В.Л. Гейн, О.В. Бобровская

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь

Контактная информация: к.ф.н. Новикова Валентина Васильевна, vnperm@yandex.ru

Ввиду наличия стабильной тенденции к прогрессированию резистентности наиболее значимых патогенов к антимикотическим средствам, а также проблемы импортозамещения, разработка новых отечественных противогрибковых препаратов является приоритетным направлением фармации и медицины. Исследована противогрибковая активность пяти перспективных соединений ряда серебряных солей пирролопиразолов, содержащих сульфаниламидный фрагмент, в отношении 40 клинических штаммов *C. albicans*. Выявлено два наиболее активных соединения, представляющих интерес для дальнейшего исследования и выявления фармакофорных групп.

Ключевые слова: противогрибковая активность, серебряные соли, *Candida albicans*.

Введение

Значительный рост грибковых заболеваний связан с различными факторами – в частности, с широким применением в медицинской практике антибиотиков, увеличением количества людей, страдающих иммунодефицитами, особенно среди детей. Одной из глобальных причин являются техногенные воздействия на современные экосистемы, на биоценоз человека, что приводит к возрастанию значимости условно-патогенных микроорганизмов как этиологических факторов инфекционных процессов [2].

В структуре поверхностных микозов, как правило, преобладают кандидоз слизистых оболочек, а также дерматофитии [12, 14]. Клинико-эпидемиологический анализ данной патологии в Пермском крае [6] позволяет утверждать о значимости микромицетов как этиологических факторов поверхностных микозов.

Устойчивость грибов к антимикоти-

тикам имеет стабильную тенденцию к прогрессированию [8, 11, 13]. Селекция резистентных штаммов грибов происходит вследствие необоснованного применения противогрибковых средств, длительного использования отдельных препаратов в схеме лечения микозов.

Грибы рода *Candida* являются наиболее частой этиологической причиной поверхностных форм грибковой инфекции, сопровождающейся поражением слизистых оболочек [1, 4, 11, 13, 14]. Преобладающим видом (76,1-86% случаев) традиционно является *Candida albicans*.

С учетом современной экономической и политической ситуации, приведшей к значимым экономическим ограничениям, когда количество импортных лекарственных препаратов на российском рынке превышает 70%, а с учетом субстанций действующих веществ – 90%, остро встает вопрос об импор-

тозамещении, создании отечественных конкурентоспособных лекарственных препаратов [5]. Однако, несмотря на это, ситуация с введением в практику новых препаратов данной группы год от года ухудшается: из 184-х препаратов, зарегистрированных за последние пять лет ведомством FDA (Food and Drug Administration), только 12% были противомикробными препаратами. Факторами, ограничивающими изыскание и внедрение в практику противомикробных и, в частности, антимикотических средств, являются высокая стоимость разработки и вывода на рынок нового препарата, короткий курс приема противомикробных препаратов. В связи с указанными причинами разработка новых противогрибковых препаратов является важным и приоритетным направлением. Полученные нами ранее результаты [10] свидетельствуют о перспективности поиска эффективного антимикотического средства среди серебряных солей гетероциклических соединений.

Цель исследования – изучить чувствительность клинических изолятов *C. albicans* к пяти перспективным соединениям ряда серебряных солей пирролопиразолов, содержащих сульфаниламидный фрагмент, проявившим высокую антимикотическую активность в отношении типовых штаммов.

Материалы и методы

Исследована противогрибковая активность в отношении 40-ка штаммов *C. albicans*, выделенных от пациентов многопрофильных клиник (поликлиники и стационары) г. Перми (биосубстрат – отделяемое влагалища: 20 штаммов, слизь из зева и носа: 20 штаммов), име-

ющих различный профиль чувствительности к антимикотическим препаратам.

Исследование противогрибковой активности соединений, проявивших высокую антимикотическую активность в отношении типовых штаммов *C. albicans* 885-653 и *C. albicans* 10231 (минимальная подавляющая концентрация – МПК 2-7,8 мкг/мл), проводили микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой среде (в 96-луночных планшетах) [7, 9], чувствительность каждого из штаммов определяли в двух повторях. Концентрация микробных клеток в опыте составила $2-5 \times 10^4$ КОЕ/мл. В качестве положительного контроля использовали питательную среду без противогрибкового препарата с внесенной исследуемой культурой, качество среды контролировали с использованием референтных штаммов. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Планшеты инкубировали в термостате при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Оценку роста культур проводили визуально при 40-48 и 70-72 ч инкубирования, в соответствии с рекомендациями Руководства [9]. В качестве значения МПК принимали концентрацию препарата в последней прозрачной лунке серии разведения. Полученные первичные результаты обрабатывали с использованием стандартных статистических методов, усредняя результаты, полученные в двух повторях. В качестве препарата сравнения использовали применяемый в медицинской практике флуконазол.

Результаты и их обсуждение

Изучена противогрибковая активность 14-ти соединений ряда пирролопиразолов, содержащих сульфанила-

мидный фрагмент, из них выявлено 5 перспективных веществ, содержащих ион серебра, подвергшихся углубленному исследованию. МПК изученных соединений в отношении клинических изолятов *C. albicans* составляет 1-32 мкг/мл и более. Полученные результаты представлены в таблице.

Популяция чувствительных штаммов часто является разнородной. При этом важное значение имеет распределение по показателям МПК₅₀ и МПК₉₀ (рис. 1). Установлено, что все изученные соеди-

нения, кроме 97, имеют одинаковые показатели МПК₅₀ и МПК₉₀ в отношении исследованных штаммов *C. albicans*.

В соответствии с руководством EUCAST (The European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing), для признания штамма *C. albicans* чувствительным к флуконазолу МПК этого препарата не должна превышать 2 мкг/мл, а в случае, если МПК флуконазола превышает 4 мкг/мл, штамм *C. albicans* считается резистентным. В соответствии с критериями CLSI (Clinical and

Таблица
Чувствительность клинических изолятов *C. albicans* к изучаемым соединениям

МПК, мкг/мл/ номер соединения	Количество изолятов <i>C. albicans</i> , имеющих соответствующую МПК					
	90	92	95	97	99	флуконазол
0,5	0	0	0	0	0	6
1	2	0	3	2	2	2
2	8	0	7	7	1	3
4	8	16	6	7	10	5
8	13	15	14	8	16	6
16	6	9	6	9	6	2
32	3	0	4	7	1	2
≥32	0	0	0	0	4	0

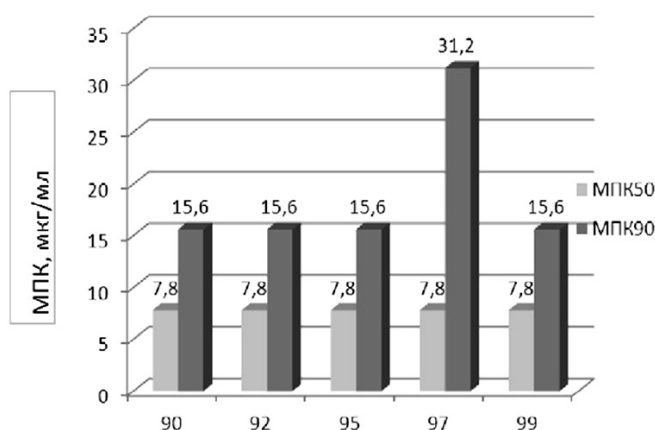


Рис. 1. МПК₅₀ и МПК₉₀ изучаемых соединений в отношении штаммов *C. albicans*.

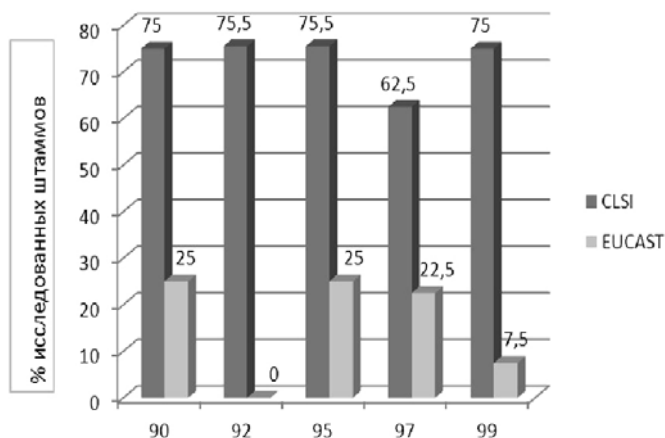


Рис. 2. Чувствительность штаммов *C. albicans* к изучаемым соединениям.

Laboratory Standards Institute), чувствительными к флуконазолу являются штаммы с МПК в диапазоне ≤ 8 мкг/мл [3]. Данные по чувствительности штаммов *Candida* spp. к изучаемым соединениям представлены на рис. 2.

Таким образом, наиболее перспективными – как по критериям EUCAST, так и CLSI – являются соединения 90, 95 (чувствительны 25% и 75,5% штаммов соответственно).

Острая токсичность этих веществ – LD_{50} превышает 1200 мг/кг, соединения относятся к классу практически нетоксичных.

Выводы

Выявлены 2 соединения ряда серебряных солей пирролопиразолов, содержащих сульфаниламидный фрагмент, представляющие интерес для дальнейшего изучения возможной модификации химической структуры, приводящей к усилению противогрибковой активности, выявления фармакофорных групп и исследования механизма их действия.

Список литературы

1. Анкирская А.С., Муравьёва В.В., Фурсова С.А. и др. Мониторинг видового состава и чувствительности к антимикотикам дрожжеподобных грибов, выделенных из влагалища женщин репродуктивного возраста // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2006. Т. 8. № 1. С. 87-95.
2. Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Хлопко Ю.А. Структурно-функциональная характеристика микросимбиоза человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2009. № 4. С. 4-8.
3. Веселов А.В., Козлов Р.С. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2016. Т. 18. № 2. 105 с.
4. Веселов А.В., Мултых И.Г., Клясова Г.А. и др. Эпидемиология возбудителей кандидозов и их чувствительность к азолам: результаты исследования ARTEMIS Disk в России // Клини. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. 2005. Т. 7. № 1. С. 68-76.
5. Зубов П.В., Новикова В.В. Разработка новых антибактериальных препаратов: проблемы и перспективы // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5. С. 342.
6. Новикова В.В., Кучевасова М.В., Коломойцев А.В. Структура дерматомикозов в Пермском крае: клинико-эпидемиологический анализ // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 2. С. 30.

7. Определение чувствительности к микроорганизмам к антибактериальным препаратам: методические указания / МУК 4.2.1890-04. Утв. 04.03.2004.
8. **Решедько Г.К., Козлов Р.С.** Состояние резистентности к антиинфекционным препаратам в России: Практик. Рук-во по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Страчунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. – М.: РЦ «Фармединфо». 2007.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
10. **Ухов С.В., Коньшин М.Е., Новикова В.В. и др.** Синтез и противомикробная активность серебряных солей замещенных амидов 2-иминокумарин-3-карбо-новой кислоты // Химико-фармацевтический журнал. 2004. № 4. С. 15-16.
11. **Cardo D., Horan T., Andrus M., et al.** National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System // J. Infect. control. 2004. Vol. 32. P. 470-85.
12. **Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.** Epidemiological trends in skin mycoses worldwide // Mycoses. 2008. Vol. 51. No. 4. P. 2-15.
13. **Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S., Kaye K., Sobel J.** Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis // Obstetrics & Gynecology. 2012. Vol. 120. Issue 6. P. 1407-1414. doi: <http://10.1097/AOG.0b013e31827307b2>.
14. **Ungpakorn R.** Nondermatophyte infections of the skin and nails: Implications for therapy // Abstracts of The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. 2009. Tokyo. 224 p.

References

1. **Ankirskaja A.S., Murav'jova V.V., Fursova S.A. i dr.** Monitoring vidovogo sostava i chuvstvitel'nosti k antimikotikam drozhzhopodobnyh gribov, vydelennyh iz vlagalishha zhenshhin reproduktivnogo vozrasta // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2006. T. 8. № 1. S. 87-95.
2. **Buharin O.V., Usvjacov B.Ja., Hlopko Ju.A.** Strukturno-funkcional'naja harakteristika mikrosimbiocezoza cheloveka // Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii. 2009. № 4. S. 4-8.
3. **Veselov A.V., Kozlov R.S.** Invazivnyj kandidoz: sovremennye aspekty jepidemiologii,

- diagnostiki, terapii i profilaktiki u razlichnyh kategorij pacientov // Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter. 2016. T. 18. № 2. 105 s.
4. **Veselov A.V., Mulyh I.G., Kljasova G.A. i dr.** Jepidemiologija vozбудitelej kandidozov i ih chuvstvitel'nost' k azolam: rezul'taty issledovanija ARTEMIS Disk v Rossii //Klin. mikrobiol. i antimikrob. himioterapija. 2005. T. 7. № 1. S. 68-76.
5. **Zubov P.V., Novikova V.V.** Razrabotka novyh antibakterial'nyh preparatov: problemy i perspektivy // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2015. № 5. S. 342.
6. **Novikova V.V., Kuchevasova M.V., Kolomojcev A.V.** Struktura dermatomikozov v Permskom krae: kliniko-jepidemiologicheskij analiz // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2016. № 2. S. 30.
7. **Opređenje chuvstvitel'nostik mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: metodicheskie ukazanija / МУК 4.2.1890-04. Утв. 04.03.2004.**
8. **Reshed'ko G.K., Kozlov R.S.** Sostojanie rezistentnosti k antiinfekcionnym preparatam v Rossii: Prakt. Ruk-vo po antiinfekcionnoj himioterapii / Pod red. Strachunskogo L.S., Belousova Ju.B., Kozlova S.N. – М.: RC «Фармединфо». 2007.
9. **Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Ch. 1. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.**
10. **Uhov S.V., Kon'shin M.E., Novikova V.V. i dr.** Sintez i protivomikrobnaja aktivnost' serebrjanyh solej zameshennyh amidov 2-iminokumarin-3-karbo-novoj kisloty // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2004. № 4. S. 15-16.
11. **Cardo D., Horan T., Andrus M., et al.** National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System // J. Infect. control. 2004. Vol. 32. P. 470-85.
12. **Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.** Epidemiological trends in skin mycoses worldwide // Mycoses. 2008. Vol. 51. No. 4. P. 2-15.
13. **Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S., Kaye K., Sobel J.** Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis // Obstetrics & Gynecology. 2012. Vol. 120. Issue 6. P. 1407-1414. doi: <http://10.1097/AOG.0b013e31827307b2>.
14. **Ungpakorn R.** Nondermatophyte infections of the skin and nails: Implications for therapy // Abstracts of The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. 2009. Tokyo. 224 p.

The study of the antimycotic activity of promising compounds of silver salts pyrrolopyrazole

V.V. Novikova, V.L. Gein, O.V. Bobrovskaya

Due to the presence of a stable tendency to progression of resistance of most significant pathogens to antifungal drugs, and also the problems of import substitution, development of new locally produced antifungal drugs is a priority direction of pharmacy and medicine. Antimycotic activity of 5 perspective compounds of silver salts pyrrolopyrazole containing sulfa fragment, against 40 clinical strains of *C. albicans* was investigated. Two most active compounds interesting for further study and identification of pharmacophore groups were identified.

Key words: antifungal activity, silver salts, *Candida albicans*.

**24-25 мая 2017 года в Научном центре биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства проходила
ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и
биомоделирование».**

Конференция проходила на трех площадках. В НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.) проходило заседание симпозиума «Биомоделирование и лабораторные животные», а также «круглый стол» «Перспективы развития лабораторного животноводства», в Санкт-Петербурге на базе кафедры фармакологии Химико-фармацевтической академии состоялось заседание симпозиума «Прикладные биомедицинские исследования в токсикологии, фармакологии и фармации», в Москве в Российском государственном аграрном университете – Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева проходила школа молодых ученых: «Человек и животные. Роль животных в природе и жизни человека». В работе приняло участие более 100 человек с устными и стендовыми докладами, в дискуссиях, обсуждениях на «круглом столе».

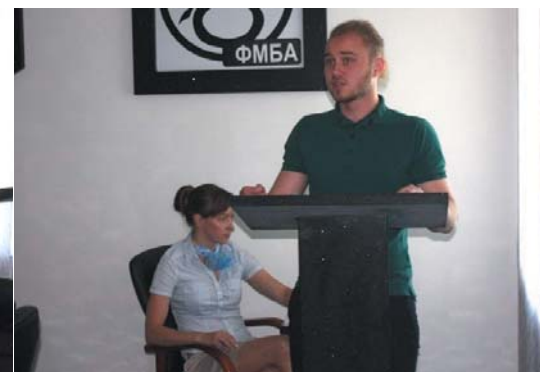
В рамках конференции прошла презентация оборудования фирмы «Metris B.V.» (Нидерланды), которую организовали и провели директор фирмы «Metris B.V.» – Ronald Bulthuis, а также сотрудник Levon Bachdasarian.

На симпозиуме «Прикладные биомедицинские исследования в токсикологии, фармакологии и фармации» был заслушан совместный международный доклад «Моделирование и оценка неврологических нарушений у крыс после черепно-мозговой травмы (controlled cortical impact injury)», авторы Ю.И. Сысоев (Россия), Узуегбунам Брайт (Нигерия).

В работе конференции принимали участие представители Первого Мос-

ковского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, Института токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Российского государственного аграрного университета – Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева, Филиала института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Ветеринарного центра «В мире с животными» (г. Серпухов), Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР), ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, ГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, ФКОУ ВО Пермский институт ФСИН России и других организаций.

Всего на двух симпозиумах было заслушано 27 и представлено 6 стендовых докладов. В «школе молодых ученых» выступило 10 участников со своими презентациями, с их последующим обсуждением и рецензированием. Уже ставший традицией конференции «круглый стол» был посвящен организационным вопросам практического лабораторного животноводства. В нем приняли участие директора филиалов Центра, а также все желающие. Неподдельный интерес у участников и гостей конференции и «круглого стола» вызвала экскурсия по лабораториям Центра.





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

