

4

2017

MEDICINE  
ISSN 2074-5982

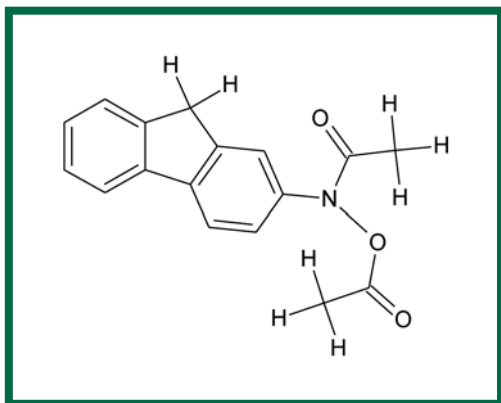
2017

4

# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
ФМБА РОССИИ



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

Как обычно, в конце года мы подводим итоги и планируем наше будущее. Проходящий год был насыщен интересными событиями. По указанию Президента РФ В.В. Путина в НЦБМТ ФМБА России была разработана Программа по получению инновационных лекарственных средств на основе природных соединений Алтайского региона. Результаты

этой работы мы будем отражать на страницах журнала «Биомедицина».

Новый раздел нашей работы касается особенностей фармакокинетики лекарственных препаратов, находящихся в Запрещенном списке и Программе мониторинга ВАДА. Результаты этих работ печатаются в нашем журнале и за рубежом.

Наш журнал остается единственным в стране изданием, публикующим исследования в области лабораторного животноводства. Традиционно мы ориентированы на освещение вопросов новых биомедицинских технологий, релевантного и альтернативного биомоделирования, методов биомедицинских, доклинических и клинических исследований, фармаконутриентов и спортивного питания.

Мы благодарны всем организациям и авторам, взаимодействующим с Научным центром биомедицинских технологий и журналом «Биомедицина». Надеемся на дальнейшее плодотворное сотрудничество.

Приглашаем всех желающих на нашу ежегодную научно-практическую конференцию «Биомедицина и биомоделирование», которая традиционно планируется на конец мая 2018 года.

В соответствии с предложением ВАК от 15 июня 2017 года № 1-пл/1 (Приложение 2) предпочтение при публикации будет отдаваться научным трудам, выполненным по специальностям *медико-биологические науки, физиология, фармацевтические науки, ветеринария и зоотехния.*

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

***Главный редактор  
научного журнала «Биомедицина»,  
академик Н.Н. Каркищенко***

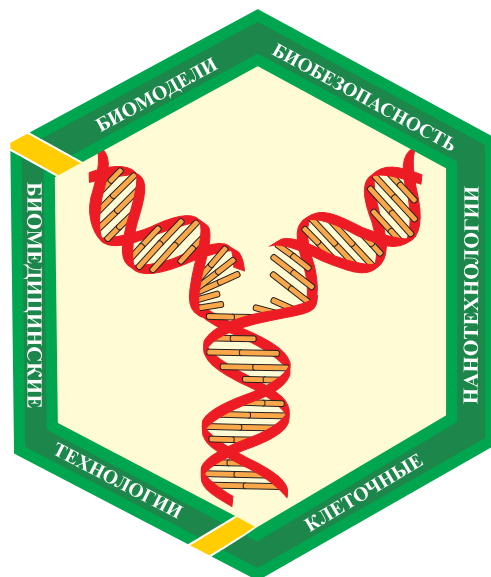
Научный журнал.

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

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

Подписной индекс 57995 в Каталоге «Издание органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и кандидата наук (редакция – март 2017 года)



### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

**Г.Д. Капанадзе**, 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**, Санкт-Петербург

### 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. Зефиров**, 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 15.12.2017  
Тираж 3 000 экз.

## Содержание

### НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

**М.А. Чечушков, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Петрова, А.О. Ревякин**  
Таксономическая характеристика кабарги (*Moschus moschiferus*), разработка и совершенствование методов ее отлова в дикой природе.....4

**М.В. Вялкина, И.Б. Алчинова, Е.Н. Яковенко, Ю.С. Медведева, И.Н. Сабурин, М.Ю. Карганов**  
Долговременные эффекты стволовых клеток на облученных мышей.....18

### МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов**  
К фармакодинамике производных флуорена – тилорона и ингината – на основе ингибирования N-ацетилтрансфераз и продукции цитокинов.....34

**Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, А.А. Николаев, Ю.А. Чудина, Д.Б. Чайванов, А.Е. Емельянова**  
Информативные параметры ультразвуковой вокализации кроликов при высоко- и низкочастотной транскраниальной электростимуляции.....46

**Т.А. Родина, Е.С. Мельников, С.А. Белков, А.А. Данько, А.В. Соколов, А.Б. Прокофьев**  
Терапевтический лекарственный мониторинг нифедипина методом ВЭЖХ-МС/МС при лечении артериальной гипертензии.....53

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

**Н.В. Станкова, М.А. Савина, Г.Д. Капанадзе**  
Особенности адаптации светлогорских мини-свиней к физическим нагрузкам.....70

### ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**А.А. Еманов, М.В. Стогов, В.П. Кузнецов, Е.В. Осипова, Н.В. Тушина, Е.А. Киреева, И.В. Шипицына, А.В. Губин**  
Оценка приживаемости и безопасности применения оссеоинтегрированных чрескостных имплантатов из разных сплавов.....77

**Н.В. Калмыкова, А.А. Андреев-Андриевский, И.А. Демьяненко, В.Н. Манских, Е.А. Лагерева, А.С. Попова, Ю.С. Хац, А.П. Сулов**  
Стимулирующий эффект различных форм коллагеновых раневых покрытий на процесс эпителизации ран кожи.....85

## Content

## NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

**M.A. Chechushkov, G.D. Kapanadze, N.V. Petrova, A.O. Revyakin**  
The taxonomical characteristics of a musk deer (*Moschus moschiferus*), development and improvement of methods for its catching in the wild.....4

**M.V. Vyalkina, I.B. Alchinova, E.N. Yakovenko, Yu.S. Medvedeva, I.N. Saburina, M.Yu. Karganov**  
Long-term effects of stem cells on irradiated mice.....18

## BIOMEDICAL METHODS

**V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, D.V. Khvostov, R.A. Ageldinov**  
To the pharmacodynamics of derivative fluorine – tilorone and inhinate – on the basis of inhibition of N-acetyltransferase and cytokine production .....34

**N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, A.A. Nikolaev, Yu.A. Chudina, D.B. Chayvanov, A.E. Emelyanova**  
Informative parameters of ultrasonic vocalization of rabbits with high- and low-frequency transcranial electrostimulation.....46

**T.A. Rodina, E.S. Melnikov, S.A. Belkov, A.A. Danko, A.V. Sokolov, A.B. Prokofiev**  
Therapeutic drug monitoring of nifedipine by HPLC-MS/MS in treatment of arterial hypertension.....53

## LABORATORY ANIMALS

**N.V. Stankova, M.A. Savina, G.D. Kapanadze**  
Features of adaptation of the Svetlogorsk mini-pigs to exercise stresses .....70

## NON-CLINICAL RESEARCHES

**A.A. Emanov, M.V. Stogov, V.P. Kuznetsov, E.V. Osipova, N.V. Tushina, E.A. Kireeva, I.V. Shipitsyna, A.V. Gubin**  
Evaluation of survival and safety of percutaneous osseointegrated implants made of various metal alloys ...77

**N.V. Kalmykova, A.A. Andreyev-Andrievskiy, I.A. Demyanenko, V.N. Manskikh, E.A. Lagereva, A.S. Popova, Yu.S. Khats, A.P. Suslov**  
The stimulating effect of various forms of collagenic wound coverings on the epithelization process of skin wounds.....85



## Таксономическая характеристика кабарги (*Moschus moschiferus*), разработка и совершенствование методов ее отлова в дикой природе

М.А. Чечушков<sup>1</sup>, Г.Д. Капанадзе<sup>2</sup>, Н.В. Петрова<sup>2</sup>, А.О. Ревякин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – Ассоциация «Центр поддержания популяций редких видов животных «АлтайЭкосфера», Горно-Алтайск

<sup>2</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Чечушков Михаил Алексеевич, [wolker61@mail.ru](mailto:wolker61@mail.ru)

Кабарга (*Moschus moschiferus*) является редким видом животных, поголовье которых постоянно уменьшается. Добыча ведется ради мускусной железы – «струи», поэтому объектом охоты являются самцы. При добыче мускуса животных часто отлавливают браконьерским способом, после чего они обычно не выживают. В работе предложен гуманный метод отлова кабарги в целях ее дальнейшего содержания и прижизненной органосохраняющей добычи мускуса.

**Ключевые слова:** кабарга, мускус, отлов, вольерное содержание, передержка.

### Введение

Родовое и видовое названия кабарги (*Moschus moschiferus*) были даны К. Линнеем в 1758 г. В дальнейшем последовал этап выделения и описания около десяти отдельных видов кабарги из разных частей ареала (*M. altaicus*, *M. chrysogaster*, *M. leucogaster* и др.), что, впрочем, оспаривалось некоторыми исследователями, вновь объединяющими выделенные виды в один.

В систематике до сих пор не выработано четких критериев для разграничения не только видов мелких животных, но и таких крупных зверей, как кабарга и лось. Однако данные о систематиче-

ском разграничении семейства, рода и вида кабарог, даже без учета разногласий в отнесении форм к тем или иным подвидам или видам, необходимы для планирования использования и охраны кабарги в разных частях ареала.

Флеров (1930, 1952) [8, 9] выделял три вида кабарог: обыкновенную кабаргу (*M. moschiferus*), китайско-гималайскую кабаргу (*M. chrysogaster*) и кабаргу Березовского (*M. berezowski*) из провинций Китая Сычуань и Ганьсу. Р. Лидекер и Цалкин (1947) [1, 10] объединили все виды в один прежний.

Кабарог объединяли в одно семейство с оленьками (*Tragulidae*), но

А. Milne-Edwards (1864) [15] выявил значительные различия между оленьками и кабаргами. На других этапах развития науки были попытки объединения их в одно семейство с оленями (*Cervidae*), от которых у кабарог также имеются существенные отличия.

В настоящее время многие зоологи придают кабаргам статус отдельного семейства *Moschidae* в отряде парнокопытных (*Artiodactyla*). Различия во мнениях относительно количества видов в роде *Moschus*, единственного в семействе кабарог, присутствуют и по сей день. Существуют мнения о трех или даже семи видах кабарог [13], один из которых исследователи называют по-разному – *M. chrysogaster* или *M. fuscus*. При этом на территории бывшего Советского Союза и в России обитает один вид кабарги – обыкновенная, или сибирская, кабарга (*M. moschiferus*) [3, 6, 7] – который разделен на пять подвидов:

- 1) *M. m. moschiferus* – Алтай, Саяны, Монголия;
- 2) *M. m. sibericus* – Забайкалье, Якутия;
- 3) *M. m. arcticus* – северо-восточная Сибирь к востоку от р. Лены;
- 4) *M. m. turovi* – Амурская область, Приморский край;
- 5) *M. m. sachalinensis* – Сахалин.

Сибирская кабарга, обитающая в России, отнесена к категории уязвимых видов, численность которых в настоящее время катастрофически снижается. С начала 90-х гг. в сохранившихся местообитаниях северной части ареала происходит быстрое его сокращение и увеличение фрагментарности, что грозит исчезновением этого вида на больших территориях [4, 11, 1].

В большинстве субъектов РФ кабарга относится к охотничьим видам жи-

вотных. Однако ее подвиды (или виды, выделяемые по разным систематическим классификациям в пределах всего ареала), согласно международным и российским правилам и постановлениям, обладают разной степенью защиты. В Красную книгу РФ (редакция 2001 г.) внесен сахалинский подвид обыкновенной кабарги (*Moschus moschiferus sachalinensis*). Ее дальневосточный подвид (*M. m. turovi*) занесен в Приложение 3 Красной книги РФ, в котором указаны виды, требующие повышенного внимания, и в Приложение II Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой уничтожения (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES), что позволяет контролировать торговлю ее дериватами с зарубежными странами. Все виды или подвиды в ареале внесены в Красный список Международного союза охраны природы.

За последние 20 лет численность популяции сибирского подвида сократилась от 140 до 34 тыс. особей [4]. По опросным данным, на территории Республики Алтай за последние годы произошло десятикратное сокращение численности кабарги, и в настоящее время этих животных насчитывается всего около 4 тыс. особей. Среди промысловых копытных животных кабарга оказалась самым уязвимым видом.

Массовому истреблению кабарги положили начало популярность и дороговизна мускуса – секрета препуциальной железы самцов, в состав которого входят разнообразные органические вещества. Вещество, имеющее очень стойкий приятный запах мускуса, – мускон, или мусконоподобные кетоны и альде-

гиды – впервые было выделено в 1906 г. из желез южных подвидов кабарги. Кроме него, в состав мускуса входят воски, мужские стероидные гормоны и другие биологически активные соединения [12, 16]. Мускус обладает общестимулирующим действием, повышает сексуальную активность. Он считается эффективным лекарством от конвульсий, удушья, ушибов и нарывов [14].

В восточной медицине из мускуса изготавливается более ста лекарственных препаратов, часть из которых фальсифицируются путем использования не только железы самцов (струи), но и всей туши или ее части. Вырезать железу из тела убитого самца – самый простой и, разумеется, варварский, способ получения мускуса.

В мировой практике существует одна из форм охраны кабарги – метод разведения в неволе и прижизненное получение мускуса. Это было отмечено советским ученым К.К. Флеровым в 1952 г. Идея была принята китайскими учеными, которые начали domestizieren кабаргу в 1958 г. В 60-х гг. появились кабарожьи фермы и в Индии. Работа велась и продолжается с южными формами, занесенными в Международную красную книгу – такими, как *Moschus sifanicus*, *Moschus chrysogaster*, *Moschus Beresovskij*. При работе, проделанной в середине 80-х гг. к.б.н. В.И. Приходько под руководством акад. В.Е. Соколова в Институте эволюционной морфологии и экологии животных имени А.Н. Северцова АН СССР на Черноголовской экспериментальной базе, с северной формой (*Moschus moschiferus*) есть положительные результаты.

В 2012 г. в Республике Алтай Ассоциация «Центр поддержания популяций

редких видов животных «АлтайЭкосфера» создала первый в России питомник для разведения кабарги в неволе и формирования генетического банка вида. Для создания «стартовой» резервной вольерной популяции животные были отловлены в Прителецкой тайге.

Ниже изложены некоторые особенности по отлову кабарги в дикой природе.

### **Материалы и методы**

#### **Особенности отлова кабарги**

Ввиду малочисленности кабарги и сложности рельефа традиционные методы отлова – отлов с собаками на отстоях и ящичные ловушки – оказались непригодными. Дистанционное обездвиживание при отлове кабарги также оказалось неприемлемым: незаметно подойти на необходимое расстояние, а затем с помощью выстрела попасть шприцом в заднебедренную группу мышц животного размером 5x5 см практически невозможно. Петли с фиксаторами и амортизаторами также не подходят для отлова кабарги, т.к. в результате попадания в петлю животные очень сильно травмируются и, как правило, в дальнейшем погибают.

В условиях горно-таежной местности Восточного Алтая наилучший результат был получен при использовании сетевого отлова и живоловушками типа «Баспак» [5]. Наиболее подходящим временем года для отлова на территории Горного Алтая является период с октября по февраль. Наиболее активна кабарга в период гона – с конца ноября до конца декабря. В это время самцы могут удаляться от своих участков на 3-4 км. В остальное время года они держатся на небольших, площадью 2-4 км<sup>2</sup>, индивидуальных участках обитания. В зимний



период площадь таких участков может уменьшаться до 0,5-1,0 км<sup>2</sup>. В весенний период самки беременны, а в летний – выкармливают молодняк.

Т.к. применяемые методы отлова не дифференцируют пойманных животных по половому признаку, отлов в другие сроки может нанести вред самкам и молодняку. Кроме этого, в бесснежный период невозможно определить известными методами численность кабарги.

Информацию о численности животных можно получить, используя опросные данные от охотников, охотоведов охотничьих хозяйств. На основании полученных сведений определяются участки отлова, а на месте проводится точечный учет.

Методики учета выбираются в зависимости от рельефа, количества участников отлова и времени года. В основу современных методов учета кабарги положена методика комплексного учета животных на зимних маршрутах, предложенная И.В. Жарковым и В.П. Тепловым в 1958 г.

Методы учета многих видов копытных сходны и основаны на математических расчетах численности животных по их следам. Составляется схема района отлова с отмеченной на ней областью распространения кабарги и контурами различной ее плотности.

**При отлове кабарги необходимо соблюдать некий алгоритм:**

1. Организация бригад для отлова и оформление соответствующих разрешений. Подготовка материальных ресурсов для работы (клетки, сети и проч.). Обучение персонала обращению с пойманными животными.

1.1. Разведка и картирование местности.

1.2. Выбор площадок отлова и точечный учет.

1.3. Обустройство временных мест для передержки пойманных животных.

1.4. Изготовление на выбранных площадках живоловящих ловушек «Баспак».

1.5. Выставление сетей и засек.

1.6. Отлов (загон и т.п., радиофицированные ловушки).



Рис. 1. Типичные станции кабарги.

2. Транспортировка и передержка пойманных животных.

3. Выпуск в подготовленные вольеры.

### **Методики и материалы для отлова**

Материалы собраны на основе наблюдений и опыта отлова кабарги в Турочакском районе Республики Алтай, в водоразделах рек Пыжа, Учал, Ивий, Самыш.

#### ***Сетевой отлов***

Кабарга, бегущая от загонщиков, замечает сеть с расстояния 10-20 м и часто бежит параллельно сети или поворачивает в сторону гона. Лишь внезапно напуганные, быстро бегущие звери не успевают среагировать на сеть и попадают в нее. На этой особенности и основана тактика отлова сетями.

Для отлова необходимы две группы людей – ловцы и загонщики. На сеть длиной 1 км необходимо не менее десяти загонщиков и восьми ловцов. Задача загонщиков – выставить зверей к сети

и не дать им уйти назад. Цепь загонщиков с выдвинутыми вперед флангами с небольшим шумом двигаются в сторону сети, соблюдая равнение, заданное направление и дистанцию. Для координации своих действий используются портативные радиостанции. Прогонки можно делать с двух сторон, не забывая перевешивать и запахивать сеть в сторону гона. Если животные были замечены, но не попались, то на ночь можно опустить сеть и повторить на этом месте прогонки на следующий день.

Задача ловцов – испугать бегущих животных и удерживать их в сети. Ловцы располагаются перед линией сетей на расстоянии 40-50 м и в 70-100 м друг от друга. Ожидая зверя, нельзя шуметь, курить, передвигаться (максимальная маскировка). Бегущую кабаргу ловец пропускает мимо себя и, как только оказывается сзади, с криком бежит за ней и при попадании удерживает в сети, не давая биться о землю и деревья.



Рис. 2. Выставленные сети.

Сети для отлова кабарги изготавливаются из прочного капронового шнура толщиной 3-4 мм. Оптимальный размер ячейки – 10x10 см. При меньшем размере ячейки в нее не всегда помещается голова, звери плохо запутываются, т.е. сеть оказывается малоуловистой. При большем размере ячейки сеть не задерживает сеголеток и даже взрослых самок. Высота сети должна быть не менее 2,2 м.

Общая длина выставляемых сетей зависит от рельефа местности, количества людей и транспорта. Линию сетей составляют из отдельных звеньев, длина которых может быть различной. С короткими звеньями (25-30 м) удобно работать в зарослях. К тому же, при попадании кабарги в сеть падают на землю только одно-два соседних звена, не нарушая целостность всей остальной линии. Кроме этого, со звеньями сетей длиной более 30 м трудно работать из-за их тяжести.

При изготовлении сети капроновая дель «сажается» на шнур («тетиву») толщиной 6-8 мм только с одной стороны. «Тетива» с каждой стороны должна быть на 1 м длиннее отрезка дели. Эти концы служат для связывания сетей. Если отлов производится в бесснежный период, то для маскировки сеть окрашивается в темный цвет.

Сетевой отлов лучше проводить в дневное время. Выставлять сети рекомендуется поперек северных склонов, снизу вверх. Сеть навешивают на вбитые в кору деревьев гвоздики без шляпок на высоте 1,8-1,9 м или на заранее заготовленные колышки. Сеть вешается на колышки с внешней стороны от линии загона. Нижний край подворачивают также в сторону загона.

#### ***Живоловушка «Баспак»***

Следующей и окончательной продуктивной конструкцией для отлова является сетевая ловушка, устроенная по принципу кулемы и шатра.



Рис. 3. Настороженная живоловушка «Баспак».

Основу ловушки составляют две продольные жерди длиной 4,5-6 м и толщиной в отрубе 12-18 см (рис. 3). Их толстые концы соединены поперечными более тонкими жердями в 6-7 см, образующими таким образом раму размером 1,5х1,5 м. На эту раму натянута слегка посаженная сеть, имеющая небольшой колпак, достаточный только для того, чтобы при попадании кабарга могла стоять во весь рост.

Сеть изготавливается из шнура толщиной в 2-3 мм. Размер ячеек – 5 см. Сеть квадратная, по 30 ячеек на каждой стороне. Такой размер, при раме 1,5х1,5 м, вполне достаточен для того, чтобы сеть образовала небольшой колпак, упомянутый выше.

Данная конструкция ловушки удобна для установки как в проходах засек (вместо жердей можно использовать жестко натянутые сети), так и на кормовых площадках и в местах естественной кормежки кабарги.

В засеках, в зависимости от рельефа, ловушки ставятся или вдоль, или поперек. Удобнее и конструктивно целесообразнее располагать ловушку вдоль засеки, но, в некоторых случаях, вполне допустим и второй вариант.

На кормовых площадках и в местах естественной кормежки кабарги ловушки устанавливаются в самых различных направлениях в отношении склона, что обусловлено необходимостью выбора наиболее ровной площадки. Ровные площадки, на которые рама ловушки должна «лечь» при падении наиболее плотно, являются неперенным условием. В тех случаях, когда по условиям рельефа такую площадку выбрать нельзя, лучше отказаться от установки ловушки в намеченном месте [2].

Следует строго следить за тем, чтобы при падении рама ловушки не могла зависнуть на валежнике, камне, кочке, т.к. в подобных случаях кабарга выйдет через образовавшуюся щель.

Скреплять раму ловушки можно веревками, сделав предварительно в толстых жердях зарубки для поперечин. Укреплять сеть на раме удобнее всего следующим способом: после того, как основная рама готова, следует вырубить четыре тонких, в 3-3,5 см, палки длиной 1,5 м. Лучше всего – из ивы или сухостойных тонких пихт. На эти палки сеть насаживается крайними ячейками по всем четырём сторонам, затем необходимо наложить ее на основную раму. Палки, на которые посажена сеть, следует привязать к основной раме веревками в трех-четырёх местах.

Настораживание ловушки производится двумя рабочими: один поднимает ловушку за веревку, привязанную в передней части рамы, а другой подводит под эту веревку мотырь. Передний край рамы поднимается приблизительно на 1 м от земли, и в таком положении ловушка закрепляется сторожком.

Употребляется обычная насторожка для кулем и снастей на копытных. Симка делается из полипропиленового шнура и натягивается не слишком туго на расстоянии 25-30 см от земли. Симка из других материалов не годится, т.к. в сырую погоду она может сильно натягиваться и спускать урлок.

В тех случаях, когда ловушка устанавливается в засеке, симка протягивается поперек прохода, а ее концы закрываются воткнутыми в снег ветками пихты. Проход от этого несколько сужается, но зато кабарга проходит всегда под серединой сети, и поперечные жер-

ди рамы при падении ловушки не ударяют животное.

При установке ловушек без засеки симка протягивается поперек предполагаемого хода кабарги и также закрывается с концов ветвями.

Наибольший эффект дает приманка в виде лишайника, разбрасываемого под ловушками и вокруг них. На кормовых площадках и в местах естественной кормежки кабарги выкладывание приманки из лишайника является неперенным условием, рассчитанным на то, что животное пойдет за приманкой под сеть и заденет насторожку.

Кроме этого, в виде приманок можно использовать территориальные метки самцов, экскременты из «обширных уборных» на магистральных тропах. При учетах и разведке местности они собираются и выкладываются в ловушки.

В ловушках, устанавливаемых в местах переходов (в засеках), приманка обязательно выкладывается для того, чтобы кабарга, минуя проход, несколько задержалась бы под ловушкой и накрылась в ее середине.

Маскировка ловушек не обязательна. Кабарга попадает с одинаковым успехом как в замаскированные, так и в незамаскированные ловушки. Эффективность ловушек, установленных на кормовых площадках и в местах естественной кормежки кабарги, одинакова и вдвое выше, чем эффективность ловушек в сплошной засеке.

Устройство засек требует большей затраты труда, во много раз превышающей таковую при устройстве кормовых площадок, поэтому следует отдавать предпочтение кормовым площадкам и местам естественной кормежки. Основ-

ной причиной ухода кабарги из ловушек является непрочность сетей низкого качества.

Большое значение имеет величина ячеек сети. Размер в 10 см и более является неудобным, т.к. попадающее в ловушку животное может просунуть в ячейку голову и «стереть» себе шею при попытке выбраться из сети. Размер в 3,5 см и менее по стороне является нецелесообразно мелким и значительно удорожающим работу по изготовлению сетей. Самой оптимальной принято считать ячейку в 5 см по стороне. В такую ячейку кабарга не может просунуть голову, не запутывается в сети и остается невредимой.

Причина половины всех случаев ухода кабарги из ловушки – прорывы сети. В некоторых случаях животные уходят под раму из-за неплотного прилегания ее к земле. Иногда кабарга «проскакивает» под ловушкой на быстром ходу, спустив насторожку, но не накрывается сетью, и также проходит под ловушкой, не тронув насторожки, т.к. курок после отпели смерзается со сторожкой. Такие причины, как прорывы сетей и уход под раму, легко устранимы: «проскакивание» под ловушкой на быстром ходу отмечается только в тех ловушках, которые установлены в местах переходов кабарги (засеке), а в ловушках, устанавливаемых на кормовых площадках и в местах естественной кормежки, таких случаев не бывает.

При настораживании ловушки очень важно не допускать смерзания частей настораживающего механизма, которое происходит главным образом от попадания на него снега. Снег, подтаивая во время отпели, смерзается и затем крепко спаивает насторожки, выводя

ловушку из строя. Предотвратить попадание снега можно, покрывая куском бересты основные части механизма.

Применение этого типа ловушки позволяет полностью исключить случаи гибели или тяжелых повреждений животных при отлове. Животные, попавшие в правильно установленные ловушки с сетями из прочного шнура и ячейкой в 5 см, повреждений, как правило, не получают.

Сопоставление частоты попадания в ловушку и уровня барометрического давления показало тесную связь между этими показателями: эпизоды попадания почти во всех случаях совпадают с повышением давления после низких значений, длятся обычно 2-3 дня и чаще всего следуют за периодами наибольшей активности кабарги. Данная зависимость дает возможность прогнозировать попадания животных в ловушки.

Для сигнализации при успешном попадании кабарги в ловушку впервые в практике отлова копытных отлично зарекомендовал себя модернизированный радиоохранный отечественный комплекс «Ринг» фирмы «Альтоника». Он состоит из приемника с возможностью получения сигнала от 20-ти передатчиков, ретранслятора, выносных антенн, аккумуляторов. На ловушку скрытно устанавливается передатчик с датчиком-геркон. При срабатывании ловушки контакты размыкаются и сигнал поступает на приемник, установленной на базе отлова. На табло приемника высвечивается номер передатчика и раздается звуковой сигнал. При установке все ловушки заносятся на карту-схему, и участники отлова быстро оказываются на месте срабатывания

датчика. Данный способ позволяет минимизировать время нахождения зверя в ловушке, в результате чего уменьшается травматизм и стресс. Дальность действия на пересеченной горной местности составляет порядка шести км. Для устойчивой связи на господствующих вершинах выставляются ретрансляторы с выносной антенной.

#### **Техника фиксации пойманных животных**

У каждого ловца должны быть с собой вязки на ноги из эластичного бинта, кусок мягкой материи размером 1,5x1,5 м, колпачок. Колпачок шьется из мягкой ткани и надевается на голову кабарге, оставляя свободными только нос, рот и уши, плотно закрывая глаза.

Проверка ловушек и выпутывание из сетей производится двумя рабочими. Один схватывает животное за ноги, выше скакательного сустава, и укладывает на землю. Другой, приподняв ловушку или сеть, надевает кабарге на голову колпачок, и животное сразу перестает биться. Затем мягким бинтом связывают ноги и освобождают животное из ловушки. Транспортные боксы должны быть размещены вдоль линии сетей и замаскированы.

У кабарги сильные конечности, острые копыта и опасные клыки (у самцов). Следует стараться подходить со спины, накрывая животное куском ткани, удерживать задние конечности. Работать лучше в толстых брезентовых рукавицах. Пойманному зверю закрывают глаза колпачком и, выпутывая из сетей или ловушек, связывают ноги эластичным бинтом. Поскольку отлов происходит в холодное время года, пойманное животное, во избежание простуды, кладут на правый бок на подстилку.



Рис. 4. Пойманная кабарга.

Нельзя долго держать животных связанными конечностями, следует как можно быстрее поместить его в транспортировочный бокс. В некоторых случаях для успокоения животному можно ввести транквилизатор, снимающий нервное напряжение и купирующий двигательное возбуждение. Хорошо проявил себя Золетил 100 (Франция) в дозе 0,5-1 мг. Наилучший эффект дает использование комбинированных инъекций. Для успокоения отловленных животных можно применять барбитурат этаминала с аминазином в соотношении 30-35/15-20 мг/кг. При передозировке внутримышечно вводят 0,5 мл 10% р-ра коразола. При сильных морозах в зимний период иммобилизация не требуется [5].

#### **Транспортировка и передержка**

Исключительно важным этапом отлова является правильная организация транспортировки и доставки животных с места отлова на временную базу.

На временной базе должны быть заранее подготовлены транспортные клет-

ки. На расстоянии 50-60 м от жилья следует оборудовать временный навес под транспортные клетки. Очень важно соблюдать при работе с пойманными животными режим тишины. Нахождение рядом техники, собак, лошадей и других факторов беспокойства для пойманных животных исключено.

Транспортные боксы должны быть разнесены вдоль линии сетей и замаскированы. В клетках и боксах заранее выкладывается сухая подстилка (лесное сено), корма (лишайник) и питье (чистая вода в чашках-поилках или снег, при отрицательных температурах). Практика показывает, что максимальный отход (гибель) пойманных животных происходит в момент транспортировки и передержки животных. Несмотря на стресс, основной причиной гибели животных являются травмы, полученные при отлове и передержке. В целях исключения гибели животных не следует передерживать их на месте отлова в накопителе временной базы. Доставку пойманных животных к месту выпуска в вольер

желательно осуществить в течение одного-двух дней. При транспортировке следует избегать их переохлаждения и перегрева [4].

Транспортировка отловленных в природе животных производится в транспортных клетках по одному животному в клетке.

Разработано два типа транспортных клеток: тип 1 – создан для транспортировки животных и передержки (рис. 5), тип 2 – портативный бокс, сконструированный для транспортировки животных из труднодоступных мест отлова (рис. 6). В каждом боксе при транспортировке должно быть до-



Рис. 5. Транспортная клетка (тип 1, фанера, 120x80x52 см).



Рис. 6. Бокс для переноски (тип 2, фанера, 80x32x51 см).



статочное количество корма (в идеале – лишайник, смоченный водой или пропитанный снегом, в зависимости от сезона). Если транспортировка занимает более суток, необходимо иметь запас корма.

Клетки и боксы снабжены двумя шиберами для удобства перегона животных. В одном из шиберов в верхней части делается отверстие 15x10 см и закрывается куском брезента, что необходимо для наблюдений за поведением пойманной кабарги. По периметру просверливаются вентиляционные отверстия диаметром 12 мм. При передержке корм (лишайник) выкладывается на сухую сенную подстилку, по мере поедания его следует добавлять. Наличие чистой питьевой воды *ad libitum* увеличивает адаптацию к неволе и выживаемость.

Передержка животных в транспортировочных боксах перед их выпуском в вольеры является обязательной процедурой. Оптимальная продолжительность периода передержки составляет 2-4 дня. Транспортировочные боксы следует располагать на жердях во избежание забивания нижних вентиляционных отверстий снегом.

Наибольшую опасность для животных в период передержки составляет угроза переохлаждения или перегрева из-за малой подвижности в ограниченном пространстве. Чтобы этого избежать, а также осуществить санацию клеток, следует перегонять животное в новую клетку каждые два дня. Особенно важна данная процедура в зимний период.

***При работе с животными во время отлова, транспортировки и передержки необходимо соблюдать тишину.***

Позитивными показателями при выпуске пойманных животных из передержки в вольеры являются хороший

аппетит, активный процесс жвачки, незалеживаемость, поскребывание конечностями пола клетки, высоко поднятая голова на лежке и вставание при подходе человека. Очень важно не давать кабарге залеживаться в клетке.

Наблюдать за состоянием животного на первом этапе передержки следует каждые 3 ч.

### **Выводы**

1. В современных условиях численности популяции сибирской кабарги предложенные методы отлова являются наиболее приемлемыми и относительно бестравматичными для дальнейшей адаптации отловленных животных в вольерах.

2. Метод отлова сетевой ловушкой «Баспак» обладает достаточно высокой эффективностью.

3. Правильно изготовленные и установленные сетевые ловушки не наносят попавшим в них животным каких-либо повреждений.

4. Сетевой отлов продуктивен, но более травмоопасен для животных.

5. Основными травмами при отлове с помощью сетей являются разрывы мышц задних конечностей и повреждения сухожилий.

6. При отлове рекомендуется применять модифицированный радиоохранный комплекс «Ринг-Альтоника».

7. Обеспечение иммобилизации при отлове, транспортировке и при ветеринарных манипуляциях позволяет сохранить животным жизнь.

8. Пребывание кабарги в транспортных клетках в течение 2-7 дней не влечет за собой каких-либо заметных осложнений состояния ее здоровья.

9. Длительное (более одной недели) содержание кабарги в транспортных

клетках служит угрозой гибели животных от разрыва кровеносных сосудов вследствие резкой смены неподвижности на привычный уровень двигательной активности.

10. Минимизировать стресс в период отлова, транспортировки и передержки можно соблюдением максимальной тишины при контакте с пойманными животными.

11. В течение всего срока пребывания животных в клетках необходимо осуществлять постоянный мониторинг общего состояния, вести журнал с отметками о времени кормления, уровне аппетита и других признаках адаптации к неволе.

12. Обязательно ведение дополнительного журнала отлова с указанием места, времени года и суток, когда животное было поймано, способа отлова (ловушка, сеть), пола, приблизительного возраста, характерных фенотипических признаков, травм (при наличии), уровня готовности к принятию пищи и воды при транспортировке и передержке.

13. При поимке трех-четырех животных следует менять район отлова во избежание инбридинга при комплектовании вольерных групп.

### Список литературы

1. **Зайцев В.А.** Кабарга: экология, динамика численности, перспективы сохранения. – М.: Изд-во Центра охраны дикой природы. – 2006. – 120 с. ISBN 5-93699-052-4.
2. **Перелешин С.Д.** Опадные самоловы на дичь. – М.: КОИЗ. – 1934. – 28 с.
3. **Приходько В.И.** Кабарга. Происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация. – М., 2003. – 443 с.
4. **Приходько В.И.** Разведение кабарги: научно-практические рекомендации. Российская акад. наук, Ин-т проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова. – Изд. 2-е, доп. – М., 2013. – 141 с.

5. **Соколов В.Е.** Европейская и сибирская косули: Систематика, экология, поведение, рациональное использование и охрана. – М.: Наука. – 1992. – 399 с.
6. **Соколов В.Е., Приходько В.И.** Систематика кабарги (*Artiodactyla*, *Mammalia*). Сообщ. I // Известия АН. Сер. Биол. – 1997. – № 6. – С. 677-687.
7. **Соколов В.Е., Приходько В.И.** Систематика кабарги (*Artiodactyla*, *Mammalia*). Сообщ. II // Известия АН. Сер. Биол. – 1998. – № 1. – С. 37-46.
8. **Флеров К.К.** Кабарги и олени // Фауна СССР. Млекопитающие. – 1952. – Вып. 1. – Т. 1. – № 55. – 256 с.
9. **Флеров К.К.** К систематике и географическому распространению кабарги (*Moschus moschiferus* L.) // Ежегодник Зоол. Музея Акад. наук СССР. – 1930. – Т. XXXI. – Вып. 1. – С. 1-20.
10. **Цалкин В.И.** Систематика кабарги (род *Moschus* L., 1758) // Гептнер В.Е., Цалкин В.И. Олени СССР. – М., 1947. – С. 120-176.
11. **Шапошников Ф.Д.** Материалы к экологии кабарги северо-восточного Алтая // Зоол. журнал. – 1956. – Т. 35. – Вып. 7. – С. 1084-1093.
12. **Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E.** Study on the Components of Musk. I. Ether Soluble Components // Chem. Phann. Bull. – 1975. – V. 23. – No. 3. – Pp. 629-635.
13. **Green M.J.B.** The distribution, status and conservation of the Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*) // Biological conservation. – 1986. – No. 35. – Pp. 347-375.
14. **Lee T.H.** Measure and current usage status in Korea of medicine made with endangered species // Proceedings of the Seminar on International Trade in Endangered Wild Fauna and Flora. TRAFFIC East Asia. Ministry of Environment and Ministry of Health and Welfare, Seoul, Republic of Korea. 1995.
15. **Milne-Edwards A.** Recherches sur la faune des Chevrotains // Ann. Sc. Nat. Zool. – 1864. – Ser. V. II.
16. **Yu D., Das B.C.** Structure of hydroxymuscopuridine A and hydroxymuscopuridine B, two new constituents of musk // Planta Med. – 1983. – V. 49. – No. 3. – Pp. 183-184.

### References

1. **Zajcev V.A.** Kabarga: jekologija, dinamika chislennosti, perspektivy sohranjenja [Kabarga: ecology, population dynamics, and prospect of preservation]. Moscow: Izdatelstvo Centra ohrana

- ny dikoj prirody. 2006. 120 p. ISBN 5-93699-052-4. (In Russian).
2. **Perelshin S.D.** Opadnye samolovy na dich' [Opadnye of a samolova on a game]. Moscow: KOIZ. 1934. 28 p. (In Russian).
  3. **Prihod'ko V.I.** Kabarga. Proishozhdenie, sistematika, jekologija, povedenie i kommunikacija [Origin, systematics, ecology, behavior and communication]. Moscow, 2003. 443 p. (In Russian).
  4. **Prihod'ko V.I.** Razvedenie kabargi: nauchno-prakticheskie rekomendacii [Cultivation of a musk deer: scientific and practical recommendations]. Rossijskaja akad. nauk, In-t problem jekologii i jevoljucii im. A.N. Severtsova [The Russian Academy of Sciences, Institute of environmental problems and evolution of A.N. Severtsov]. Izd. 2-e, dop. [Ed. 2 nd, ext.]. Moscow, 2013. 141 p. (In Russian).
  5. **Sokolov V.E.** Evropejskaja i sibirskaja kosuli: Sistematika, jekologija, povedenie, racional'noe ispol'zovanie i ohrana [European and Siberian roe deer: Systematics, ecology, behavior, rational use and protection]. Moscow: Nauka. 1992. 399 p. (In Russian).
  6. **Sokolov V.E., Prihod'ko V.I.** Sistematika kabargi (Artiodactyla, Mammalia). Soobshh. I [Systematics of a musk deer (Artiodactyla, Mammalia). Msg. I]. Izvestija AN. Ser. Biol. [Proceedings of the Academy of Sciences. Series Biology]. 1997. No. 6. Pp. 677-687. (In Russian).
  7. **Sokolov V.E., Prihod'ko V.I.** Sistematika kabargi (Artiodactyla, Mammalia). Soobshh. II [Systematics of a musk deer (Artiodactyla, Mammalia). Msg. II]. Izvestija AN. Ser. Biol. [Proceedings of the Academy of Sciences. Series Biology]. 1998. No. 1. Pp. 37-46. (In Russian).
  8. **Flerov K.K.** Kabargi i oleni [Musk deer and deer] Fauna SSSR. Mlekopitajushhie [Fauna of the USSR. Mammals]. 1952. Issue 1. T. 1. No. 55. 256 p. (In Russian).
  9. **Flerov K.K.** K sistematike i geograficheskomu rasprostraneniu kabargi (*Moschus moschiferus* L.) [To the taxonomy and geographical distribution of a musk deer (*Moschus moschiferus* L.)]. Ezhegodnik Zool. Muzeja Akad. nauk SSSR. [Yearbook of the Zoological Museum of the USSR Academy of Sciences]. 1930. T. XXXI. Issue 1. Pp. 1-20. (In Russian).
  10. **Calkin V.I.** Sistematika kabargi (rod *Moschus* L., 1758) [Systematics of a musk deer (genus *Moschus* L., 1758)]. Geptner V.E., Calkin V.I. Oleni SSSR [Deer of the USSR]. Moscow, 1947. Pp. 120-176. (In Russian).
  11. **Shaposhnikov E.D.** Materialy k jekologii kabargi severo-vostochnogo Altaja [Materials to ecology of a musk deer of northeast Altai] Zool. zhurnal [Zoological journal]. 1956. T. 35. Issue 7. Pp. 1084-1093. (In Russian).
  12. **Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E.** Study on the Components of Musk. I. Ether Soluble Components. Chem. Phann. Bull. 1975. V. 23. No. 3. Pp. 629-635.
  13. **Green M.J.B.** The distribution, status and conservation of the Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*). Biological conservation. 1986. No. 35. Pp. 347-375.
  14. **Lee T.H.** Measure and current usage status in Korea of medicine made with endangered species. Proceedings of the Seminar on International Trade in Endangered Wild Fauna and Flora. TRAFFIC East Asia. Ministry of Environment and Ministry of Health and Welfare, Seoul, Republic of Korea. 1995.
  15. **Milne-Edwards A.** Recherches sur la fatile des Chevrotains. Ann. Sc. Nat. Zool. 1864. Ser. V. II.
  16. **Yu D., Das B.C.** Structure of hydroxymuscopyrindine A and hydroxymuscopyrindine B, two new constituents of musk. Planta Med. 1983. V. 49. No. 3. Pp. 183-184.

## The taxonomical characteristics of a musk deer (*Moschus moschiferus*), development and improvement of methods for its catching in the wild

M.A. Chechushkov, G.D. Kapanadze, N.V. Petrova, A.O. Revyakin

Musk deer (*Moschus moschiferus*) is a rare species of animals, the number of which is constantly decreasing. The extraction is carried out for the sake of the musk gland – “streams”, therefore the object of hunting is the males. With the extraction of musk, animals are often caught in a poaching manner then they usually do not survive. The paper offers a humane method of catching musk deer for the purpose of its further enclosure keeping and lifetime organ-preserving musk production.

**Key words:** musk deer, musk, catch, aviary content, overexposure.

## Долговременные эффекты стволовых клеток на облученных мышей

М.В. Вялкина, И.Б. Алчинова, Е.Н. Яковенко, Ю.С. Медведева,  
И.Н. Сабурин, М.Ю. Карганов

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

Контактная информация: д.б.н. Карганов Михаил Юрьевич, [mkarganov@mail.ru](mailto:mkarganov@mail.ru)

Мышей линии C57Bl/6Y облучили гамма-излучением в сублетальной дозе 7,5 Гр. Через 3 ч им были внутривенно введены мультипотентные мезенхимные стромальные клетки из костного мозга в дозе  $10^6$  клеток на мышь. Использованные методы: определение массы тела, тест поведения в «открытом поле», исследование субфракционного состава сыворотки крови (лазерная корреляционная спектроскопия), гистологическое исследование селезенки, печени и поджелудочной железы, подсчет Т- и В-клеток (цитометрия), лейкоцитарная формула крови. Через 1,5 и 3 мес. было выявлено промежуточное положение изучаемых параметров животных, получивших клетки, между показателями интактного и облученного контролей, что позволяет судить о частичном терапевтическом эффекте введенных клеток.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, костный мозг, гамма-излучение, лазерная корреляционная спектроскопия, регенеративная медицина.

### Введение

Разработка новых способов терапии острых и отдаленных последствий облучения обусловлена все возрастающей террористической угрозой и возможностью техногенных катастроф на ядерных объектах. Острые эффекты высоких доз радиации, приводящие к лучевой болезни, изучены достаточно хорошо. Наиболее ярко они проявляются в клетках костного мозга, желудочно-кишечном тракте, сердечно-сосудистой и центральной нервной системах [19].

Облучение в сублетальных дозах с течением времени приводит к развитию симптомокомплекса, сходного с синдромом полиорганной недостаточности, а затем и к отказу отдельных органов [23]. Хотя эти эффекты считаются дозозависимыми, прогноз отказа того или иного органа затруднен в связи с различной

радиочувствительностью даже клеток одной ткани [23], не говоря уже об индивидуальной радиочувствительности.

В связи с этим появляется необходимость разработки эффективной терапии, способной воздействовать не только на критически поврежденный орган, но и на весь организм. Кроме того, обязательным условием должна быть возможность применения данной терапии в течение короткого времени после повреждающего воздействия, чтобы предотвратить смерть и защитить облученные клетки.

В настоящее время как прогрессивную методику такого подхода интенсивно изучают трансплантацию мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) из разных источников, таких как костный мозг, пуповинная кровь, жировая ткань и др. [14, 16, 20].

## Материалы и методы

### Подготовка ММСК из костного мозга

Для получения первичной культуры ММСК костного мозга человека мононуклеарную фракцию клеток изолировали из костного мозга подвздошного гребня здоровых доноров градиентным центрифугированием с фиколлом. Полученные клеточные суспензии центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин, супернатанты сливали, осадки ресуспендировали в ростовой среде ( $\alpha$ -МЕМ, 17% FCS, L-глутамин (2мМ), 1% пенициллин-стрептомицин). Клетки высевали в высокой плотности ( $1 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>) в чашки Петри. Через 24 ч не прикрепившиеся клетки удаляли вместе с ростовой средой, прикрепившуюся культуру отмывали р-ром Хенкса, добавляли свежую питательную среду и продолжали инкубировать в течение 4-8 сут. При достижении первичными культурами 70% конfluence клетки отмывали р-ром Версена, снимали с пластика, инкубируя в течение 3-5 мин при 37°C в 0,25% р-ре трипсина, центрифугировали (10 мин при 1000 об/мин), ресуспендировали в ростовой среде для инактивации трипсина, вновь центрифугировали и высевали в чашки Петри в полной питательной среде (DMEM/F12 1:1), L-глутамин (2 мМ), 1% пенициллин-стрептомицин, FGF (10 нг/мл), ИТС (1:100, 10% FCS) с плотностью 100 клеток/см<sup>2</sup>.

В ходе культивирования культура ММСК становилась менее гетерогенной и уже после 2-го пассажа была представлена в основном (более 90%) мелкими клетками (6-9 мкм).

ММСК экспрессировали маркеры к CD73 (95%), CD90 (79%), CD105 (98%) и не экспрессировали к CD14 (1,1%),

CD34 (1,31%), CD45 (0,6%), CD49b (1%). Высокий уровень экспрессии маркерных белков является важным критерием чистоты и качества культуры ММСК с преобладанием клеток-предшественников с высокой клоногенной активностью, пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. Данные клеточные культуры ММСК применялись во всех дальнейших экспериментах.

### Животные и экспериментальные группы

Работа была выполнена на самцах мышей линии C57Bl/6Y (получены из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) средней массой 25-27 г.

Животные содержались в виварии, по 5-10 особей в пластиковых клетках на подстилке из мелкой древесной стружки, со свободным доступом к корму и воде.

Мышей облучали гамма-излучением до сублетальной дозы 7,5 Гр при интенсивности 5,4 Р/мин на цезиевом облучателе «Панорама» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, Москва).

Были сформированы следующие группы: интактный контроль (n=11); облученная группа (n=19) – животные, подвергнутые действию гамма-излучения; опытная группа (n=41) – животные, подвергнутые действию гамма-излучения и получившие через 3 ч внутривенную инъекцию изучаемых клеток в дозе  $10^6$  клеток/мышь; «зеленый белок» (n=6) – опытные животные, получившие инъекцию клеток, содержащих ген зеленого белка (green fluorescent protein).

На 1-й, 3-й, 6-й неделях и через 3 мес. оценивали физиологические параметры

и ответные реакции организма на облучение.

Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

#### **Взвешивание животных**

Измерение массы тела животных проводили на весах марки Mettler Toledo, за 1 час до взвешивания животных лишали корма. Вычисляли прирост массы каждого животного в процентах по сравнению с исходным измерением.

#### **Поведенческий тест «Открытое поле»**

Для изучения параметров двигательной активности грызунов после действия сильного стрессогенного фактора использовали установку «Открытое поле» Opto-Varimex («Columbus instruments», США). В тесте оценивали вертикальную и горизонтальную двигательную активность. Длительность теста составляла 3 мин. Тестирование проводилось в квадратной камере размером 45x45 см при освещении в 40 Лк.

#### **Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС)**

Субфракционный состав сыворотки крови оценивали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Этот метод основан на анализе спектров квазиупругого светорассеяния когерентного монохроматического излучения лазера на частицах биологических жидкостей [3]. Гистограммы распределения вклада в светорассеяние дают информацию о средних размерах частиц и их относительном содержании. Прямое соответствие определенных фрагментов спектра биологической природе компонентов

сыворотки может быть выявлено в дополнительных исследованиях.

#### **Гистологическое исследование селезенки, печени и поджелудочной железы**

В конце эксперимента все животные были подвергнуты эвтаназии путем передозировки анестезирующего препарата с дальнейшим взятием органов (печень, поджелудочная железа, селезенка) для проведения гистологического исследования с целью оценки повреждающего действия облучения. Органы фиксировали в 4% р-ре нейтрального формалина. Препараты готовили согласно принятой методике [6].

Для упрощения обработки материала в зависимости от степени изменения морфологии клеток и тканей были выделены несколько степеней тяжести повреждений [8]. Изменения органов, описываемые второй, третьей, четвертой и пятой степенями, характерны для лимфоидного или миелоидного лейкоза разной степени тяжести (нулевая степень – норма, первая – незначительные изменения тканей селезенки и печени). В описании гистологии поджелудочной железы первая степень характеризовала атрофию паренхимы органа.

#### **Исследование изменений в картине крови**

Забор крови у мышей проводили из малой подкожной вены голени [7]. После этого 100 мкл цельной крови помещали в пластиковые пробирки со 100 мкл физ. р-ра. Образцы выдерживали 0,5-2 ч при комнатной температуре и центрифугировали при 5000 об/мин 15 мин. Супернатант отбирали в пластиковые пробирки.

Определение изменения количественных показателей клеток крови происходило путем подсчета лейкоцитарной

формулы. Использовали комбинированную окраску по Паппенгейму. Цитометрию на лазерном проточном цитофлуориметре EPIC XL 4colors («Becton Coulter», США) выполняли по методике производителя прибора с использованием антител с тройной меткой.

### Оценка миграции ММСК

Для оценки миграции вводимых клеток выделяли костный мозг из бедренных костей и печень мышей, которым были введены клетки, меченые «зеленым белком». Гистологический материал был заморожен на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для получения срезов использовали замораживающий микротом Micron HM 550 («Thermo Scientific», США). Срезы исследовали на флуоресцентном микроскопе.

### Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов осуществляли с использовани-

ем стандартного пакета программы Statistica 8. Применяли U-критерий Манна-Уитни (сопоставление двух групп по одному или нескольким количественным признакам, имеющим хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального), H-критерий Краскала – Уоллиса (сопоставление трех и более групп по одному или нескольким количественным признакам, имеющим хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального).

### Результаты исследований

Изменения на организменном уровне Одним из очевидных критериев, позволяющих оценить радиорезистентность организма, является выживаемость. Достоверных различий в количестве погибших от облучения животных между группами выявлено не было.

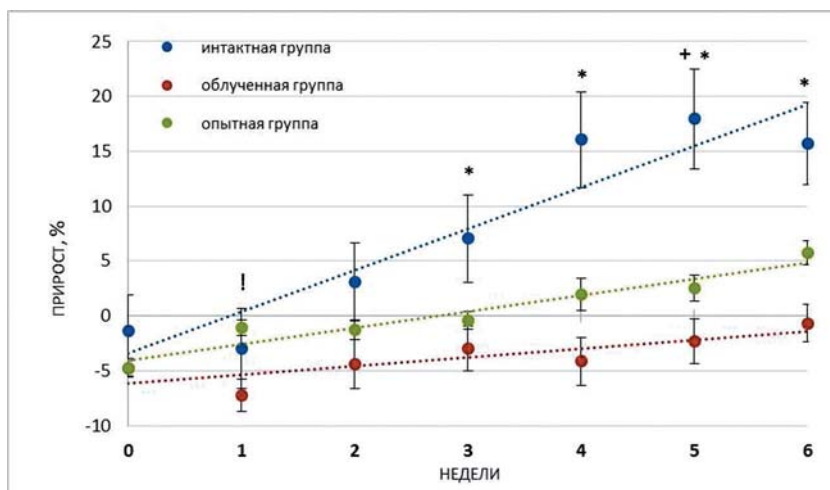


Рис. 1. Динамика массы тела животных. Пунктир – линии тренда (линейная зависимость).

Примечания:

\* – отличия показателей интактного и облученного контролей достоверны,  $P_H < 0,05$ ;

+ – отличия показателей интактного контроля и опытной группы достоверны,  $P_H < 0,05$ ;

! – отличия показателей облученного контроля и опытной группы достоверны,  $P_H < 0,05$ .

Анализ массы тела и двигательной активности также не выявили значительных различий. В течение эксперимента динамика изменений массы тела и уровень горизонтальной и вертикальной двигательной активности животных опытной группы имели промежуточное значение между сопоставимыми показателями интактной и облученной группы (рис. 1, 2).

### Особенности клеточных реакций

При подсчете формулы крови через 3 недели у облученных животных наблюдали возрастание количества нейтрофилов (палочкоядерных и сегментоядерных) и истощение запаса лимфоцитов (рис. 3).

Причем, количество Т-лимфоцитов у животных опытной группы имело средние значения между сопоставимыми

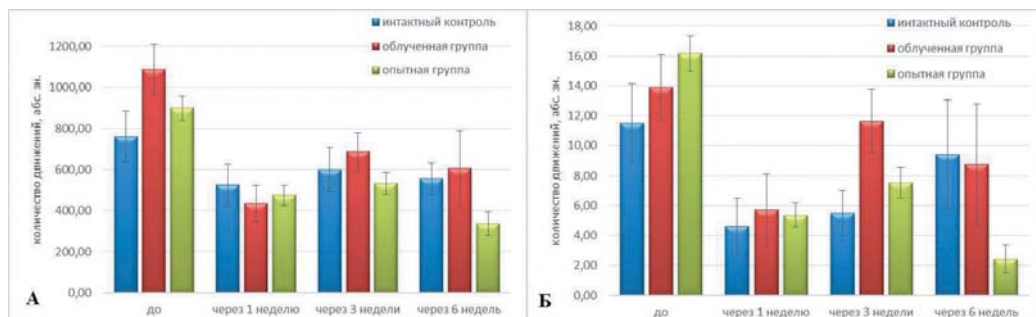


Рис. 2. Изменение горизонтальной (А) и вертикальной (Б) двигательной активности животных.

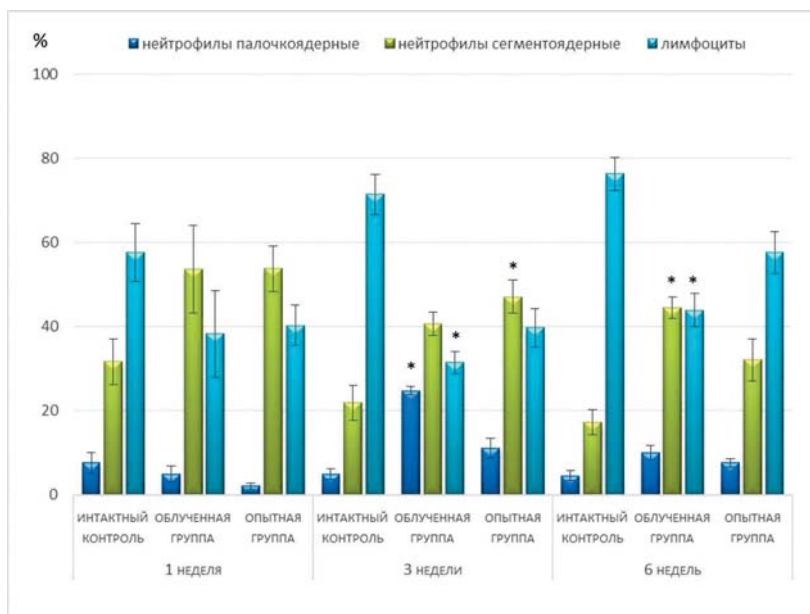


Рис. 3. Содержание лимфоцитов и нейтрофилов в крови мышей трех групп.  
Примечание: \* – сравнение с соответствующим временным контролем,  $P_H < 0,05$ .



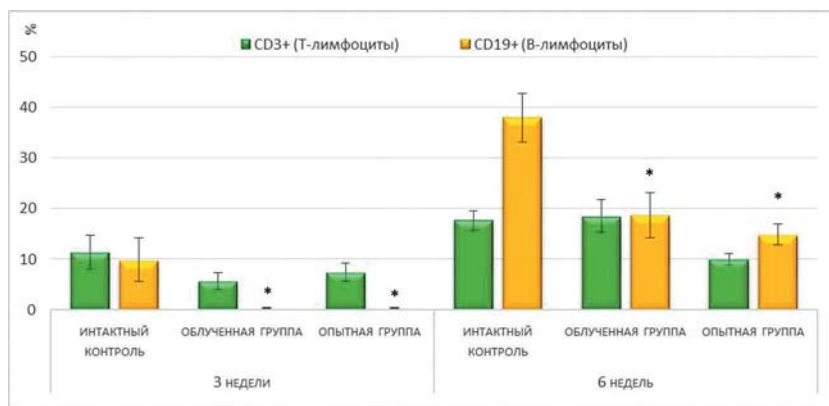


Рис. 4. Содержание Т- и В-лимфоцитов в крови мышей экспериментальных групп на 3-й и 6-й неделях эксперимента.  
 Примечание: \* –  $P_H < 0,05$  – сравнение с соответствующим временным контролем.

ми показателями контрольной группы и группы облученных мышей, а по В-лимфоцитам различий между опытной и облученной группами не наблюдалось (рис. 4).

По истечении шести недель количество нейтрофилов и лимфоцитов, рассчитанное по формуле крови, в опытной группе – среднее между сопоставимым показателем в интактном контроле и

группе облученных мышей (рис. 3). Количество лейкоцитов, а также Т- и В-лимфоцитов в опытной группе ниже, чем в двух других, несмотря на то, что к шестой неделе у всех облученных животных наблюдали выход новых лимфоцитов в кровь (рис. 4).

Через 3 мес. содержание лимфоцитов возвращается к нормальным значениям (рис. 5).

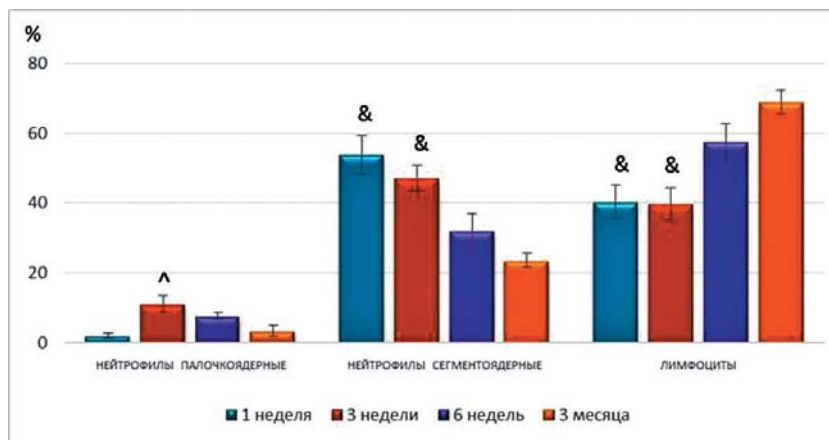


Рис. 5. Изменение содержания лимфоцитов и нейтрофилов в крови мышей опытной группы в течение эксперимента.  
 Примечания: & –  $P_H < 0,05$  – сравнение с показателями, полученными в 3 мес.;  
 ^ –  $P_H < 0,05$  – сравнение с показателями, полученными в 1 неделю.

### Метаболические сдвиги в организме облученных животных

Для оценки изменений в сывороточном гомеостазе крови после облучения использовали метод лазерной корреляционной спектроскопии.

Через 3 недели после облучения в опытной группе наблюдалась тенденция к нарастанию мелких частиц в субфракционном составе сыворотки крови, а через 6 недель было замечено увеличение вклада в светорассеяние крупных частиц (рис. 6).

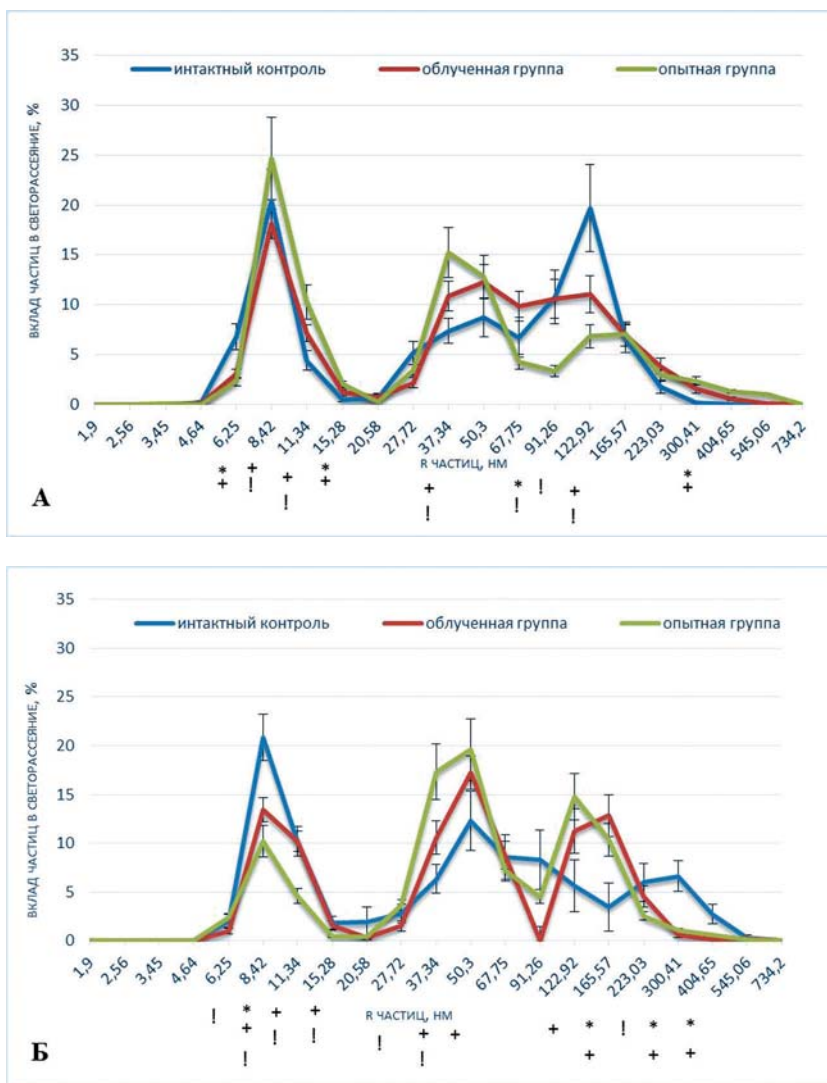


Рис. 6. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови мышей экспериментальных групп на 3-й (А) и 6-й (Б) неделях.

Примечания:

\* – отличия показателей интактного контроля и облученной группы достоверны,  $P_U < 0,05$ ;

+ – отличия показателей интактного контроля и опытной группы достоверны,  $P_U < 0,05$ ;

! – отличия показателей облученной и опытной группы достоверны,  $P_U < 0,05$ .

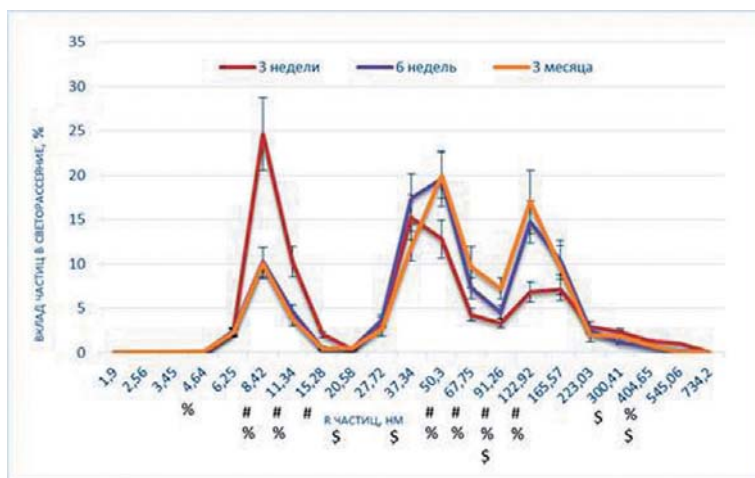


Рис. 7. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови опытной группы мышей в течение эксперимента.

Примечания:

# – отличия показателей 3-й недели и 6-й недели достоверны,  $P_U < 0,05$ ;

% – отличия показателей 3-й недели и 3-го мес. достоверны,  $P_U < 0,05$ ;

\$ – отличия показателей 6-й недели и 3-го мес. достоверны,  $P_U < 0,05$ .

По истечении трех мес. эксперимента распределение субклеточных частиц в сыворотке крови существенно не изменилось (рис. 7).

### Гистологическое исследование

По истечении трех недель гистологические исследования показали, что в опытной группе частота встречаемости тяжелых степеней повреждения селезенки, печени и поджелудочной железы существенно ниже, чем в облученной группе (рис. 8).

Через 6 недель в опытной группе существенно ухудшилась гистологическая картина селезенки, преобладает 4-я степень повреждения (рис. 8А).

Через 3 мес. частота встречаемости тяжелого повреждения селезенки снижается (рис. 9А), а поджелудочной железы – увеличивается, притом, что морфологическая картина этого органа в опытной группе лучше, чем в облученном контроле (рис. 9Б).

### Оценка миграции ММСК

Шести мышам были инъецированы исследуемые клетки, помеченные «зеленым белком», для оценки миграции ММСК. Через 3 недели в тканях печени меченые клетки обнаружены не были. Через 6 недель на криосрезах костного мозга мышей были выявлены флуоресцирующие круглые клетки, а через 3 мес. меченые клетки присутствовали и в тканях печени, и в тканях костного мозга бедренных костей, т.е. в местах наибольшего повреждения клеток в организме.

### Обсуждение результатов

Целью данной работы было исследовать и оценить возможность и эффективность применения ММСК костного мозга в качестве терапии последствий действия ионизирующего излучения на лабораторных животных. Предварительные результаты данного исследования были опубликованы ранее [22].

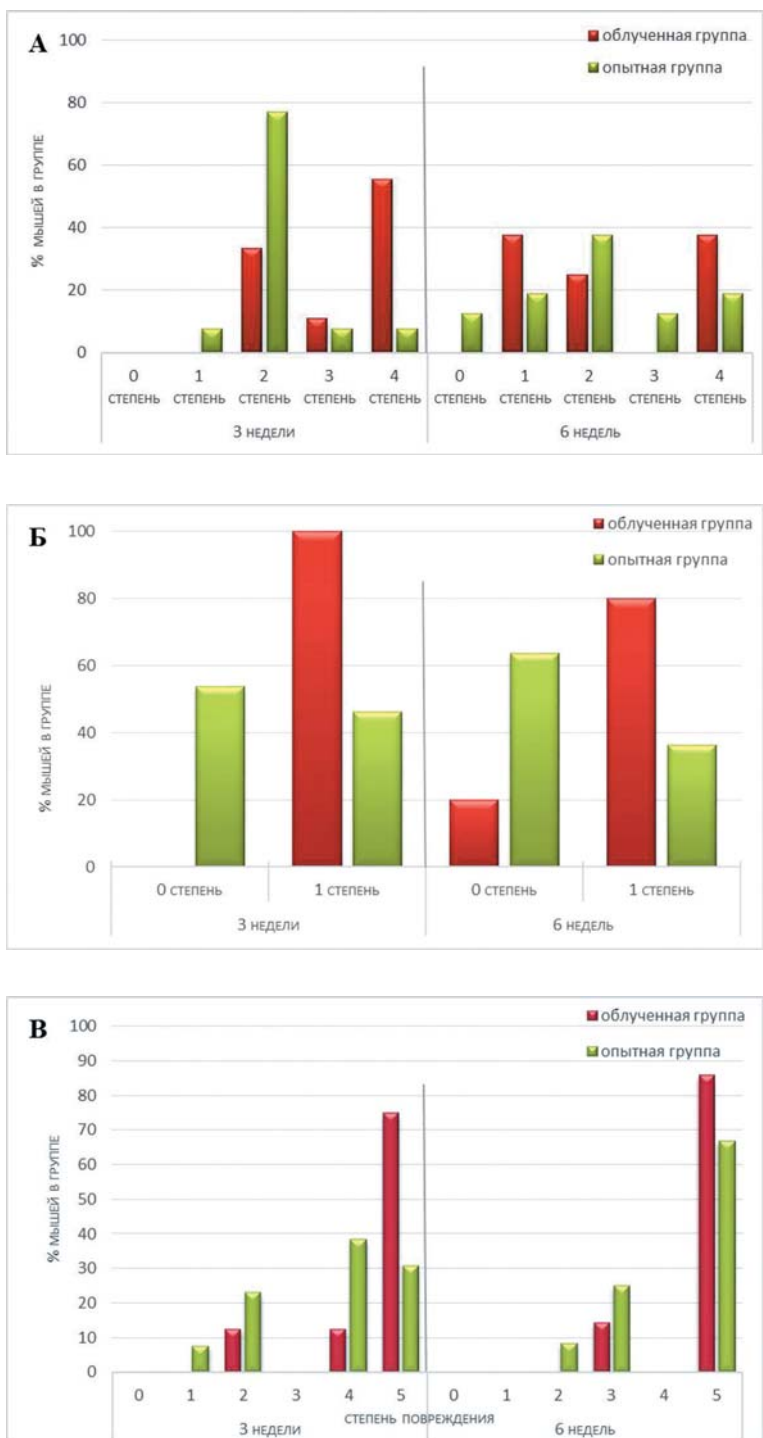


Рис. 8. Распределение степеней повреждения селезенки (А), поджелудочной железы (Б) и печени (В) в облученной и опытной группах через 3 и 6 недель после облучения.

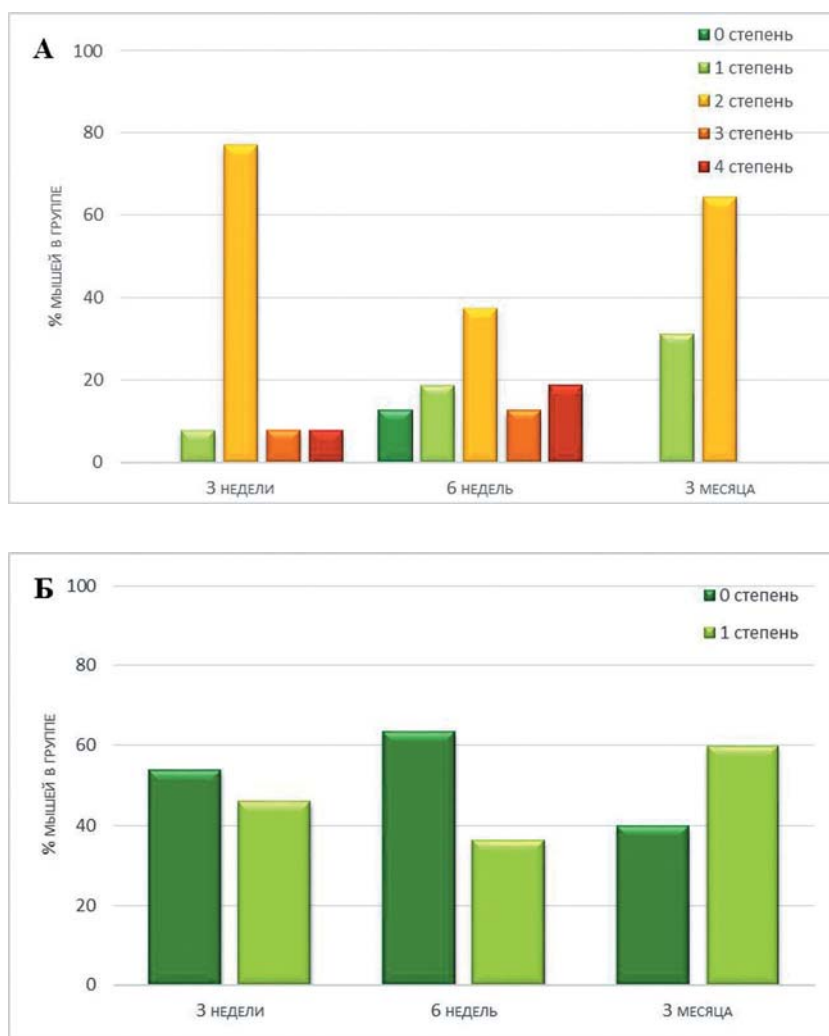


Рис. 9. Динамика проявлений различных степеней повреждения селезенки (А) и поджелудочной железы (Б) в опытной группе в течение эксперимента.

Экспериментальные данные, полученные на животных, показывают, что введение стволовых клеток костного мозга достаточно эффективно в терапии последствий острого ионизирующего облучения. Даже однократная внутривенная инфузия может улучшить показатели выживаемости после получения летальной дозы облучения в сравнении с контрольной группой [24]. У животных значительно

уменьшается потеря массы тела, наблюдается снижение потребления воды, ускорение заживления ран [15]. На клеточном уровне наблюдается подавление апоптоза, повышение интенсивности клеточного цикла, ускорение процессов митоза [14]. ММСК отвечают за поддержку и мониторинг кроветворения, регенерацию различных тканей взрослого организма и за модуляцию иммунного ответа [21].

Действие высоких доз радиации вызывает повреждение кишечника и печени в первые недели после облучения, что влияет на усвоение пищи и приводит к изменению массы животных. Из литературы известно, что острое облучение в высоких дозах приводит к стойкому снижению массы тела. Однако в наших предшествующих экспериментах обнаружены межлинейные различия в изменении массы тела после облучения, что, возможно, связано с развитием метаболического синдрома [18]. В течение эксперимента темп прироста массы животных опытной группы имел промежуточное значение между показателями контрольной и облученной группы (рис. 1). Такую же ситуацию наблюдали и при исследовании двигательной активности животных (рис. 2). Уровень прироста массы тела, средний по группе, может служить комплексным показателем скорости обменных процессов при работе с лабораторными животными, но, к сожалению, не позволяет адекватно определить механизмы происходящих сдвигов. Для решения этой задачи необходимо проводить дополнительные исследования для оценки изменений на разных структурно-функциональных уровнях организма.

Изменения в картине крови являются основными признаками при воздействии гамма-излучения в значительных дозах. Когда кроветворная система подвергается действию ионизирующего излучения, в первую очередь нарушается ее гомеостаз. Лимфоидная ткань обедняется клеточными элементами раньше, чем ткань костного мозга. Причем, лимфопения – снижение общего числа лимфоцитов – развивается сразу после острого воздействия даже низких доз

излучения, в то время как зрелые гранулоциты, эритроциты и тромбоциты могут переносить более высокие дозы [21].

По данным литературы, формула крови мышей в норме имеет следующий вид: лимфоциты 63-75%, моноциты 0,7-2,6%, нейтрофилы 6,7-37,2%, эозинофилы 0,9-3,8% [2]. Как показано на рис. 3, в интактной группе формула крови соответствовала норме, а в опытной группе отмечали преобладание сегментоядерных нейтрофилов, характерное, например, для гнойных абсцессов. Истощение запаса зрелых Т- и В-лимфоцитов у облученных животных через 3 недели (рис. 3) являлось следствием того, что предшественники этих клеток в костном мозге были разрушены действием радиации. По данным литературы, одним из свойств мезенхимных стволовых клеток является способность задерживать созревание Т-лимфоцитов [9, 17]. Этим фактом может быть объяснено более низкое количество лейкоцитов, а также Т- и В-лимфоцитов в опытной группе по сравнению с интактной и облученной группами на шестой неделе (рис. 4).

Истощение пула гемопоэтических стволовых клеток, вызванное действием облучения, увеличивает нагрузку на дифференцированные клетки, усиливаются процессы репарации и апоптоза [5]. Изменения в обменных процессах клеток и тканей вносят изменения в сывороточный гомеостаз. Биохимические сдвиги в крови облученных животных отчетливо выражены лишь в разгар лучевого поражения, оставаясь на начальных этапах поражения малозаметными. Однако метод ЛКС позволяет увидеть изменения даже на ранних стадиях повреждающего процесса.

После получения результатов ЛКС предположили, что увеличение вклада в светорассеяние мелких частиц на третьей неделе связано с деструкцией ткани (рис. 6А). Сам процесс облучения занимал 2,5 ч, за это время в организме животных усилились процессы образования активных форм кислорода и, как следствие, процессы деструкции ткани, которые реализовались в увеличении вклада мелких частиц. Доза облучения, полученная животными, была достаточна для развития у них лучевой болезни. Разрушение клеток и синтез антител послужили причиной увеличения процентного вклада в светорассеяние частиц размером свыше 165 нм. Разная чувствительность мышей к фактору воздействия проявилась в различной степени увеличения вклада крупных частиц. В группах облученных мышей происходят сходные процессы, однако введение клеток, видимо, стирает индивидуальные различия.

При облучении ткани печени, селезенки и поджелудочной железы подвергаются серьезному разрушению. Введение клеток улучшает состояние селезенки, печени, поджелудочной железы по сравнению с облученной группой (рис. 8). Процессы деструкции менее выражены.

Однако, если рассматривать динамику повреждений тканей поджелудочной железы, частота встречаемости 2-й степени повреждения становится выше через 3 мес. (рис. 9Б) при том, что морфологическая картина этого органа в опытной группе лучше, чем в облученном контроле. Ухудшение гистологических показателей селезенки к шестой неделе (рис. 9А) может быть обуслов-

лено реакцией на выход лимфоцитов, продукция которых была подавлена облучением.

По данным многочисленных исследований, стволовые клетки, вводимые в кровотоки, способны мигрировать и локализоваться в зоне повреждения без участия экзогенных индуцирующих «направляющих» факторов [11]. Такой феномен получил название «хуминг-эффект». Он нашел подтверждение в исследованиях *in vivo*, где было выявлено, что введенные внутривенно ММСК, хоть и локализовались большей частью в легких, в дальнейшем обнаруживались в жировой и хрящевой тканях, сердечной [13] и скелетной мышце, ткани печени, костном мозге, эндотелии, селезенке и тимусе животных [1]. Однако существует ряд работ, в которых ставится под сомнение способность ММСК достигать критических органов при внутривенном введении. При этом авторы не отрицают наличия терапевтического эффекта от такого воздействия. Так, в работе К. Ланге показано, что большая часть внутривенно вводимых клеток депонировалась в тканях легкого, и при выраженном улучшении состояния целевых органов исследования (костного мозга, периферической крови) вводимых клеток в них обнаружено не было [4]. В нашей работе вводимая нескольким опытным животным суспензия клеток была снабжена меткой «зеленого белка» именно для оценки миграционной способности ММСК. Обнаружение меченых клеток в костном мозге и печени доказывало, что введенные ММСК достигли критических органов, и наблюдаемые эффекты обусловлены – по крайней мере, отчасти – их воздействием.

## Выводы

1. Обнаружение меченых клеток в костном мозге и печени позволяет утверждать, что наблюдаемые эффекты обусловлены экспериментальным воздействием.

2. Общая тенденция, заключающаяся в промежуточном положении параметров опытной группы, свидетельствует о частичном терапевтическом эффекте введенных клеток.

3. Отсутствие погибших животных на заключительной стадии эксперимента (от шести недель до трех мес.), нормализация и стабилизация их физиологических параметров позволяет судить о длительном характере наблюдаемых эффектов.

4. Полученные результаты согласуются с данными других авторов о перспективах использования стволовых клеток после облучения в высоких дозах [9, 15, 23].

## Список литературы

1. **Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Чекнева И.С.** Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стволовых клеток, результаты последних клинических исследований // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 15. – № 5. – С. 4-18.
2. **Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф.** Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука. – 1983. – 189 с.
3. **Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Яковенко Е.Н., Ковалева О.И., Медведева Ю.С., Вялкина М.В.** Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии в лабораторной медицине // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61(9). – С. 533-534. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-9.

4. **Ланге К.** Мезенхимальные стромальные клетки защищают от острой лучевой болезни: понимание возможных механизмов // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2015. – № 1. – С. 58-70.
5. **Медведева Ю.С., Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Озерова М.А., Бобе А.С., Сдобноев Ц.Ц., Антипов А.А., Карганов М.Ю.** Особенности организменного ответа мышей разных линий на острое гамма-облучение // Биомедицина. – 2013. – № 2. – С. 67-79.
6. **Меркулов Г.А.** Курс патологистологической техники. – Л.: Медицина. – 1969. – 424 с.
7. **Степанова О.И.** Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 137-139.
8. **Alchinova I., Arkhipova E., Medvedeva Yu., Cherepov A., Antipov A., Lysenko N., Noskin L., Karganov M.** The complex of tests for the quantitative evaluation of the effects of radiation on laboratory animals // Am. J. of Life Sciences. – 2015. – Т. 3. – No. 1-2. – Pp. 5-12. doi:10.11648/j.ajls.s.20150303.12.
9. **Andrade A.V.G., Riewaldt J., Wehner R., Schmitz M., Odendahl M., Bornhäuser M., Tonn T.** Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells // J. of cellular and molecular medicine. – 2014. – Т. 18. – No. 6. – Pp. 1184-1193.
10. **Chang P., Qu Y., Liu Y., Cui S., Zhu D., Wang H., Jin X.** Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury // Cell death & disease. – 2013. – Т. 4. – No. 6. – P. e685. doi:10.1038/cddis.2013.178.
11. **Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young R.G., Frick J., ... & Dudoignon N.** Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome // The journal of gene medicine. – 2003. – Т. 5. – No. 12. – Pp. 1028-1038.



12. **Gaberman E., Pinzur L., Levdansky L., Tsirlin M., Netzer N., Aberman Z., Gorodetsky R.** Mitigation of lethal radiation syndrome in mice by intramuscular injection of 3D cultured adherent human placental stromal cells // *PloS one*. – 2013. – T. 8. – No. 6. – P. e66549.
13. **Gao S., Zhao Z., Wu R., Zeng Y., Zhang Z., Miao J., Yuan Z.** Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model // *Radiation and Environmental Biophysics*. – 2016. – Pp. 1-15.
14. **Hu K.X., Sun Q.Y., Guo M., Ai H.S.** The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury // *The British journal of radiology*. – 2014.
15. **Kiang J.G., Gorbunov N.V.** Bone marrow mesenchymal stem cells increase survival after ionizing irradiation combined with wound trauma: characterization and therapy // *J. of Cell Science & Therapy*. – 2014. – T. 5. – No. 6. – P. 1.
16. **Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H., Eggert K., Gehling U.M., Rudolph C., ... & Zander A.R.** Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation // *PloS one*. – 2011. – T. 6. – No. 1. – P. e14486.
17. **Lim J.Y., Park M.J., Im K.I., Kim N., Jeon E.J., Kim E.J., ... & Cho S.G.** Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/ treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model // *Cell transplantation*. – 2014. – T. 23. – No. 6. – Pp. 703-714.
18. **Medvedeva Yu., Arkhipova E., Alchinova I.** The effects of gamma-irradiation in sub-lethal doses in mice with different radiosensitivity // *Am. J. of Life Sciences*. – 2015. – T. 3. – No. 1-2. – Pp. 13-17. doi: 10.11648/j.ajls.s.20150303.13.
19. **Mortazavi S.M.J., Shekoohi-Shooli F., Aghamir S.M.R., Mehrabani D., Dehghanian A., Zare S., Mosleh-Shirazi M.A.** The healing effect of bone marrow-derived stem cells in acute radiation syndrome // *Pakistan J. of Medical Sciences*. – 2016. – T. 32. – No. 3. – P. 646.
20. **Shukai Q., Hanyun R., Yongjin S., Wei L.** Allogeneic compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation increases survival of mice exposed to lethal total body irradiation: a potential immunological mechanism // *Chin Med J. (En)*. – 2014. – T. 127. – Pp. 475-482.
21. **Sugrue T., Brown J.A., Lowndes N.F., Ceredig R.** Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines // *Stem cells*. – 2013. – T. 31. – No. 1. – Pp. 137-145.
22. **Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Y.S., Saburina I.N., Karganov M.Y.** Long-term effects of stem cells on total-body irradiated mice // *J. of Physics: Conference series*. – IOP Publishing. – 2017. – T. 784. – No. 1. – P. 012015.
23. **Williams J.P., McBride W.H.** After the bomb drops: a new look at radiation-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS) // *Int. J. of Radiation biology*. – 2011. – T. 87. – No. 8. – Pp. 851-868.
24. **Yang X., Balakrishnan I., Torok-Storb B., Pillai M.M.** Marrow stromal cell infusion rescues hematopoiesis in lethally irradiated mice despite rapid clearance after infusion // *Advances in hematology*. – 2012.

## References

1. **Belenkov Ju.N., Privalova E.V., Chekneva I.S.** Kletochnaja terapija v lechenii hronicheskoj serdechnoj nedostatochnosti: vidy primenjaemyh stvolovyh kletok, rezul'taty poslednih klinicheskikh issledovanij [Cell therapy in the treatment of chronic heart failure: types of the applied stem cells, the results of recent clinical studies]. *Kardiologija i serdechno-sosudistaja hirurgija* [Cardiology and cardiovascular surgery]. 2008. T. 15. No. 5. Pp. 4-18. (In Russian).
2. **Blandova Z.K., Dushkin V.A., Malashenko A.M., Shmidt E.F.** Linii laboratornyh zhivotnyh dlja mediko-

- biologicheskikh issledovaniy [Lines of laboratory animals for medicobiological researches]. Moscow: Nauka. 1983. 189 p. (In Russian).
3. **Karganov M.Ju., Alchinova I.B., Jakovenko E.N., Kovaleva O.I., Medvedeva Ju.S., Vjalkina M.V.** Primenenie metoda lazernoj korreljacionnoj spektroskopii v laboratornoj medicine [Application of the method of laser correlative spectroscopy in laboratory medicine]. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics]. 2016. T. 61(9). Pp. 533-534. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-9. (In Russian).
  4. **Lange K.** Mezenhimal'nye stromal'nye kletki zashhishhajut ot ostroj luchevoj bolezni: ponimanie vozmozhnyh mehanizmov [Mesenchymal stromal cells protect against acute radiation sickness: understanding of possible mechanisms]. *Medikobiologicheskie i social'no-psihologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychajnyh situacijah* [Medicobiological and social and psychological security problems in emergency situations]. 2015. No. 1. Pp. 58-70. (In Russian).
  5. **Medvedeva Ju.S., Arhipova E.N., Alchinova I.B., Ozerova M.A., Bobe A.S., Sodboev C.C., Antipov A.A., Karganov M Ju.** Osobennosti organizmennogo otveta myshej raznyh linij na ostroe gamma-obluchenie [Features of the organismal response of mice of different lines to acute gamma irradiation]. *Biomedicine*. 2013. No. 2. Pp. 67-79. (In Russian).
  6. **Merkulov G.A.** Kurs patologistologicheskoi tehniki [Course of pathological histology technique]. Leningrad: Medicina. 1969. 424 p. (In Russian).
  7. **Stepanova O.I.** Metod vzjatija krovi iz maloj podkozhnoj veny goleni u myshej [Method of taking blood from a small saphenous vein of the lower leg in mice]. *Biomedicine*. 2006. No. 2. Pp. 137-139. (In Russian).
  8. **Alchinova I., Arkhipova E., Medvedeva Yu., Cherepov A., Antipov A., Lysenko N., Noskin L., Karganov M.** The complex of tests for the quantitative evaluation of the effects of radiation on laboratory animals. *Am. J. of Life Sciences*. 2015. T. 3. No. 1-2. Pp. 5-12. doi:10.11648/j.ajls.s.20150303.12.
  9. **Andrade A.V.G., Riewaldt J., Wehner R., Schmitz M., Odendahl M., Bornhäuser M., Tonn T.** Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J. of cellular and molecular medicine*. 2014. T. 18. No. 6. Pp. 1184-1193.
  10. **Chang P., Qu Y., Liu Y., Cui S., Zhu D., Wang H., Jin X.** Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury. *Cell death & disease*. 2013. T. 4. No. 6. P. e685. doi:10.1038/cddis.2013.178.
  11. **Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young R.G., Frick J., ... & Dudoignon N.** Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *The journal of gene medicine*. 2003. T. 5. No. 12. Pp. 1028-1038.
  12. **Gaberman E., Pinzur L., Levdansky L., Tsirlin M., Netzer N., Aberman Z., Gorodetsky R.** Mitigation of lethal radiation syndrome in mice by intramuscular injection of 3D cultured adherent human placental stromal cells. *PloS one*. 2013. T. 8. No. 6. P. e66549.
  13. **Gao S., Zhao Z., Wu R., Zeng Y., Zhang Z., Miao J., Yuan Z.** Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2016. Pp. 1-15.
  14. **Hu K.X., Sun Q.Y., Guo M., Ai H.S.** The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury. *The British journal of radiology*. 2014.
  15. **Kiang J.G., Gorbunov N.V.** Bone marrow mesenchymal stem cells increase survival after ionizing irradiation combined with wound trauma: characterization and therapy. *J. of Cell Science & Therapy*. 2014. T. 5. No. 6. P. 1.
  16. **Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H., Eggert K., Ge-**

- hling U. M., Rudolph C., ... & Zander A.R.* Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS one*. 2011. T. 6. No. 1. P. e14486.
17. *Lim J.Y., Park M.J., Im K.I., Kim N., Jeon E.J., Kim E.J., ... & Cho S.G.* Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model. *Cell transplantation*. 2014. T. 23. No. 6. Pp. 703-714.
18. *Medvedeva Yu., Arkhipova E., Alchinova I.* The effects of gamma-irradiation in sub-lethal doses in mice with different radiosensitivity. *Am. J. of Life Sciences*. 2015. T. 3. No. 1-2. Pp. 13-17. doi: 10.11648/j.ajls.s.20150303.13.
19. *Mortazavi S.M.J., Shekoohi-Shooli F., Aghamir S.M.R., Mehrabani D., Dehghanian A., Zare S., Mosleh-Shirazi M.A.* The healing effect of bone marrow-derived stem cells in acute radiation syndrome. *Pakistan J. of Medical Sciences*. 2016. T. 32. No. 3. P. 646.
20. *Shukai Q., Hanyun R., Yongjin S., Wei L.* Allogeneic compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation increases survival of mice exposed to lethal total body irradiation: a potential immunological mechanism. *Chin Med J. (En)*. 2014. T. 127. Pp. 475-482.
21. *Sugrue T., Brown J.A., Lowndes N.F., Ceredig R.* Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines. *Stem cells*. 2013. T. 31. No. 1. Pp. 137-145.
22. *Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Y.S., Saburina I.N., Karganov M.Y.* Long-term effects of stem cells on total-body irradiated mice. *J. of Physics: Conference series*. IOP Publishing. 2017. T. 784. No. 1. P. 012015.
23. *Williams J.P., McBride W.H.* After the bomb drops: a new look at radiation-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Int. J. of Radiation biology*. 2011. T. 87. No. 8. Pp. 851-868.
24. *Yang X., Balakrishnan I., Torok-Storb B., Pillai M.M.* Marrow stromal cell infusion rescues hematopoiesis in lethally irradiated mice despite rapid clearance after infusion. *Advances in hematology*. 2012.

## Long-term effects of stem cells on irradiated mice

M.V. Vyalkina, I.B. Alchinova, E.N. Yakovenko, Yu.S. Medvedeva,  
I.N. Saburina, M.Yu. Karganov

C57Bl/6Y mice were exposed to gamma-radiation in a sublethal dose of 7.5 Gy. In 3 hours injection  $10^6$  mouse of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells intravenously to experimental group was done. Methods used: body weight measurement, «open field» behavior, subfraction composition of blood serum (laser correlation spectroscopy), histological examination of the spleen, liver, and pancreas, count of T- and B- cells (cytometry), white blood formula. After 1.5 and 3 months the general trend towards intermediate position of the parameters observed in the experimental between those in intact and irradiated controls attests to partial therapeutic effect of the injected cells.

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells, marrow, gamma-radiation, laser correlation spectroscopy, regenerative medicine.



## К фармакодинамике производных флуорена – тилорона и ингината – на основе ингибирования N-ацетилтрансфераз и продукции цитокинов

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов

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

Контактная информация: Дуля Максим Сергеевич, [mdulya@gmail.com](mailto:mdulya@gmail.com)

Получены экспериментальные данные о биологическом действии препаратов – производных флуорена – тилорона и ингината. Препараты выступают как эффективные ингибиторы N-ацетилтрансферазы (NAT) и оказывают иммуномодулирующее действие по продукции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ . Данные наблюдения могут быть использованы для поиска производных флуорена как перспективных средств в моделировании противовирусных молекул-кандидатов и иммуностимуляторов.

На основе полученных данных *in vitro* эксперимента по ферментативной активности установлено эффективное ингибирующее действие производных флуорена (тилорона и ингината) по ферменту N-ацетилтрансферазы NAT2 человека.

Для выбранных ингибиторов изучена концентрационная зависимость ферментативной активности и определено значение концентрации полумаксимального ингибирования  $IC_{50}$ .

Сущность действия производных флуорена заключается в ингибировании процессов ацетилирования через ферменты N-ацетилтрансфераз (NAT1, NAT2 и др.), а также посредством иммуномодулирующего воздействия на цитокиновый иммунный статус мышей.

**Ключевые слова:** N-ацетилтрансфераза, флуорен, тилорон, ингинат, ацетилирование, гуманизированная линия мышей NAT2hom, ингибирование, цитокины, интерфероны, фактор некроза опухолей.

### Введение

Большинство лекарственных средств метаболизируются с участием ферментов I и II фазы биотрансформации и обладают как индуцирующими, так и ингибирующими свойствами [5]. Многие индукторы и ингибиторы II фазы биотрансформации проявляют канцерогенную активность, если их применять в высоких дозах и достаточно долго.

Ранее нами установлена ключевая роль ацетилирования в метаболизме ци-

тостатиков ряда цисплатина и производных флуорена [2].

Ингибирующее действие на ферментативные клеточные системы служит одним из основных выраженных проявлений воздействия лиганда на мишень. Так, например, среди широко применяемых в настоящее время средств с прямым противовирусным действием ингибиторами нейраминидазы являются занамивир и осельтамивир, а ингибиторами M2 белка выступает римантадин.

Помимо применения препаратов прямого противовирусного действия, большие перспективы в профилактике респираторных и других вирусных инфекций имеет использование индукторов интерферона (ИФН). Индукторы стимулируют выработку собственных ИФН, не обладающих антигенностью. При этом их синтез находится под контролем интерлейкинов и белков-репрессоров и не достигает уровня, способного оказать повреждающее действие на организм.

Важно, что при применении индукторов ИФН не наблюдается побочных эффектов, характерных для рекомбинантных ИФН. Способностью индуцировать синтез ИФН обладают разные по химической природе вещества, причем каждый индуктор стимулирует синтез ИФН в определенных клетках, имеющих соответствующие рецепторы. ИФН – это цитокины, которые играют важную роль в обеспечении естественной защиты организма от чужеродных антигенов, в т.ч. от вирусных инфекций. I тип – ИФН- $\alpha$  и - $\beta$  – характеризуются выраженным противовирусным действием, обеспечивают противовирусную защиту неинфицированных клеток, сохраняя их устойчивость к инфицирующему агенту, препятствует размножению вирусов в инфицированных клетках [12].

ИФН- $\alpha$  продуцируется всеми ядерными клетками, лейкоцитами и лимфоцитами периферической крови (лейкоцитарный и лимфобластоидный ИФН соответственно). ИФН- $\beta$  продуцируется преимущественно фибробластами (фибробластный). Индукторами образования ИФН I типа являются вирусы, природные и синтетические нуклеиновые кислоты, низко- и высокомолеку-

лярные соединения (полифенолы и др.). Ко II типу относится ИФН- $\gamma$ , обладающий антипролиферативной, более выраженной по сравнению с ИФН I типа, иммуномодулирующей активностью, вовлекая клетки иммунной системы (естественные киллеры – НК, макрофаги, гранулоциты) в регуляцию иммунного гомеостаза организма в норме и при различных патологических состояниях. ИФН- $\gamma$  в основном продуцируется Т-лимфоцитами, его синтез может быть индуцирован инфекционными агентами и митогенами.

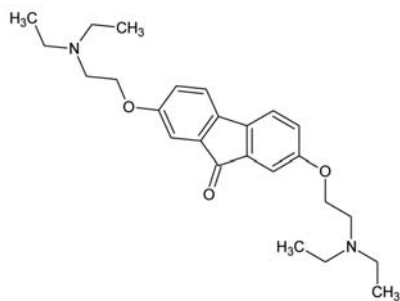
Тилорон – синтетическое низкомолекулярное соединение ароматического ряда, обладающее противовирусными свойствами и способностью индуцировать интерферон при пероральном введении.

Химическое название тилорона – 2,7-бис-[2-(диэтиламино)этокси]флуорен-9-он. Химическая формула тилорона –  $C_{25}H_{34}N_2O_3$ , химическая структура представлена на рис. 1.

Химическое название ингната – N-(ацетилокси)-N-9H-флуорен-2-илацетамид. Химическая формула ингната –  $C_{17}H_{15}NO_3$ , химическая структура представлена на рис. 2.

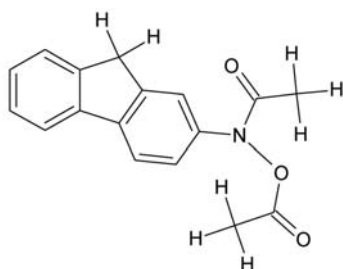
Тилорон обладает иммуностимулирующим эффектом. Он стимулирует стволовые клетки костного мозга, усиливает антителообразование, уменьшает степень иммунодепрессии, вызванной введением канцерогена, осуществляет коррекцию соотношения Т-супрессоров и Т-хелперов, повышает активность ЕК-клеток [1].

К действию тилорона чувствительны гепатно-, герпес-, микровирусы. Тилорон применяется в комплексной терапии герпеса, инфекционно-аллерги-



Молекулярная формула =  $C_{25}H_{34}N_2O_3$   
 Мол. вес = 410,54906  
 Состав = С (73,14%) Н (8,35%) N (6,82%)  
 О (11,69%)  
 Коэф. рефракции =  $121,05 \pm 0,3 \text{ см}^3$   
 Молярный объём =  $372,4 \pm 3,0 \text{ см}^3$   
 Плотность =  $1,102 \pm 0,06 \text{ г/см}^3$   
 Поляризуемость =  $47,98 \pm 0,5 \times 10^{-24} \text{ см}^3$   
 Моноизотопная масса = 410,25694 Да  
 Номинальная масса = 410 Да  
 Средняя масса = 410,5491 Да

Рис. 1. Структурная формула и физико-химические свойства тилорона (2,7-бис-[2-(диэтиламино)этокси]флуорен-9-он).



Молекулярная формула =  $C_{17}H_{15}NO_3$   
 Мол. вес = 281,3059  
 Состав = С (72,58%) Н (5,37%) N (4,98%)  
 О (17,06%)  
 Коэф. рефракции =  $79,17 \pm 0,3 \text{ см}^3$   
 Молярный объём =  $219,9 \pm 3,0 \text{ см}^3$   
 Плотность =  $1,279 \pm 0,06 \text{ г/см}^3$   
 Поляризуемость =  $31,38 \pm 0,5 \times 10^{-24} \text{ см}^3$   
 Моноизотопная масса = 281,10519 Да  
 Номинальная масса = 281 Да  
 Средняя масса = 281,3059 Да

Рис. 2. Структурная формула и физико-химические свойства ингината (N-(ацетилокси)-N-9H-флуорен-2-илацетамид).

ческих и вирусных энцефаломиелитов (рассеянный склероз, лейкоэнцефалиты, увезенцефалиты и др.), по лечебной схеме при гепатитах и энтеровирусных инфекциях, а также для профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций.

Тилорон считается первым синтетическим низкомолекулярным индуктором интерферона (ИФН), эффективным при пероральном применении. Ранее установлено, что однократная доза тилорона вызывает образование у животных ИФН 1-го типа, титры которого в определенных пределах пропорциональны концентрации тилорона [11].

При пероральном поступлении тилорона уже через 3 ч появляется ИФН в тонком кишечнике, а максимальные титры ИФН наблюдаются через 18-24 ч и достигают 5000 ЕД/мл [13]. При этом в сыворотке уровень ИФН составляет только 320-640 ЕД/мл. После внутривенного введения тилорона максимальные концентрации ИФН (~5000 ЕД/мл) обнаруживаются в структурах ЦНС. ИФН образуется также в лимфоидных органах – в частности, в селезенке и лимфоузлах. После однократного введения тилорона ИФН определяют в сыворотке крови в течение 48-72 ч, в связи с чем тилорон относят к индукторам

«позднего» ИФН [14], что и обуславливает его длительное терапевтическое последствие.

Тилорон также индуцирует синтез ИФН- $\gamma$  Т-лимфоцитами и НК-клетками. В культуре лимфоцитов периферической крови человека тилорон активирует синтез ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  в соотношении 3:1. Исследования, проведенные на группе здоровых добровольцев, показали, что уже через сутки после первого приема тилорона уровень ИФН в сыворотке крови возрастает более чем втрое.

Кроме способности индуцировать образование эндогенного интерферона и оказывать иммуномодулирующее действие, проведенные исследования обнаружили широкий спектр фармакологической активности тилорона.

Авторами ранних исследований [8] сообщается о противоопухолевой и противирусной активности данного соединения.

Тилорон оказывает стимулирующее действие на первичный и вторичный гуморальный ответ, повышая продукцию иммуноглобулинов разных классов (M, G, A), даже после однократного введения накануне или одновременно с иммунизацией [14, 8].

**Целью** исследования явилось определение ферментативной активности и ингибирующего действия производных флуорена – ингината и тилорона – по ферменту N-ацетилтрансферазы NAT2 человека на гомогенатах печени гуманизированных трансгенных мышей NAT2<sup>hom</sup> (впервые получены в НЦБМТ ФМБА России) *in vitro* [3, 4].

Для выбранных ингибиторов необходимо изучить концентрационные зависимости ферментативной активности и

определить значение концентрации полумаксимального ингибирования  $IC_{50}$ .

Задачей второго этапа исследования являлось профилирование цитокинового статуса тестируемой линии мышей C57Bl6/Y после введения изучаемых препаратов (тилорона и ингината) по продукции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  методом мультиплексного ИФА на магнитных частицах.

### Материалы и методы

Нами выбраны два производных флуорена, наиболее реакционноспособных с молекулярной мишенью – N-ацетилтрансферазой, – тилорон и ингинат.

Тилорон использовали в таблетированной форме (125 мг). Отмечая его невысокую водорастворимость, введение препарата животным выполняли в виде суспензии.

Ингинат представляет собой ацетилированное производное флуорена с улучшенными физико-химическими свойствами (растворимостью, чистотой).

Синтез и очистку ингината проводили в соответствии с ранее разработанной в НЦБМТ ФМБА России методологией.

Задачи *in vitro* исследования состояли в применении методики оценки фенотипа ацетилирующей способности (активности ферментов N-ацетилтрансфераз тестируемых животных) и оценке ингибирующего действия выбранных препаратов (ингината и тилорона) на ткани печени трансгенной линии лабораторных мышей NAT2<sup>hom</sup> (НЦБМТ ФМБА России).

Разработанная ранее методика [2] была применена нами для оценки остаточной ацетилирующей способности NAT в биомоделировании регуляции процессов ацетилирования в гомогена-

тах тканей лабораторных животных и определения ингибирующего действия тилорона и ингината в экспериментах *in vitro*.

Биологический материал тканей лабораторных животных (печень) подвергался пробоподготовке и выделению белковой лизосомальной фракции.

Основное лабораторное оборудование, применяемое при определении активности N-ацетилтрансферазы-2, позволяет выполнять все необходимые этапы: введения испытуемых молекул лабораторным животным, забора и подготовки биоматериалов (печени, плазмы крови) к исследованию, пробоподготовки гомогенатов образцов в буфере для гомогенизации, определения общего содержания белка в полученных гомогенатах печени.

Перечень основного оборудования и материалов:

1) спектрофотометр 96-луночный Multiscan GO («Thermo Scientific») или аналог с программным обеспечением для обработки, хранения и визуализации данных;

2) высокоскоростной гомогенизатор SilentCrusher («Heidolph») или аналогичный;

3) холодильник с охлаждением до  $-80^{\circ}\text{C}$ ;

4) одноразовые полипропиленовые конические центрифужные пробирки с плотнозакрывающимися крышками объемом 5 мл.

Исследование проводили в два этапа. В ходе первого этапа выполняли введение рассчитанного объема р-ров ингибиторов и деионизованной воды (в качестве контроля) тестируемым животным указанной линии. Количество животных в группе – 5-10 особей.

На втором этапе определяли уровни ферментативной ацетилирующей способности N-ацетилтрансферазы у интактных животных и ферментативную активность NAT в ответ на токсическое воздействие ингибиторами.

Доза ингибиторов в тесте на ингибирующее действие выбрана в диапазоне  $1/5 - 1/10$  от  $\text{LD}_{50}$  и составила концентрации для оценки остаточной ацетилирующей способности и общего ингибирующего действия 10-50 мг/кг.

В качестве контроля использовалась деионизованная вода.

Пробы гомогенатов тканей готовили свежими и сохраняли в условиях глубокой заморозки ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) до стадии пробоподготовки гомогената, не допуская процессов разложения биоматериала.

Исследуемый материал – ткани животных (печень) для оценки ферментативной активности цитозольной фракции, содержащей N-ацетилтрансферазу.

Определение проводили в соответствии с методикой спектрофотометрического кинетического метода (по Элману). После инкубации в течение 5 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  проводили серию считываний с интервалом 30 с на протяжении 60 мин. Результаты реакции учитывали, измеряя светопоглощение при 405 и 412 нм. Дальнейшую обработку данных выполняли в пакете Microsoft Office Excel.

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

Для определения удельной ферментативной активности величину активности, выраженную в нМ/мин, соотносили



с долей белка (мг) в каждом из изучаемых образцов (p-рах белковых гомогенатов).

Содержание белковой фракции в тестируемых образцах тканей определяли флуориметрически по свежей калибровке в соответствии с протоколом использования (Qubit 3.0, «Life Technology»).

Цитокиновый профиль определяли с помощью мультиплексного анализа на установке Bio-Plex Magpix («Bio-Rad», США). Данный метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, протекающую на магнитных микрочастицах, с их последующим проточным флуоресцентным анализом и одновременным определением содержания специфических регуляторных белков-цитокинов. Содержание цитокинов ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  определяли в плазме крови лабораторных животных.

Продукцию цитокинов оценивали после внутривентрикулярного введения препаратов в двух дозах – 10 и 50 мг/мышь для тилорона и ингината соответственно. Анализ проводили через 2 ч после введения препаратов.

Пользовались стандартной коммерчески доступной панелью на цитокины (Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay, #M60009RDPD). Плазму крови, стабилизированную ЭДТА, вносили в лунки планшета. Дальнейшие операции выполняли в соответствии с протоколом по инструкции производителя.

## **Результаты и их обсуждение**

### **Ингибирующее действие**

Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что под воздействием субстратов N-ариламингидрокси-производных (на примере N-гидрокси-4-аминобифенила, а также ряде других

структурно подобных N-арилгидрокси-мов) ферментативная система дезактивируется и функционирует в связанном с необратимыми субстратами состоянии, т.е. практически ингибирована.

Наряду с основным процессом детоксикации ксенобиотиков, некоторые из них в ходе этих реакций активируются, превращаясь в непосредственные канцерогены – высокореактивные производные, ковалентно связывающиеся с клеточными белками и нуклеиновыми кислотами [9, 10].

Электрофильные метаболиты образуются на первом этапе окисления проканцерогена микросомальными монооксигеназами, которые локализованы, главным образом, в эндоплазматическом ретикулуме и имеют в качестве терминального звена цитохром P-450.

Нужно отметить, что в канцерогенном действии одного и того же соединения могут принимать участие несколько механизмов.

Остаточный уровень активности ацетилирования гомогената печени различен и демонстрирует разную ингибирующую способность действия изучаемых молекул.

Данные кинетического эксперимента пересчитывали автоматически в активность A (нмоль/мин/мг) с учетом доли общего белка для каждой пробы (рис. 3).

Анализ и обработку данных выполняли в пакете Microsoft Office Excel 2010 с применением модуля факторного анализа.

Концентрация полумаксимального ингибирования IC50 выбрана нами как показатель эффективности лиганда при ингибирующем биохимическом или биологическом взаимодействии. IC50 является количественным индикатором,

который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 50%. Этот показатель используется нами в качестве индикатора активности вещества-кандидата в фармакологических исследованиях. IC50 является показателем концентрации лекарственного вещества, необходимого для 50% ингибирования тестовой реакции *in vitro*.

Показатель IC50 не является непосредственным индикатором аффинности, но является связанной с ней величиной.

В определениях ингибирующей способности тилорона установлено, что с ростом его концентрации в постановках на активность N-ацетилтрансферазы наблюдается равномерный спад удельной активности во всей области изучаемых концентраций (0,10-1,50 мМ).

Значение IC50, установленное для тилорона, специфично на NAT2 человека (из гомогената печени) составило 0,32 мМ.

Уровень IC50, установленный для ингината совместно с NAT2-селективным субстратом (сульфаметазин), составил 0,14 мМ (0,04 мг/лунку), что в 2,2 раза меньше, чем установленный уровень IC50 в индивидуальном определении ингибирующей способности тилорона.

#### Анализ уровня продукции цитокинов

Цитокины, хемокины и факторы роста представляют собой значимые регуляторные белки сигнальных систем клеток и выделяются многими типами клеток, включая те, которые относятся к иммунной системе. Белки сигнальной системы клетки взаимодействуют со специфическими рецепторами клеток-



Рис. 3. Сравнительный анализ ингибирования процесса ацетилирования для линии гуманизированных мышей NAT2<sub>hom</sub> («сверхбыстрого» типа ацетилирования) под воздействием ингибиторов – тилорона и ингината (50 мг/кг, гомогенат печени).

мишеней, устанавливая важные физиологические реакции – например, рост, иммунитет, воспаление и кроветворение.

Для определения продукции цитокинов и анализа их профиля получали калибровочную зависимость для каждого из них. Диапазон калибровки для ИФН- $\gamma$  составил 1,84-30164 пг/мл и 5,8-59626 пг/мл – для ФНО- $\alpha$  (рис. 4).

Анализ (прочтение лунок) проводили в двух независимых постановках и при двух повторах считывания каждой экспериментальной точки.

В ходе анализов получены данные количественного содержания ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  в плазме крови мышей линии C57Bl6/Y после введения тилорона и ингината в одинаковой дозе 50 мг/кг (рис. 5, 6).

Существуют три основных направления действия ФНО: цитотоксическое, направленное на клетки опухоли либо клетки, пораженные вирусами; иммуномодулирующее и противовоспалительное, вызываемое активацией макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и эндотелиальных клеток; влияние на метаболизм, способное привести к гипергликемии, резорбции кости и увеличению мышечного гликогенолиза, т.е. кахексии, наблюдаемой при некоторых паразитарных инфекциях [6].

В результате высвобождения ФНО повышается проницаемость капилляров, повреждается эндотелий сосудов, возникает внутрисосудистый тромбоз. Концентрация циркулирующего ФНО- $\alpha$  обычно очень низка (<5 пг/мл), однако она

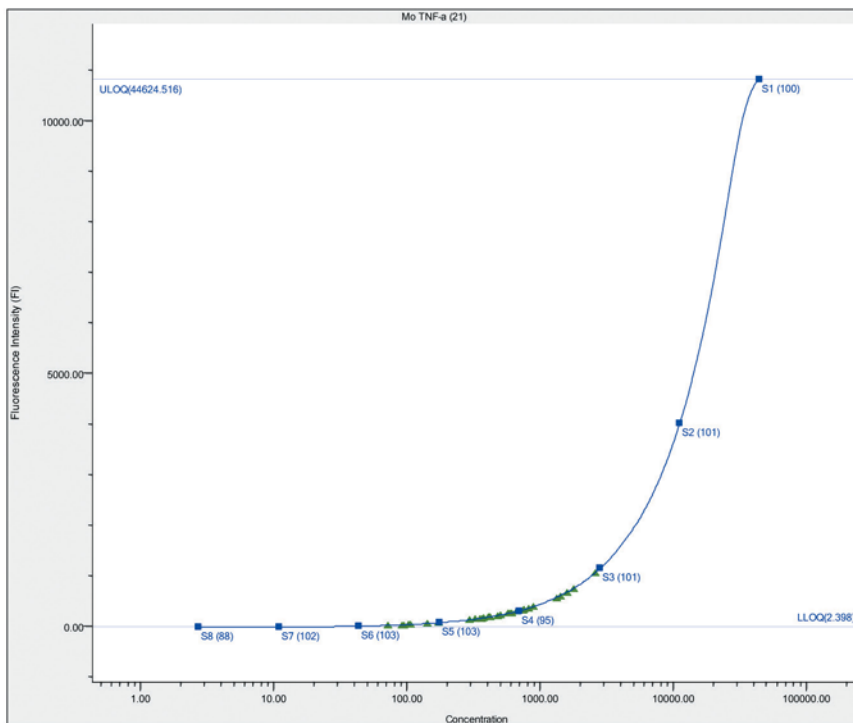


Рис. 4. Типичный вид концентрационной калибровочной кривой фактора некроза опухоли ФНО- $\alpha$ .

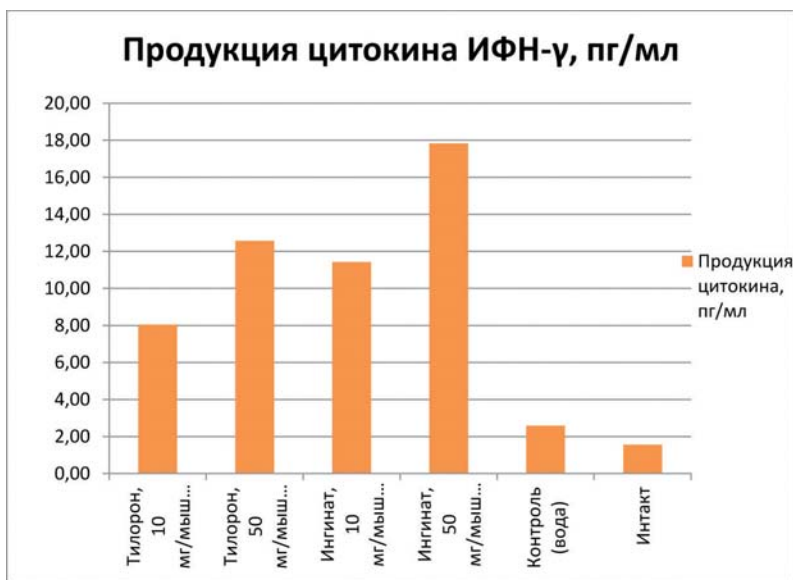


Рис. 5. Продукция цитокина ИФН-γ после внутрижелудочного введения тилорона и ингината в дозах 10 и 50 мг/мышь. Линия мышей C57Bl6/Y.

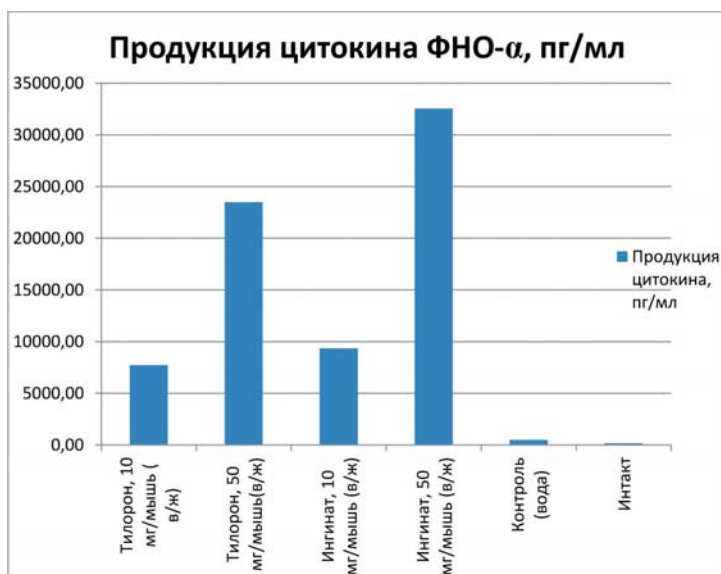


Рис. 6. Продукция цитокина ФНО-α после внутрижелудочного введения тилорона и ингината в дозах 10 и 50 мг/мышь. Линия мышей C57Bl6/Y.

резко возрастает (максимум за 90 мин) после введения липополисахарида и возвращается к норме в течение 4-х ч. Высокие уровни ФНО-α (>300 пг/мл)

обнаруживают во время септического шока. Сохранение высоких уровней указывает на возможность возникновения нежелательных последствий. Было

показано, что у ВИЧ-инфицированных лиц в начальный период заболевания значительно увеличиваются концентрации ФНО- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . Повышенный уровень ФНО- $\alpha$  при СПИДе индуцирует репликацию вируса в инфицированных клетках по ауто- или паракринному пути. Кроме того, ФНО, осуществляя киллинг клеток, пораженных вирусом, вызывает вирусемию и заражение новых лимфоцитов [7].

### **Выводы**

Полученные экспериментальные данные иллюстрируют, что изучаемые препараты – производные флуорена (тилорон и ингинат) выступают как эффективные ингибиторы NAT и оказывают иммуномодулирующее действие по уровню продукции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ .

Проведенные исследования производных флуорена – тилорона и ингината – указывают на ингибирование NAT-системы ацетилирования в процессе биотрансформации обоими препаратами. При этом ингибирующее действие ингината превышает таковое тилорона в 2,2 раза.

Индуцирующее действие исследуемых веществ выражено в увеличенной продукции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ . Наибольшая продукция цитокинов установлена для препарата ингинат, превышающая по продукции ИФН- $\gamma$  в 1,5 раза, а по продукции ФНО- $\alpha$  – в 1,35 раза содержание этих цитокинов по сравнению с индукцией тилороном в дозах 10 и 50 мг/мышь.

Данные наблюдения могут быть использованы для поиска производных флуорена как перспективных средств в моделировании противовирусных молекул-кандидатов и иммуностимуляторов.

На основании результатов исследования могут быть созданы модели состояний развития противоопухолевого иммунитета, на основе которых возможны поиск, синтез, испытание и конструирование иммунокорректирующих средств – индукторов интерферона с базисной молекулой флуорена.

### **Список литературы**

1. *Ермольева З.В., Корнеева Л.Е., Балежина Т.И., Николаева О.В., Гвазава И.С.* Тилорон как индуктор интерферона // Антибиотики. – 1973. – Т. 18. – № 6. – С. 517-520.
2. *Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Петрова Н.В., Процина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О.* Регуляция активности систем ацетилирования в процессах канцерогенеза: от фенотипа к эпигенетике // Биомедицина. – 2016. – № 4. – С. 4-21.
3. *Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.* Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина. – 2006. – № 4. – С. 85-87.
4. *Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М.* Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы) // Биомедицина. – 2014. – № 3. – С. 4-22.
5. *Кукес В.Г., Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатев И.В.* Фармакогенетика системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств: от теории к практике // Биомедицина. – 2007. – № 6. – С. 29-47.
6. *Филиппова Т.О., Головенко Н.Я.* Тилорон: профиль биологической активности. Фармакологические свойства // Интерактивная антропология. – 2006. – № 1(7). – С. 18-23; № 2(8). – С. 36-40.
7. *Хаитов Р.М., Пащенко М.В., Пинегин Б.В.* Биология рецепторов врожденной иммунной системы // Физиология и патология иммунной системы. – 2008. – Т. 12. – С. 3-28.
8. *Chandra P., Wright G.J.* Tilorone hydrochloride: the drug profile // Top. Curr. Chem. – 1977. – Vol. 72. – No. 1. – Pp. 125-148.
9. *Hanna P.E.* N-acetyltransferases, O-acetyltransferases, and N, O-acetyltransferases: enzymology and bioactivation // Adv. Pharmacol. – 1994. – No. 27. – Pp. 401-430.

10. *Hein D.W.* Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis // *Mutation Research*. – 2002. – No. 506-507. – Pp. 65-77.
11. *Katz E., Margalith E., Winer B.* The effect of tilorone hydrochloride on the growth of several animal viruses in tissue cultures // *J. Gen. Virol.* – 1976. – Vol. 31. – No. 1. – Pp. 125-129.
12. *Kaufman H.E., Centifanto Y.M., Ellison E.D., Brown D.C.* Tilorone hydrochloride: human toxicity and interferon stimulation // *Proc. soc. exp. biol. and med.* – 1971. – No. 1. Pp. 357-360. PMID 5581674.
13. *Pindak F.F., Schmidt J.P., Giron D.J., Allen P.T.* Interferon levels and resistance to viral infections associated with selected interferon inducers // *Proc. soc. exp. biol. and med.* – 1971. – Vol. 138. – No. 1. – P. 317-321.
14. *Raychaudhuri A., Megel H.* The effect of tilorone on immunoglobulin bearing lymphocytes (B cells) in peripheral blood and spleens of mice // *J. Reticuloendothel. Soc.* – 1976. – Vol. 20. – No. 2. – Pp. 127-134.
5. *Kukes V.G., Sychev D.A., Ramenskaya G.V., Ignatyev I.V.* Farmakogenetika sistemy biotrvneformatsii i transporterov lekarstvennykh sredstv: ot teorii k praktike [Pharmacogenetics of biotransformation and drug transporters: from theory to practice]. *Biomedicine*. 2007. No. 6. Pp. 29-47. (In Russian).
6. *Filippova T.O., Golovenko N.Ya.* Tiloron: profil' biologicheskoy aktivnosti. Farmakologicheskiye svoystva [Tyloron: a profile of biological activity. Pharmacological properties]. *Interaktivnaya antropologiya* [Interactive anthropology]. 2006. No. 1(7). Pp. 18-23; No. 2(8). Pp. 36-40. (In Russian).
7. *Khaitov R.M., Paschenkov M.V., Pinegin B.V.* Biologiya retseptorov vrozhdennoy immunnnoy sistemy [Biology of receptors of the congenital immune system]. *Fiziologiya i patologiya immunnnoy sistemy* [Physiology and pathology of immune system]. 2008. T. 12. Pp. 3-28. (In Russian).
8. *Chandra P., Wright G.J.* Tilorone hydrochloride: the drug profile. *Top. Curr. Chem.* 1977. Vol. 72. No. 1. Pp. 125-148.
9. *Hanna P.E.* N-acetyltransferases, O-acetyltransferases, and N, O-acetyltransferases: enzymology and bioactivation. *Adv. Pharmacol.* 1994. No. 27. Pp. 401-430.
10. *Hein D.W.* Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research*. 2002. No. 506-507. Pp. 65-77.
11. *Katz E., Margalith E., Winer B.* The effect of tilorone hydrochloride on the growth of several animal viruses in tissue cultures. *J. Gen. Virol.* 1976. Vol. 31. No. 1. Pp. 125-129.
12. *Kaufman H.E., Centifanto Y.M., Ellison E.D., Brown D.C.* Tilorone hydrochloride: human toxicity and interferon stimulation. *Proc. soc. exp. biol. and med.* 1971. No. 1. Pp. 357-360. PMID 5581674.
13. *Pindak F.F., Schmidt J.P., Giron D.J., Allen P.T.* Interferon levels and resistance to viral infections associated with selected interferon inducers. *Proc. soc. exp. biol. and med.* 1971. Vol. 138. No. 1. Pp. 317-321.
14. *Raychaudhuri A., Megel H.* The effect of tilorone on immunoglobulin bearing lymphocytes (B cells) in peripheral blood and spleens of mice. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1976. Vol. 20. No. 2. Pp. 127-134.

## References

1. *Ermol'eva Z.V., Korneeva L.E., Balezina T.I., Nikolaeva O.V., Gvazava I.S.* Tiloron kak induktor interferona [Tyloron as an inducer of interferon]. *Antibiotiki* [Antibiotics]. 1973. T. 18. No. 6. Pp. 517-520. (In Russian).
2. *Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Petrova N.V., Pronina G.I., Koryagina N.Yu., Revyakin A.O.* Regulyatsiya aktivnosti sistem atsetilirovaniya v protsessakh kantserogeneza: ot fenotipa k epigenetike [Regulation of the activity of acetylation systems in the processes of carcinogenesis: from phenotype to epigenetics]. *Biomedicine*. 2016. No. 4. Pp. 4-21. (In Russian).
3. *Karkischenko V.N., Martynov V.V.* Farmakologiya, genopolimorfizm i klonirovaniye genov NAT u cheloveka i zhivotnykh-modeley [Pharmacology, gene polymorphism and cloning of NAT genes in humans and animal models]. *Biomedicine*. 2006. No. 4. Pp. 85-87. (In Russian).
4. *Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M.* Sozdaniye gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological studies (successes, fail-

## To the pharmacodynamics of derivative fluorine – tilorone and inhinate – on the basis of inhibition of N-acetyltransferase and cytokine production

V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, D.V. Khvostov, R.A. Ageldinov

Experimental data on the biological effects of drugs – derivatives of fluorene: tilorone and inhinate. Drugs act as effective inhibitors of NAT and have immunomodulatory effects about the production of IFN-gamma and TNF-alpha. Monitoring data can be used to find derivatives fluorene as promising tools in the simulation of antiviral molecules-candidates and adjuvants.

Based on the data obtained in vitro experiment on enzyme activity with an effective inhibitory effect derived fluorene (tilorone and inhinate) by the enzyme N-acetyltransferase NAT2 person.

For selected inhibitors studied concentration dependence of the enzymatic activity and determined the concentration value premaxillae inhibition IC50.

The essence of the act fluorene derivatives to inhibit acetylation via the enzyme N-acetyltransferase (NAT1, NAT2, etc.) and through immunomodulatory effects on cytokine immune status of mice.

**Key words:** N-acetyltransferase, fluoren, tilorone, inhinate, acetylation, mouse humanized line NAT2hom, inhibition, cytokines, interferons, tumor necrosis factor.

## Информативные параметры ультразвуковой вокализации кроликов при высоко- и низкочастотной транскраниальной электростимуляции

Н.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, Ю.В. Фокин<sup>1</sup>, А.А. Николаев<sup>2,3</sup>, Ю.А. Чудина<sup>2,3</sup>,  
Д.Б. Чайванов<sup>2,3</sup>, А.Е. Емельянова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

<sup>3</sup> – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, [fokin-yuri@yandex.ru](mailto:fokin-yuri@yandex.ru);  
к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, [chaivanov@yandex.ru](mailto:chaivanov@yandex.ru)

---

В данной работе на основе сравнительного анализа результатов ранее проведенного и настоящего экспериментального исследования была показана возможность использования феномена ультразвуковой вокализации для дифференциации разных функциональных состояний животного, на примере кролика. Ультразвуковой сигнал, зафиксированный в состоянии активации, вызванном электростимуляцией с частотой 70 Гц, характеризовался типичной двухпиковой формой, где пики появлялись в частотных диапазонах, схожих с диапазонами ультразвукового сигнала в состоянии покоя. Активирующая электростимуляция способствовала повышению спектральной плотности мощности по каждому пику ультразвуковой вокализации кролика по сравнению с состоянием покоя и электросна.

**Ключевые слова:** ультразвуковая вокализация, активация, электрическая стимуляция, спектральная плотность мощности, частота, кролики.

---

### Введение

Многочисленные экспериментальные исследования подтверждают способность млекопитающих (летучие мыши, дельфины, крысы, мыши, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи и обезьяны) генерировать сигналы в ультразвуковом диапазоне частот. В основном, феномен ультразвуковой вокализации (УЗВ) животных изучается в обычных условиях жизнедеятельности и социального взаимодействия [7, 11, 12] с целью выявления его поведенческих особенностей и мозговых механизмов [8, 9, 10].

В связи с тем, что способность к генерации ультразвуковых сигналов

в равной степени обнаруживается и у лабораторных животных [3], представляется перспективным рассматривать феномен УЗВ как инструмент диагностики текущего состояния и динамической смены одного функционального состояния другим. В этом контексте изучение параметрических (частотные и спектральные характеристики) и непараметрических (типичная форма зафиксированного сигнала, наличие экстремумов) особенностей ультразвукового сигнала лабораторных животных, используемых в качестве животных-моделей состояний человека [6], является необходимым этапом в



процессе выявления физиологических маркеров функциональных состояний. С этой целью были проведены исследования особенностей УЗВ кроликов и мини-свиней, функциональное состояние которых инициировали с помощью низкочастотной ритмической электрической стимуляции подкорковых структур [4, 5].

Эти экспериментальные работы показали, что в инициированном состоянии электросна исследуемые лабораторные животные способны генерировать ультразвуковой сигнал, форма которого сходна с формой УЗВ в обычном состоянии покоя. Сравнительный анализ УЗВ кроликов и мини-свиней позволил выявить сходства и различия ультразвукового сигнала этих животных. Оказалось, что паттерны УЗВ этих животных обладают принципиальным сходством, проявляющимся в наличии двух максимумов, возникающих в близких по значениям частотных диапазонах, при этом значение спектральной плотности мощности первого максимума почти в два раза превышает таковое второго максимума [5].

Эти исследования выявили способность лабораторных животных генерировать УЗВ как в состоянии покоя, так и в состоянии электросна, инициированного электрическим воздействием. Исследования особенностей УЗВ лабораторных животных в состояниях, инициированных с помощью электростимуляции, продолжены в настоящей экспериментальной работе, **целью** которой явилось изучение особенностей УЗВ кроликов, подвергавшихся воздействию электростимуляции с частотой 70 Гц, вызывающему состояние общей активации [1]. В

связи с этим далее указанное состояние будет обозначено как состояние электроактивации.

## **Материалы и методы**

### **Животные**

Экспериментальное исследование проводили на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Осуществление записи данных производилось на самках кроликов породы советская шиншилла в возрасте 6-10 мес. Всего обследовали 8 особей, из которых для анализа отобрали 5 животных. Исследованные животные содержались в индивидуальных клетках при температуре воздуха 18-22°C и относительной влажности 60-70%. В качестве пищи для кроликов использовали комбикорм ПК-90 и водопроводную очищенную воду *ad libitum*.

### **Регистрация УЗВ**

Запись ультразвуковых сигналов осуществляли с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack («Metris V.V.», Нидерланды), установленных на расстоянии 20-25 см от головы животного. Частота дискретизации записываемого в цифровом формате сигнала составляла 200 кГц. Регистрация УЗВ животного, подвергавшегося воздействию электростимуляции, производилась в течение 30 мин.

### **Процедура электростимуляции**

Транскраниальная электростимуляция (электроактивация) осуществлялась с помощью электрического тока прямоугольной формы частотой 70 Гц (сила тока 2 мА), поступающего в мозг через глазные и затылочные электроды [2]. Данная стимуляция способствовала активации поведенческих механизмов животного: они старались снять глазные электроды и выпрыгнуть из клетки.

Транскраниальная электроактивация мозга проводилась с помощью бытового прибора «Электросон – ЭГСАФ-01» (ООО «МикроМед», Воронеж, Россия). В течение всего воздействия электростимуляции (30 мин) осуществлялась запись УЗВ.

### Статистическая обработка

Первоначальная обработка полученных записей ультразвукового сигнала состояла в удалении артефактов, представленных монотонными шумами. Затем с помощью пакета программ SKILAB-5.4 методом Уэлча (функция *rwelch*) был проведен спектральный анализ ультразвука путем быстрого преобразования Фурье (эпоха анализа составляла 10 мс, размерность преобразования – 2000 интервалов) в полосе частот 15-100 кГц. В результате спектрального анализа получили зна-

чения спектральной плотности мощности (СПМ) для всего выбранного диапазона частот, нормированного к СПМ фона окружающей среды. Итогом стал вектор динамики ультразвука, в котором находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения изменяли пропорционально максимуму, затем находили медианы по каждой частоте.

### Результаты и их обсуждение

Данные по всем выбранным животным были усреднены и представлены в виде графика зависимости СПМ от частоты ультразвука, отражающего УЗВ группы кроликов под воздействием электроактивации (рис.).

Во время действия электростимуляции УЗВ кролика характеризуется ограниченным диапазоном частот

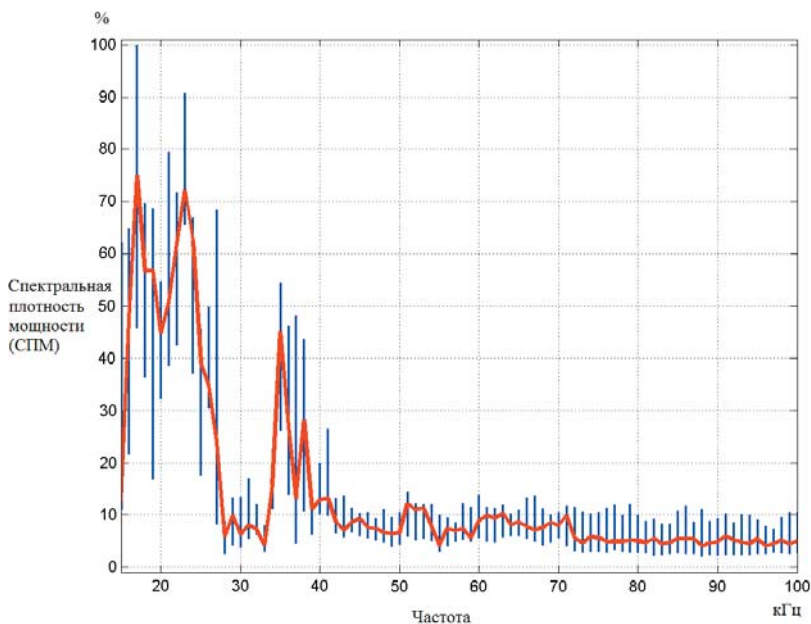


Рис. УЗВ кроликов под воздействием электростимуляции с частотой 70 Гц: красный контур – медианы частот, синие вертикальные линии – 95% доверительный интервал. По оси абсцисс отложена частота (кГц), по оси ординат – спектральная плотность мощности УЗВ (%).

~17-40 кГц. Электрическое воздействие не меняет типичную двухпиковую форму ультразвукового сигнала кролика, зафиксированную у данного животного в состоянии покоя. Первый пик возникает в диапазоне частот от 17 до 27 кГц, второй пик – в диапазоне 33-38 кГц.

При этом максимальное значение СПМ первого пика обнаруживается на частоте 17 кГц, а максимальное значение СПМ второго пика – на частоте 36 кГц.

Как было показано в предыдущей работе [5], в состоянии покоя УЗВ кролика характеризуется диапазоном 20-40 кГц и двухпиковой формой, где первый и второй пик обнаруживаются, соответственно, на частоте 20-25 и 33-38 кГц. Эти данные являются схожими с результатами, полученными в настоящем исследовании. Выявляется сходство в общем диапазоне частот ультразвукового сигнала и пересечение в диапазонах появления экстремумов или пиков (табл.). Максимальные значения второго пика совпадают для состояния покоя и под воздействием электроактивации, а для первого пика наблюдается небольшой сдвиг на 4 кГц: 21 кГц – для состояния покоя и 17 кГц – под

воздействием электроактивации. Следовательно, частотные характеристики УЗВ кролика в покое и под воздействием электроактивации в целом являются схожими.

Различия же между УЗВ кролика без стимуляции и под воздействием активационной стимуляции относятся к СПМ выделенных пиков. Нормализация СПМ в обоих экспериментах допускает сравнительный анализ, который показал, что под действием электроактивации происходит увеличение СПМ для обоих пиков. В состоянии покоя СПМ первого пика составляла 56%, а второго – 21%, под действием электростимуляции значения СПМ для первого и второго пиков, соответственно, составили 75 и 46%. Таким образом, СПМ первого пика под воздействием активирующей стимуляции увеличилась в 1,3 раза (на 19%), а второго – в 2,2 раза (на 25%).

Сравнение УЗВ кролика при действии электростимуляции с разной частотой позволило выявить сходства и различия. Сходными являются двухпиковая форма, близкие по значению частоты возникновения первых пиков и одинаковые частоты возникновения вторых пиков (табл.). Различное влияние на

Таблица  
**Основные параметрические характеристики УЗВ кролика в разных состояниях**

Функциональное состояние	Общий диапазон частот УЗВ кролика, кГц	Диапазон частот пика, кГц		Частота максимального значения пика, кГц		СПМ пика, %		Отношение СПМ 2-го пика к 1-му пику
		1-й пик	2-й пик	1-й пик	2-й пик	1-й пик	2-й пик	
Покой	20-40	20-25	33-38	21	36	56	21	0,38
Электросон	20-40	24-29	32-39	26	36	56	16	0,29
Электроактивация	20-40	17-27	33-38	17	36	75	46	0,61

характеристики УЗВ кролика 6-ти-Гц-вой электростимуляции (электросна) и 70-ти-Гц-вой электростимуляции (электроактивации) обнаруживается в виде разных значений СПМ обоих пиков: при электроактивации мощность сигналов усиливается.

Сравнение УЗВ кролика в трех разных состояниях – в состоянии покоя, в состоянии электросна [5] и в состоянии электроактивации – показало стабильность частотных характеристик УЗВ-сигнала и закономерное изменение значений СПМ (табл.). По сравнению с состоянием покоя СПМ в состоянии электросна для первого пика не меняется, а для второго – уменьшается; в состоянии электроактивации СПМ и первого, и второго пика увеличивается. Такое увеличение СПМ на всем пиковом диапазоне УЗВ кролика является следствием воздействия 70-ти-Гц-вой электростимуляции, вызывающей состояние общей активации.

Для более наглядного представления различий между СПМ УЗВ кролика в разных состояниях вычислили отношения значений СПМ второго пика к СПМ первого пика и получили три значения для каждого состояния. Оказалось, что для состояния покоя соотношение составляет 0,38, для состояния электросна – 0,29, а для состояния электроактивации – 0,61 (табл.). Сравнение показывает, что минимальное значение соответствует состоянию электросна, максимальное – состоянию электроактивации, а для состояния покоя характерно промежуточное значение. Таким образом, значения соотношения показывают суммарные изменения СПМ-паттерна УЗВ в разных состояниях и

могут быть рассмотрены как количественная мера оценки уровня активации животного.

### **Выводы**

Сравнительный анализ результатов исследования УЗВ кролика в состоянии спокойного бодрствования и в состояниях, вызванных воздействием электростимуляции, позволил сделать следующие выводы:

1. Экспериментально подтверждена способность кролика генерировать УЗВ как в состоянии покоя, так и при действии электростимуляции с разной частотой воздействия.

2. Выявлено, что УЗВ кролика в разных состояниях имеет общий паттерн ультразвукового сигнала, представленный двухпиковой формой со сходной частотой возникновения пиков.

3. Разные состояния (покоя, иницированное состояние электросна и иницированное состояние электроактивации) отличаются соотношением СПМ двух пиков паттерна УЗВ, которое может быть рассмотрено как количественная мера уровня активации животного.

4. На основе результатов проведенных экспериментальных исследований УЗВ кролика динамика параметров ультразвукового сигнала может быть использована для дифференциации разных состояний животного, как обычных, так и иницированных с помощью воздействия электростимуляции.

5. Информативные параметры УЗВ кроликов в различных функциональных состояниях позволяют проводить экстраполяцию результатов на других животных-моделей, используемых в биомедицинских исследованиях.

## Список литературы

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: Пер. с англ. Е.Н. Живописцевой / Под ред. Батуева А.С. – М.: Высшая школа. – 1991. – 399 с.
2. Гиляровский В.А., Ливенцев Н.М., Сегаль Ю.Е., Кириллова З.А. Электросон. – М.: Медгиз. – 1958. – 172 с.
3. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 4-23.
4. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Николаев А.А. Влияние транскраниальной низкочастотной электростимуляции головного мозга на спектральные характеристики ультразвуковой вокализации мини-свиней светлогорской популяции // Биомедицина. – 2015. – № 3. – С. 20-26.
5. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Чудина Ю.А., Емельянова А.Е., Николаев А.А., Чайванов Д.Б. Исследование влияния низкочастотной ритмической электростимуляции подкорковых структур головного мозга кролика на его способность к ультразвуковой вокализации // Биомедицина. – 2016. – № 1. – С. 18-24.
6. Чайванов Д.Б., Станкова Н.В. Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 164-168.
7. Brudzynski S.M., Neville H. Fletcher Rat ultrasonic vocalization: short-range communication // In: Stefan M. Brudzynski (Ed.) Handbook of Mammalian Vocalization. – 2010. – No. 3. – Pp. 69-76.
8. Carruthers I.M., Natan R.G., Geffen M.N. Encoding of ultrasonic vocalizations in the auditory cortex // J. Neurophysiol. – 2013. – No. 109. – Pp. 1912-1927.
9. Ciucci M.R., Ahrens A.M., Ma S.T., Kane J.R., Windham E.B., Woodlee M.T., Schallert T. Reduction of dopamine synaptic activity: Degradation of 50-kHz ultrasonic vocalization in rats // Behav. Neurosci. – 2009. – No. 123(2). – Pp. 328-336.
10. Hage S.R., Gavrilov N., Salomon F., Stein A.M. Temporal vocal features suggest different call-pattern generating mechanisms in mice and bats // BMC Neuroscience. – 2013. – No. 14. – P. 99.
11. Ramsier M.A., Cunningham A.J., Moritz G.L., Finneran J.J., Williams C.V., Ong P.S., Gursky-Doyen S.L., Dominy N.J. February primate communication in the pure ultrasound // Biology Letters. – 2012. – No. 8 [Epub ahead of print].
12. Schuh D., Hoy S.T., Selzer D. Vocalization of rabbit pups in the mother-young relationship // Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress. – Puebla, Mexico. – 2004. – Pp. 1266-1270.

## References

1. Buresh Ja., Bureshova O., H'juston Dzh.P. Metodiki i osnovnye jeksperimenty po izucheniju mozga i povedenija [Techniques and basic experiments on studying of a brain and behavior]: Per. s angl. E.N. Zhivopiscevoj [The translation from English of E.N. Zhivopistseva]. Pod red. Batueva A.S. [Edited by Batuev A.S.]. Moscow: Vysshaja shkola. 1991. 399 p. (In Russian).
2. Giljarovskij V.A., Livencev N.M., Segal' Ju.E., Kirillova Z.A. Jelektroson [Electrosleep]. Moscow: Medgiz. 1958. 172 p. (In Russian).
3. Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Sakharov D.S., Karkischenko V.N., Kapanadze G.D., Chayvanov D.B. Ul'trazvukovaja vokalizacija i ee informativnye parametry u zhivotnyh i che-loveka [Ultrasonic vocalization and its informative parameters in animals and humans]. Biomedicine. 2011. No. 1. P. 4-23. (In Russian).
4. Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Chayvanov D.B., Chudina Yu.A., Nikolaev A.A. Vli-janie transkranal'noj nizkochastotnoj jelektrostimuljacji golovnogogo mozga na spektral'nye harakteristiki ul'trazvukovoj vokalizacii mini-svinej svetlogorskoj populjacji [Influence of transcranial low-frequency electrical stimulation of a brain on the spectral characteristics of ultrasonic vocalization of mini-pigs of the Svetlogorsk population]. Biomedicine. 2015. No. 3. Pp. 20-26. (In Russian).
5. Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Chudina Yu.A., Emelyanova A.E., Nikolaev A.A., Chayvanov D.B. Issledovanie vlijanija nizkochastotnoj ritmicheskoj jelektrostimuljacji podkorkovyh struktur golovnogogo mozga krolika na ego sposobnost' k ul'trazvukovoj vokalizacii [Investigation of the influence of low-frequency

- rhythmic electrostimulation of subcortical structures of the rabbit brain on his ability to ultrasonic vocalization]. *Biomedicine*. 2016. No. 1. Pp. 18-24. (In Russian).
6. *Chayvanov D.B., Stankova N.V.* Analiz ogranichenij modelirovanija na zhiivotnyh fizicheskikh metodov moduljacji i diagnostiki funkcional'nogo sostojanija nervnoj sistemy cheloveka s cel'ju vybora zhiivotnogo-modeli [The analysis of restrictions of model operation for animals of physical methods of modulation and diagnostics of the functional state of nervous system of the person for the purpose of the choice of an animal model]. *Biomedicine*. 2013. No. 4. Pp. 164-168. (In Russian).
  7. *Brudzynski S.M., Neville H.* Fletcher Rat ultrasonic vocalization: short-range communication In: Stefan M. Brudzynski (Ed.) *Handbook of Mammalian Vocalization*. 2010. No. 3. Pp. 69-76.
  8. *Carruthers I.M., Natan R.G., Geffen M.N.* Encoding of ultrasonic vocalizations in the auditory cortex. *J. Neurophysiol.* 2013. No. 109. Pp. 1912-1927.
  9. *Ciucci M.R., Ahrens A.M., Ma S.T., Kane J.R., Windham E.B., Woodlee M.T., Schallert T.* Reduction of dopamine synaptic activity: Degradation of 50-kHz ultrasonic vocalization in rats. *Behav. Neurosci.* 2009. No. 123(2). Pp. 328-336.
  10. *Hage S.R., Gavrilov N., Salomon F., Stein A.M.* Temporal vocal features suggest different call-pattern generating mechanisms in mice and bats. *BMC Neuroscience*. 2013. No. 14. P. 99.
  11. *Ramsier M.A., Cunningham A.J., Moritz G.L., Finneran J.J., Williams C.V., Ong P.S., Gursky-Doyen S.L., Dominy N.J.* February primate communication in the pure ultrasound. *Biology Letters*. 2012. No. 8 [Epub ahead of print].
  12. *Schuh D., Hoy S.T., Selzer D.* Vocalization of rabbit pups in the mother-young relationship. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress*. Puebla, Mexico. 2004. Pp. 1266-1270.

## Informative parameters of ultrasonic vocalization of rabbits with high- and low-frequency transcranial electrostimulation

N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, A.A. Nikolaev, Yu.A. Chudina,  
D.B. Chayvanov, A.E. Emelyanova

On the comparative analysis of the present and earlier obtained research results it have been demonstrated possibility of using the ultrasonic vocalization for differentiation animal functional states (by the example of rabbits) in this article. Recorded in activating state, generated electrostimulation with frequency 70 Hz, the ultrasonic signal was characterized by typical two-peak shape, where pikes appeared in the same frequency range that ultrasonic signal in the rest state. The activating electrostimulation made increasing of power spectral density of ultrasonic signal for each pike as compared with rest state and electrosleep state.

**Key words:** ultrasonic vocalization, activation, electrical stimulation, power spectral density, frequency, rabbits.

## Терапевтический лекарственный мониторинг нифедипина методом ВЭЖХ-МС/МС при лечении артериальной гипертензии

Т.А. Родина<sup>1,2</sup>, Е.С. Мельников<sup>2,3</sup>, С.А. Белков<sup>1,2,3</sup>, А.А. Данько<sup>2</sup>,  
А.В. Соколов<sup>1,3</sup>, А.Б. Прокофьев<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> – ГБУЗ «Городская клиническая больница имени И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

<sup>3</sup> – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.х.н. Родина Татьяна Александровна, [semina\\_tatiana@mail.ru](mailto:semina_tatiana@mail.ru);  
к.ф.н. Мельников Евгений Сергеевич, [evgeniy.melnikov@gmail.com](mailto:evgeniy.melnikov@gmail.com)

Разработана и валидирована методика определения нифедипина и дегидронифедипина в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС для проведения терапевтического лекарственного мониторинга у пациентов с артериальной гипертензией. В исследовании участвовали 42 пациента, принимавших нифедипин в форме таблеток с модифицированным высвобождением. Показано, что терапевтический лекарственный мониторинг нифедипина целесообразно проводить как при назначении дозы 30 мг (для выявления пациентов, которым требуется повышение дозы препарата для достижения необходимого терапевтического эффекта), так и при назначении доз 60 мг и 90 мг с целью выявления пациентов, имеющих высокую склонность к развитию нежелательных лекарственных реакций. Одновременное определение нифедипина и дегидронифедипина в сыворотке крови человека позволяет определять фенотип каждого пациента по скорости метаболизма нифедипина и корректировать дозу и кратность приёма препарата в зависимости от интенсивности биотрансформации.

**Ключевые слова:** нифедипин, дегидронифедипин, ВЭЖХ-МС/МС, артериальная гипертензия, терапевтический лекарственный мониторинг.

### Введение

Оптимизация фармакотерапии (подбор оптимальных дозировок лекарственных средств (ЛС) и интервалов дозирования) является одной из основных задач клинической фармакологии, и эта задача решается в т.ч. с помощью фармакокинетического подхода. Данный подход реализуется на практике при проведении терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) и позволяет корректировать и поддерживать концентрации ЛС в месте действия с

учётом индивидуальных особенностей каждого пациента [1, 4].

Нифедипин является важнейшим представителем ЛС из группы блокаторов кальциевых каналов, применяется для лечения артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности [3, 15].

При терапевтических субтоксичных концентрациях нифедипин мало влияет на кардиомиоциты и проводящие клетки. Блокируя кальциевые каналы, он подавляет спазм коронарной артерии и

расширяет системные артерии, приводит к увеличению доставки кислорода к миокарду и снижению системного артериального давления (АД). Быстро и полностью всасывается после перорального введения. Связывание с белками – более 90%. Метаболизируется в печени с помощью ферментов системы цитохрома P450. Биодоступность составляет 40-60% вследствие эффекта первого прохождения через печень. Преобладает метаболизм при участии изофермента CYP3A4, в меньшей степени – CYP1A2

и CYP2A6, при этом образуются высоко растворимые неактивные метаболиты (рис. 1), которые выводятся почками и составляют 60-80% от принятой дозы [19].

Фармакокинетические параметры значительно различаются в зависимости от применяемой лекарственной формы (ЛФ). Для ЛФ немедленного высвобождения время достижения максимальной концентрации ( $t_{max}$ ) нифедипина в крови составляет менее часа, а период полуэлиминации – около двух

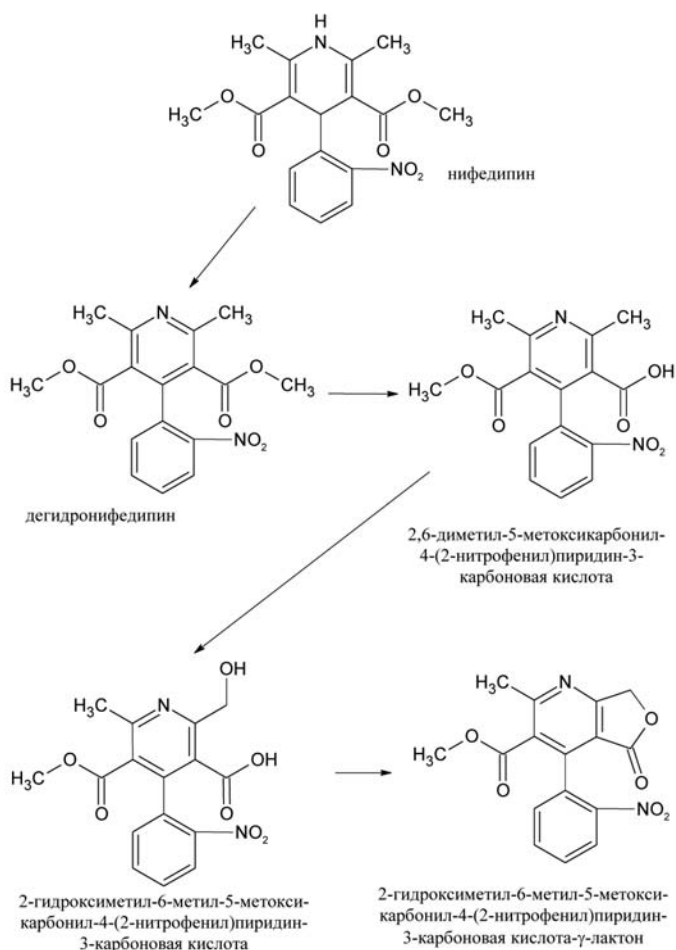


Рис. 1. Путь метаболизма нифедипина.



часов. Широкое распространение получили ЛФ нифедипина пролонгированного действия, которые обеспечивают длительное поддержание равновесной концентрации ЛС в крови. Для ЛФ с модифицированным высвобождением  $t_{\max}$  возрастает до 1,7-15 ч [16, 18, 21, 22].

Диапазон терапевтических концентраций по нифедипину составляет 25-150 нг/мл [7, 14]. При превышении максимального значения терапевтической концентрации возможно возникновение нежелательных лекарственных реакций (НЛР). Симптомы передозировки включают головокружение, сонливость, тошноту, тяжелое падение АД, невнятную речь и слабость. Кроме того, нифедипин порой становится причиной случайных или преднамеренных острых отравлений [2].

Среди факторов, влияющих на межиндивидуальные различия в фармакокинетике нифедипина, можно отнести расовую и этническую принадлежность, возраст, приём препарата натощак или с пищей, скорость клубочковой фильтрации, межлекарственные взаимодействия и т.п. [8, 9, 20, 25].

Таким образом, проведение ТЛМ при назначении препаратов нифедипина необходимо при индивидуальном подборе дозировки и кратности приёма ЛС, которые обеспечивали бы поддержание равновесной концентрации препарата в пределах терапевтического диапазона.

Одновременное определение концентраций нифедипина и его основного метаболита – дегидронифедипина – позволяет оценить индивидуальную скорость метаболизма ЛС в организме пациента.

Применяемые в настоящее время методики определения концентраций ни-

федипина и дегидронифедипина имеют ряд ограничений, не позволивших нам использовать их в практической работе, а именно: узкий диапазон анализируемых концентраций [11-13, 24], трудоёмкая пробоподготовка [10-13, 24], длительное время хроматографического разделение [10, 11], невозможность одновременного определения [10-13, 23, 24].

В связи с этим **целью** нашего исследования была разработка и валидация методики определения нифедипина и дегидронифедипина в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС для проведения ТЛМ нифедипина.

### Материалы и методы

Исследование проводилось на оборудовании фирмы «Shimadzu» (Япония), система ВЭЖХ Nexera LCMS-8040 (QQQ).

В работе использовали следующие реактивы: ацетонитрил (Panreac, supergradient for UPLC), муравьиная кислота (Fluka, for mass-spectrometry), деионизированная вода (электросопротивление – 18,2 МОм\*см). В исследовании использовали нифедипин, дегидронифедипин и прометазина гидрохлорид («Sigma-Aldrich»), отвечающие требованиям USP. Разделение осуществляли на колонке Synergi Polar RP (50x2 мм, 4 мкм, 80Å) с универсальной предколонкой C18, 4x3 мм («Phenomenex», США) при температуре 40°C. Подвижная фаза состояла из элюента А (0,1% (об.) муравьиной кислоты / деионизированная вода) и элюента В (0,1% (об.) муравьиной кислоты / ацетонитрил). Градиент по составу подвижной фазы представлен в табл. 1. Скорость потока – 0,7 мл/мин. Объем вводимой пробы – 3 мкл.

## Градиент по составу подвижной фазы

Время анализа, мин	Объёмная доля элюента В, %
0,00 → 0,20	5
0,20 → 0,35	5 → 40
0,35 → 1,10	40
1,10 → 1,13	40 → 55
1,13 → 1,30	55
1,30 → 1,50	55 → 100
1,50 → 2,10	100
2,10 → 2,20	100 → 5
2,20 → 3,00	5

В качестве внутреннего стандарта использовался прометазин, поскольку в наше время в клинической практике он практически не применяется, и, следовательно, это исключает возможность его нахождения в исследуемых образцах.

При ионизации использовали метод электрораспыления в положительном режиме. Детектирование проводилось в режиме мониторинга множественных реакций (ММР<sup>+</sup>). Ионы-предшественники соответствовали протонированным молекулярным ионам, а именно: [М+Н]<sup>+</sup> для нифедипина – 347,1 m/z, для дегидронифедипина – 345,2, для прометазина – 285,1 m/z. Параметры детектирования в режиме ММР<sup>+</sup> и энергии соударений подобраны экспериментально и представлены в табл. 2. Время

удерживания нифедипина составляло 1,65±0,09 мин, дегидронифедипина – 1,59±0,09, прометазина – 1,20±0,07 мин.

Пробоподготовка осуществлялась путём осаждения белков сыворотки крови ацетонитрилом. Для этого к 300 мкл исследуемой сыворотки (либо 270 мкл интактной сыворотки крови человека с прибавлением 30 мкл рабочего стандартного р-ра нифедипина и дегидронифедипина) добавляли 5 мкл р-ра внутреннего стандарта (прометазин с концентрацией 250 нг/мл), 900 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 15 с на лабораторном шейкере типа вортекс. Далее пробу центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 14000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в вials и помещали в автосамплер хроматографа.

Параметры детектирования исследуемых препаратов в режиме ММР<sup>+</sup>

Вещество	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	Энергия соударений, В
Нифедипин	347,10	315,10	-9,0
Дегидронифедипин	345,20	284,00	-29,0
Прометазина гидрохлорид	285,10	86,10	-20,0

Следует помнить, что недопустимо использование дневного (естественного) или искусственного освещения, поскольку нифедипин является фотолabileм веществом. В связи с этим, при работе со стандартными р-рами необходимо использовать посуду из тёмного стекла. Транспортировку образцов следует проводить в светонепроницаемой таре. Все операции с р-рами и пробами желательно проводить в тёмной комнате при свете красной лампы, используя светонепроницаемую посуду [17].

### Результаты исследований

Была проведена валидация методики по следующим характеристикам: селективность; эффект матрицы; степень извлечения; калибровочная кривая (рис. 2, 3); точность (внутри цикла

и между циклами); прецизионность (внутри цикла и между циклами); нижний предел количественного определения; перенос пробы; линейность отклика; стабильность образцов, в полном соответствии с требованиями Руководства [5].

Представленный способ количественного определения нифедипина и дегидронифедипина в сыворотке крови человека имеет ряд достоинств перед существующими методиками, таких как: экспрессность (время хроматографического анализа – 3 мин); одновременное определение нифедипина и дегидронифедипина, т.е. не требуется перехода на другой метод анализа или пробоподготовки в зависимости от задачи; максимально упрощённая пробоподготовка; использования метода

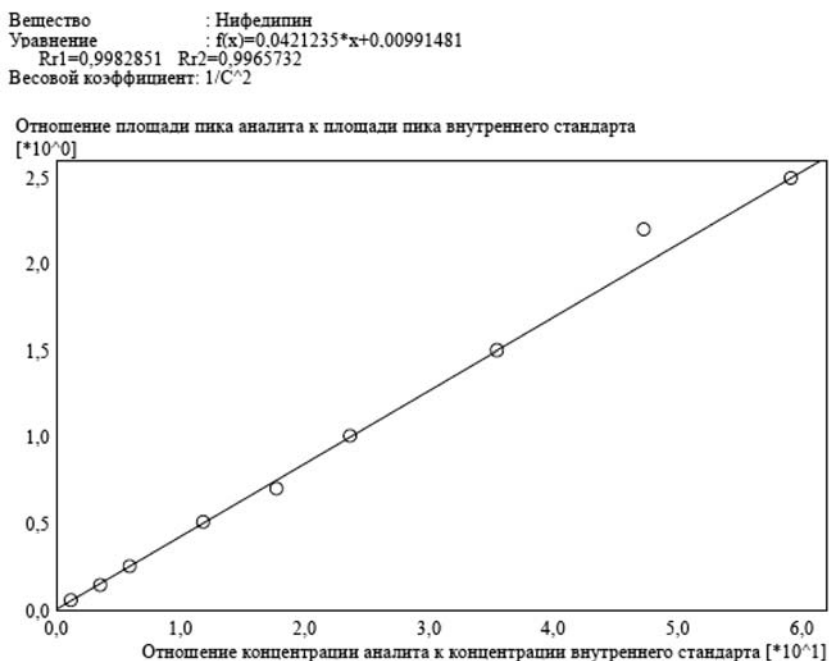


Рис. 2. Калибровочный график зависимости отношения площади пика нифедипина к площади пика прометазина от отношения концентрации нифедипина к концентрации прометазина в сыворотке крови человека.

Вещество : Дегидронифедипин  
 Уравнение :  $f(x)=0,156540 \cdot x-0,00439762$   
 $Rr1=0,9991144$   $Rr2=0,9982295$   
 Весовой коэффициент:  $1/C^2$

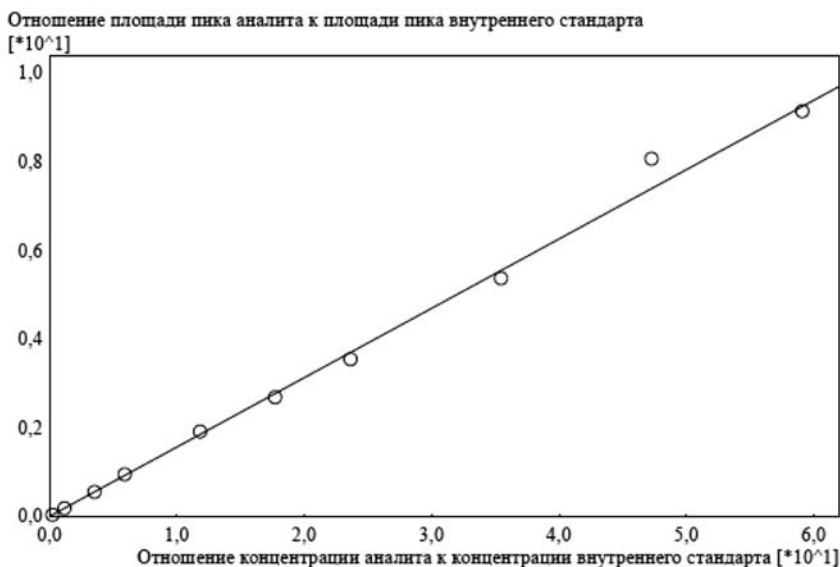


Рис. 3. Калибровочный график зависимости отношения площади пика дегидронифедипина к площади пика прометазина от отношения концентрации дегидронифедипина к концентрации прометазина в сыворотке крови человека.

внутреннего стандарта, что позволяет нивелировать вариабельность состава биологической матрицы (сыворотка крови человека).

Кроме вышеизложенного, следует отметить широкий аналитический диапазон разработанной методики ( $5 \div 250$  нг/мл для нифедипина и  $1 \div 250$  нг/мл – для дегидронифедипина), что позволяет использовать её для проведения ТЛМ, выполнения аналитического этапа исследований биоэквивалентности, оценки взаимозаменяемости препаратов нифедипина, диагностики острых отравлений ими.

### Обсуждение результатов

В настоящее время данная методика применяется в Центре персона-

лизированной медицины ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского ДЗМ» для проведения фармакокинетических исследований с целью оптимизации фармакотерапии нифедипином при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

В исследование были включены 42 пациента в возрасте 50-86 лет, из них 55% – женщины и 45% – мужчины. Всем пациентам был первично назначен нифедипин в форме таблеток с модифицированным высвобождением в дозировке 30 или 60 мг в зависимости степени тяжести заболевания. Сопутствующая терапия отражена в табл. 3.

Целью проведения ТЛМ является повышение эффективности и безопасности фармакотерапии с учётом индивидуальных особенностей пациентов.

Сопутствующая терапия у пациентов, включённых в исследование

Фармакологическая группа ЛС	Международное непатентованное наименование	Число пациентов, принимавших ЛС	Всего пациентов
Антиаритмические	Метопролол	25	37
	Бисопролол	4	
	Соталол	4	
	Верапамил	1	
	Лаптаконитина гидробромид	1	
	Дигоксин	1	
	Амиодарон	1	
Антигипертензивные	Эналаприл	27	31
	Лозартан	2	
	Азилсартан	1	
	Моксонидин	1	
Диуретики	Фуросемид	9	26
	Индапамид	8	
	Гидрохлоротиазид	5	
	Спиронолактон	4	
Антиагреганты	Ацетилсалициловая кислота	22	23
	Клопидогрел	1	
Гиполипидемические	Аторвастатин	11	22
	Розувастатин	11	
Антикоагулянты	Варфарин	4	7
	Дабигатран	2	
	Ривароксабан	1	
Гипогликемические	Гликлазид	4	7
	Метформин	3	
Прочие	Л-тироксин	5	5
	Алимемазин	3	3
	Тамсулозин	3	3
	Циннаризин	1	1
	Омега-3	1	1

Исходя из этих положений, нами были выработаны подходы к интерпретации результатов фармакокинетических исследований.

Первое, на что следует обратить внимание, – это абсолютное значение концентрации нифедипина в сыворотке крови пациента. В случае если она выходила за рамки терапевтического коридора, обычно требовалась корректировка дозы.

В результате проведённых исследований пациентов можно условно разделить на две основные группы. К первой группе относятся пациенты с условно нормальной фармакокинетикой после приёма ЛС, т.е. в пробе № 1 (перед очередным приемом препарата) концен-

трация нифедипина в сыворотке крови была в пределах нормы. Ко второй группе относятся пациенты с повышенной фармакокинетикой, т.е. в пробе № 1 концентрация нифедипина в сыворотке крови была выше нормы. В этом случае обычно требовалась корректировка дозы.

трация нифедипина была ниже, чем в пробе № 2 (через 4 ч после очередного приема препарата). Доля таких пациентов составляла 67% от общего числа. Ко второй группе относятся пациенты с условно парадоксальной фармакокинетикой после приёма ЛС, т.е. в пробе № 1 концентрация нифедипина была выше, чем в пробе № 2. Доля таких пациентов составляла 33% от общего числа. Каждая из этих групп была дополнительно поделена на две подгруппы: подгруппа А – пациенты, получавшие таблетки нифедипина с модифицированным высвобождением в дозе 30 мг; подгруппа Б – пациенты, получавшие таблетки нифедипина с модифицированным высвобождением в дозе 60 мг (табл. 4).

В подгруппе А группы 1 в пробе № 1 у 18-ти пациентов (43% от общего числа) среднее содержание нифедипина в сыворотке крови составило  $32,0 \pm 7,2$  нг/мл. Причем у 12-ти больных (28,5% от общего числа) данный показатель не достигал нижнего уровня терапевтического диапазона (25-150 нг/мл). В пробе № 2 в указанной подгруппе среднее содержание нифедипина было несколько выше и составляло  $51,7 \pm 10,6$  нг/мл.

В подгруппе Б группы 1 в пробе № 1 у 10-ти пациентов (24% от общего числа) концентрация нифедипина в сыво-

ротке крови находилась в пределах терапевтического диапазона и составляла в среднем  $126,4 \pm 27,7$  нг/мл, что статистически значимо превышало аналогичный показатель в подгруппе А ( $p \leq 0,05$ ). В пробе № 2 концентрация нифедипина в крови увеличилась до  $157,6 \pm 35,0$  нг/мл, что в 3 раза превышало аналогичный показатель в подгруппе А ( $p \leq 0,05$ ).

Среди пациентов подгруппы Б группы 1 наблюдалось 3 случая (7% от общего числа), когда концентрация нифедипина в крови была очень высокой как в пробе № 1, так и в пробе № 2. Так, у двух пациентов была существенно превышена верхняя граница терапевтического диапазона, и концентрации нифедипина составила в пробе № 1 180,8 и 271,7 нг/мл, и, соответственно, в пробе № 2 – 213,4 и 338,4 нг/мл. При этом у больных имели место НЛР, выражавшиеся в гиперемии лица и тахикардии. В одном случае развилась выраженная гипотония, потребовавшая проведения неотложных мероприятий и отмены препарата. Ещё у одного пациента концентрация нифедипина в пробе № 1 была близка к верхней границе терапевтического коридора и составила 145,3 нг/мл, а во второй пробе – существенно превысила норму, составив 235,4 нг/мл, при отсутствии НЛР. Кроме того, в данном случае не удалось

Таблица 4

## Распределение пациентов по группам и подгруппам

Группа	1 «нормальная» фармакокинетика		2 «парадоксальная» фармакокинетика	
	А (30 мг)	Б (60 мг)	А (30 мг)	Б (60 мг)
Подгруппа (доза нифедипина)	А (30 мг)	Б (60 мг)	А (30 мг)	Б (60 мг)
Число пациентов (%)	18 (43%)	10 (24%)	10 (24%)	4 (9%)
НЛР, число пациентов (%)	-	3 (7%)	-	-
Всего пациентов в группе (%)	28 (67%)		14 (33%)	
Всего пациентов (%)	42 (100%)			

добиться снижения АД до нормальных значений. В связи с этим был сделан вывод о неэффективности применения нифедипина в данном случае, произведена замена препарата.

К подгруппе А группы 2 можно отнести 10 пациентов (24% от общего числа), у которых концентрация нифедипина в сыворотке крови в пробе № 1 была выше, чем в пробе № 2, и составляла в среднем  $53,2 \pm 13,8$  и  $43,2 \pm 10,5$  нг/мл соответственно ( $p \leq 0,05$ ). К подгруппе Б группы 2 можно отнести 4 пациента (9,5% от общего числа), у которых концентрация препарата в сыворотке крови в пробе № 1 была выше, чем в пробе № 2, и составляла в среднем  $65,4 \pm 16,1$  и  $54,3 \pm 18,3$  нг/мл соответственно ( $p \leq 0,05$ ). Данный факт можно объяснить тем, что скорость абсорбции и время достижения максимальной концентрации в сыворотке крови для нифедипина тесно связаны с временем приёма и качественным составом пищи. Например, приём жирной пищи увеличивает скорость всасывания препарата в кишечнике, а приём таблетки натощак, напротив, замедляет абсорбцию. Кроме того, ЛФ с модифицированным высвобождением обеспечивают поддержание равновесной концентрации нифедипина в течение суток, благодаря чему перед очередным приёмом препарата его уровень в сыворотке крови остаётся в границах терапевтического диапазона [8-9, 20, 25].

Таким образом, при назначении больным с артериальной гипертензией таблеток нифедипина с модифицированным высвобождением в суточной дозе 30 мг наблюдается равномерное всасывание и поддержание равновесной концентрации ЛС в течение суток. Вместе с тем, примерно у трети больных концентрация

препарата не достигала значений терапевтического диапазона. Нормализация АД у этих пациентов, вероятно, достигалась за счёт параллельного назначения гипотензивных препаратов из других групп. Назначение таблеток нифедипина с модифицированным высвобождением в дозе 60 мг приводило к равномерному всасыванию и поддержанию равновесной концентрации ЛС в пределах терапевтического диапазона в течение суток, что может являться подтверждением возможности его эффективного использования в качестве монотерапии. При этом примерно в 7% случаев концентрация ЛС в сыворотке крови существенно превышала верхнее значение терапевтического диапазона, и именно у этих пациентов наблюдались НЛР.

В некоторых случаях достижение равновесной концентрации в границах терапевтического диапазона не позволяет добиться ожидаемого эффекта. В подобных ситуациях следует обратить внимание на интенсивность метаболизма нифедипина до дегидронифедипина. Как указывалось ранее, нифедипин метаболизируется в первую очередь под действием изофермента CYP3A4 при первом прохождении через печень [19]. Удобным инструментом для оценки скорости биотрансформации нифедипина в дегидронифедипин (определения фенотипа по скорости метаболизма) является расчёт метаболического отношения (МО) как частного от деления концентрации нифедипина на концентрацию дегидронифедипина [6]. По полученным экспериментальным данным можно сделать вывод, что МО не зависит от дозы и остаётся постоянным во времени ( $MO \pm 15\%$ ), а также не коррелирует с полом и возрастом пациентов.

Однозначное определение быстрого, медленного или среднестатистического типа метаболизма затруднительно ввиду многообразия факторов, влияющих на биотрансформацию. Сопоставление значений МО и АД показало, что при МО, равном менее двух (концентрация нифедипина превышает концентрацию дегидронифедипина не более чем в 2 раза, т.е. наблюдается интенсивная биотрансформация), практически не удаётся достичь снижения АД до целевых значений (140/90), следовательно, таких пациентов можно отнести к группе «быстрых метаболизаторов». Для данной группы больных рекомендовано увеличение дозы нифедипина, сокращение интервалов между приёмами препарата, либо замена ЛС.

Для пациента 1 количество нифедипина и дегидронифедипина в пробе № 1 (до приёма ЛС) составляло 19,42 и 18,10 нг/мл соответственно (рис. 4а).

В пробе № 2 через 4 ч после приёма ЛС концентрации нифедипина и дегидронифедипина составляли 13,27 и 12,06 нг/мл соответственно (рис. 4б). Значения МО до и после приёма препарата составили 0,74 и 1,10 соответственно, что свидетельствует о быстром метаболизме нифедипина.

При значениях МО более пяти (концентрация нифедипина превышает концентрацию дегидронифедипина более чем в 5 раз, т.е. наблюдается замедленная биотрансформация) в большинстве случаев удаётся достичь снижения АД до целевых значений (140/90). Для данной группы пациентов, относимых к категории «медленных метаболизаторов», важнейшую роль при принятии решения о коррек-

тировке схемы назначения нифедипина играют абсолютные значения концентрации препарата и выраженность побочных явлений.

У пациента 2 количество нифедипина и дегидронифедипина в пробе № 1 до приёма ЛС составляло 131,52 и 22,90 нг/мл соответственно (рис. 5а). В пробе № 2 через 4 ч после приёма ЛС – 122,59 и 22,46 нг/мл соответственно (рис. 5б).

У данного пациента наблюдается достаточно высокое содержание нифедипина, находящееся в интервале терапевтического диапазона и, в то же время, несущественно отличающееся между пробами. Значения МО составили 5,74 – до и 5,46 – после приёма препарата. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что в данном случае у пациента наблюдается медленный метаболизм нифедипина.

При значениях МО от двух до пяти практически всегда наблюдается снижение АД до целевых значений (140/90), данная группа пациентов составляет около 70% от общего числа больных, для которых проводился ТЛМ нифедипина, и данную категорию следует рассматривать как «среднестатистических метаболизаторов».

Следующий пример демонстрирует случай среднестатистического метаболизма. Пациент 3: количество нифедипина и дегидронифедипина в пробе № 1 (до приёма ЛС) составляло 64,24 и 13,48 нг/мл соответственно (рис. 6а). В пробе № 2 через 4 ч после приёма ЛС – 66,03 и 13,91 нг/мл соответственно (рис. 6б). Значения МО до и после приёма препарата составили 4,76 и 4,75 соответственно.



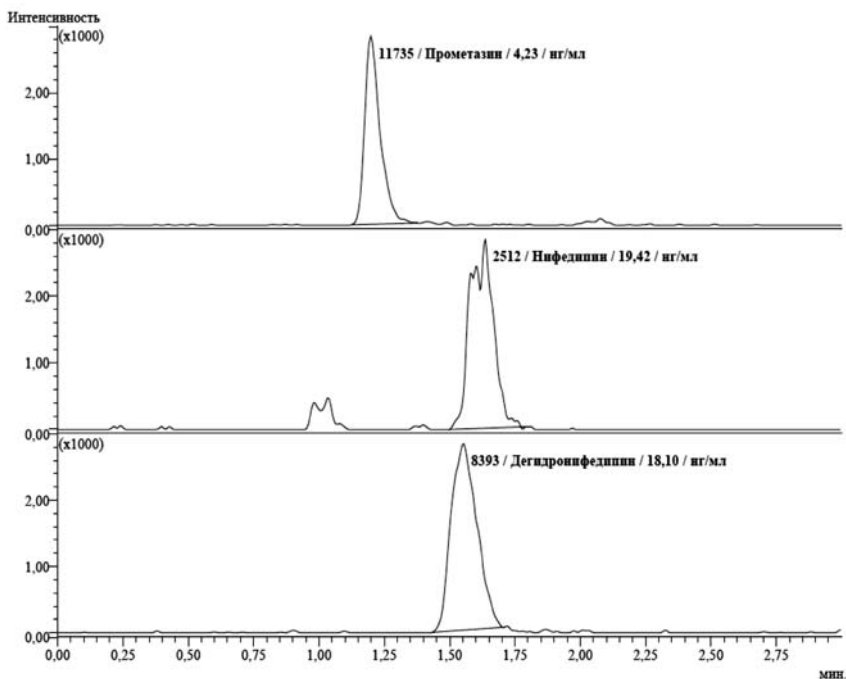


Рис. 4а. Хроматограмма пробы № 1 (до приёма ЛС) сыворотки крови пациента 1.

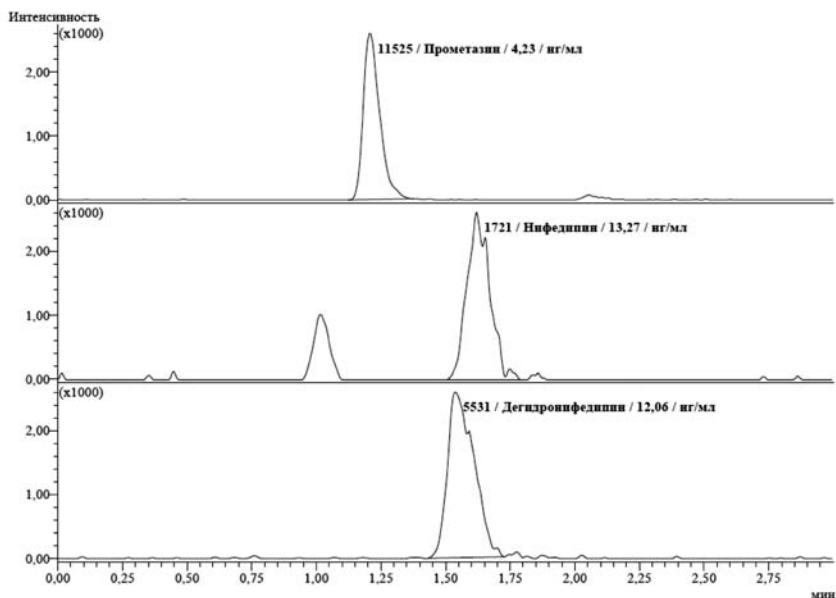


Рис. 4б. Хроматограмма пробы № 2 (после приёма ЛС) сыворотки крови пациента 1.

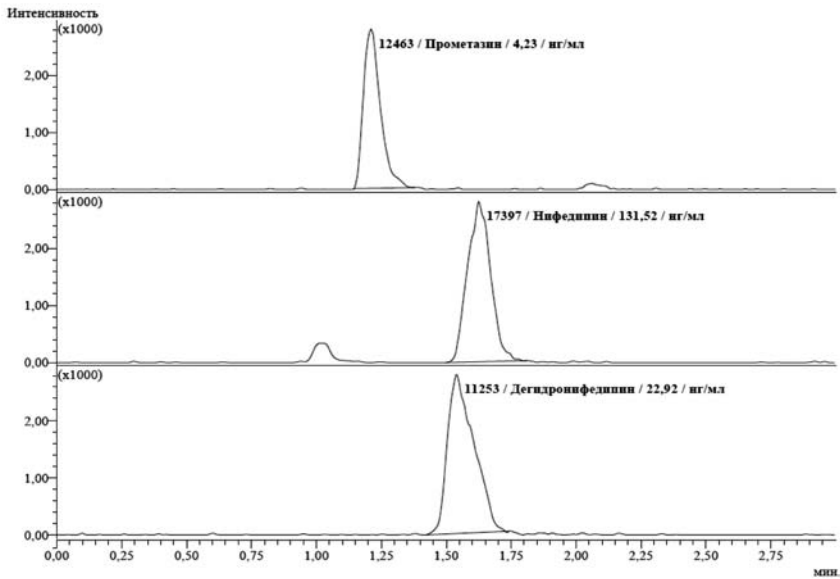


Рис. 5а. Хроматограмма пробы № 1 (до приёма ЛС) сыворотки крови пациента 2.

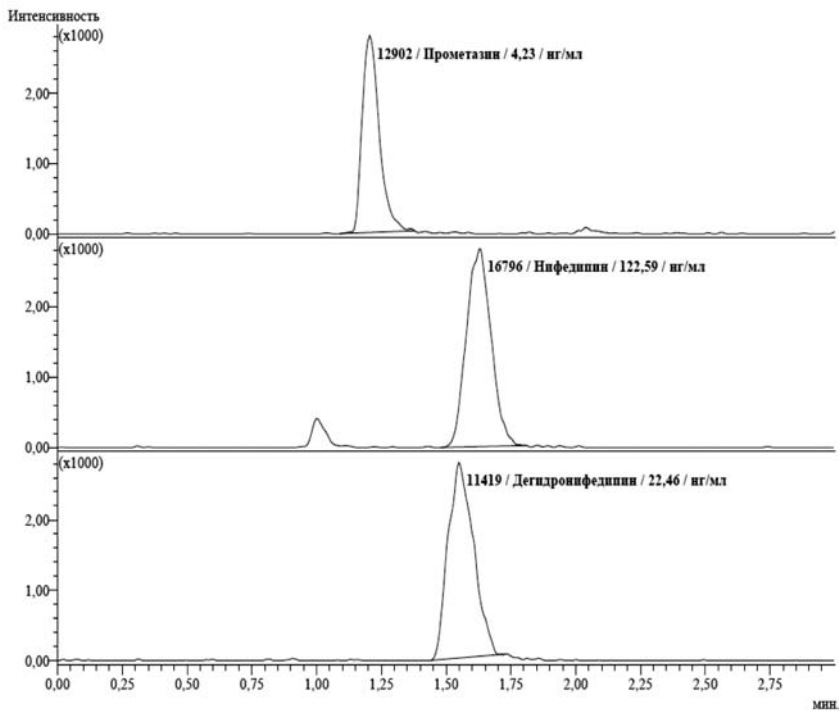


Рис. 5б. Хроматограмма пробы № 2 (после приёма ЛС) сыворотки крови пациента 2.

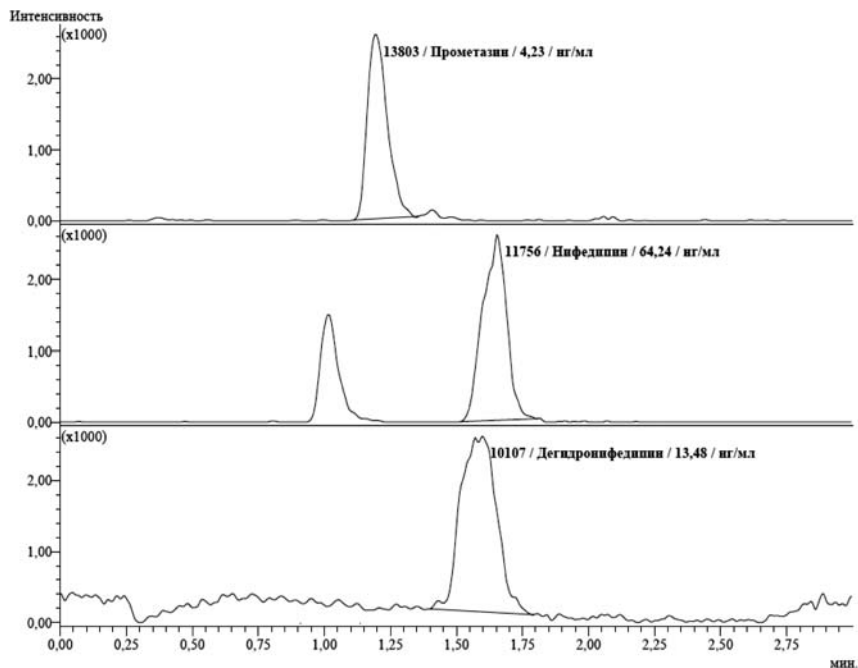


Рис. ба. Хроматограмма пробы № 1 (до приёма ЛС) сыворотки крови пациента 3.

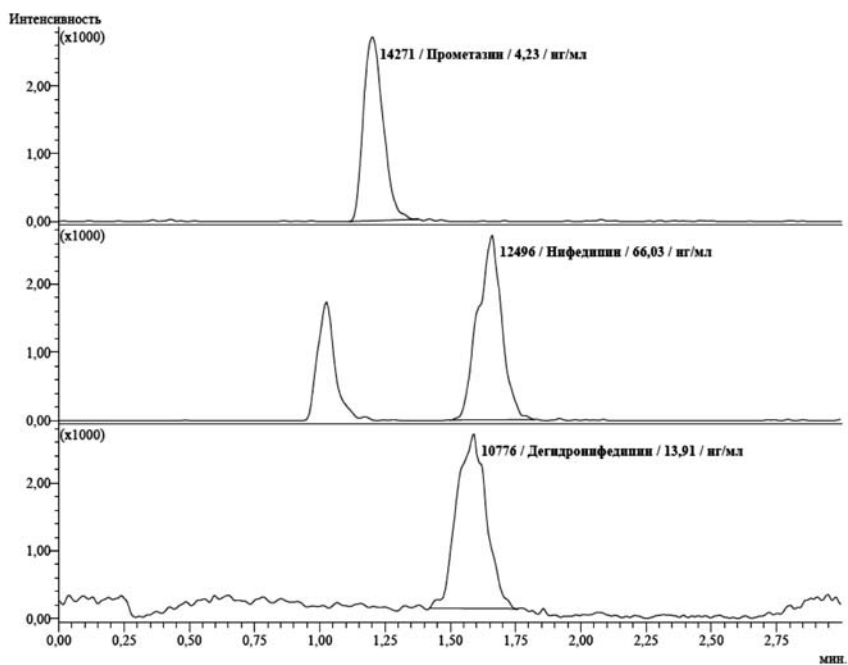


Рис. бб. Хроматограмма пробы № 2 (после приёма ЛС) сыворотки крови пациента 3.

## Выводы

Таким образом, разработана и валидирована методика определения нифедипина и дегидронифедипина в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В ходе исследования с участием 42-х пациентов, принимавших нифедипин в форме таблеток с модифицированным высвобождением, была продемонстрирована пригодность разработанной методики для проведения терапевтического лекарственного мониторинга нифедипина. Обобщение полученных результатов показало, что при применении формы с модифицированным высвобождением оно целесообразно как при назначении дозы 30 мг (для выявления пациентов, которым требуется повышение дозы препарата для достижения необходимого терапевтического эффекта), так и при назначении доз 60 и 90 мг с целью выявления пациентов, имеющих высокую склонность к развитию НЛР. Кроме того, разработанная методика позволяет проводить одновременное определение нифедипина и дегидронифедипина в сыворотке крови, благодаря чему появляется возможность определить фенотип каждого пациента по скорости метаболизма нифедипина и скорректировать дозировку и кратность приёма препарата в зависимости от интенсивности биотрансформации.

## Список литературы

1. *Баймеева Н.В., Красных Л.М., Мирошниченко И.И.* Мониторинг концентрации клозапина и норклозапина при терапии шизофрении // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* – 2016. – № 4. – С. 53-57.
2. *Белова М.В., Ильяшенко К.К.* Острые отравления препаратами, действующими преимущественно на сердечно-сосудистую систему // *Токсикологический вестник.* – 2016. – Т. 140. – № 5. – С. 31-35.
3. *Кардиология: национальное руководство* / Под ред. Ю.Н. Беленкова, Р.Г. Оганова. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2007. – 1232 с.
4. *Красных Л.М., Платова А.И., Баймеева Н.В., Василенко Г.Ф.* Определение содержания клозапина и норклозапина в плазме крови методом тандемной масс-спектрометрии // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* – 2014. – № 1. – С. 27-31.
5. *Руководство по экспертизе лекарственных средств* / Под ред. проф. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. – 2013. – Т. 1. – 328 с.
6. *Смирнов В.В., Егоренков Е.А., Красных Л.М., Василенко Г.Ф., Раменская Г.В.* Определение активности ферментов метаболизма лекарственных средств – перспектива использования в клинической практике // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* – 2016. – № 4. – С. 28-32.
7. *Baselt R.C.* Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 9 edn. Seal Beach: Biomedical Publications. – 2011.
8. *Bortel L., et al.* Total and free steady-state plasma levels and pharmacokinetics of nifedipine in patients with terminal renal failure // *Eur. J. of Clinical pharmacology.* – 1989. – Т. 37. – No. 2. – Pp. 185-189.
9. *Breimer D.D., Schellens J.H.M., P.A.* Nifedipine: variability in its kinetics and metabolism in man // *Pharmacology & therapeutics.* – 1989. – Т. 44. – No. 3. – Pp. 445-454.
10. *Dias E., et al.* An LC-MS assay for the screening of cardiovascular medications in human samples // *J. of Chromatography B.* – 2013. – Т. 937. – Pp. 44-53.
11. *Gonzalez O., et al.* Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy // *J. of Chromatography B.* – 2011. – Т. 879. – No. 3. – Pp. 243-252.

12. **Grigoriev A., et al.** Development of a HPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of nifedipine and lidocaine in human plasma // *J. of Pharmaceutical and biomedical analysis.* – 2016. – Т. 131. – Pp. 13-19.
13. **Kallem R.R., et al.** Sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous determination of nifedipine and atenolol in human plasma and its application to a human pharmacokinetic study // *Biomedical Chromatography.* – 2013. – Т. 27. – No. 3. – Pp. 349-355.
14. **Kirsten R., Nelson K., Kirsten D., Heintz B.** Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part I // *Clin. Pharmacokinet.* – 1998. – Т. 34. – Pp. 457-482.
15. **Mancia G., et al.** ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) // *Eur. Heart J.* – 2013. – Т. 34. – No. 28. – Pp. 2159-2219.
16. **Meredith P.A., Elliott H.L.** A review of the gastrointestinal therapeutic system (GITS) formulation and its effectiveness in the delivery of antihypertensive drug treatment (focus on nifedipine GITS) // *Integrated blood pressure control.* – 2013. – Т. 6. – Pp. 79-87.
17. **Pietta P., Rava A., Biondi P.** High-performance liquid chromatography of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products // *J. of Chromatography A.* – 1981. – Т. 210. – No. 3. – Pp. 516-521.
18. **Poole-Wilson P.A., et al.** Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with stable angina requiring treatment (ACTION trial): randomised controlled trial // *The Lancet.* – 2004. – Т. 364. – No. 9437. – Pp. 849-857.
19. **Raemsch K.D., Sommer J.** Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine // *Hypertension.* – 1983. – Т. 5. – No. 4. – Part 2. – P. 1118.
20. **Rashid T.J., et al.** Factors affecting the absolute bioavailability of nifedipine // *Br. J. of Clinical pharmacology.* – 1995. – Т. 40. – No. 1. – Pp. 51-58.
21. **Toal C.B., et al.** Nifedipine gastrointestinal therapeutic system (GITS) for hypertensive patients in a primary care setting: results of the Extended Release Adalat Canadian Trial (EXACT) // *Clinical therapeutics.* – 1997. – Т. 19. – No. 5. – Pp. 924-935.
22. **Toal C.B.** Formulation dependent pharmacokinetics – does the dosage form matter for nifedipine? // *J. of Cardiovascular pharmacology.* – 2004. – Т. 44. – No. 1. – Pp. 82-86.
23. **Van der Nagel B.C.H., et al.** High-throughput quantification of 8 antihypertensive drugs and active metabolites in human plasma using UPLC–MS/MS // *J. of Chromatography B.* – 2017. – Т. 1060. – Pp. 367-373.
24. **Wang D., et al.** Determination of nifedipine in human plasma by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study // *J. of Chromatography B.* – 2011. – Т. 879. – No. 20. – Pp. 1827-1832.
25. **Zhou S.F.** Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4 // *Current drug metabolism.* – 2008. – Т. 9. – No. 4. – Pp. 310-322.

## References

1. **Bajmeeva N.V., Krasnyh L.M., Miroshnichenko I.I.** Monitoring koncentracii klozapina i norklozapina pri terapii shizofrenii [Monitoring of concentration of clozapine and norklozapine at therapy of schizophrenia]. *Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya* [Sheets of Scientific center of expertise of means for medical application]. 2016. No. 4. Pp. 53-57. (In Russian).
2. **Belova M.V., Il'jashenko K.K.** Ostrye otravlenija preparatami, dejstvujushhimi preimushhestvenno na serdechno-sosudistuju sistemu [Acute poisoning with drugs operating mainly on cardiovascular system]. *Toksikologicheskij vestnik* [The toxicological messenger]. 2016. T. 140. No. 5. Pp. 31-35. (In Russian).

3. Kardiologija: nacional'noe rukovodstvo [Cardiology: national leadership]. Pod red. Ju.N. Belenkova, R.G. Oganova [Edited by Yu.N. Belenkov, R.G. Oganov]. Moscow: GJEOTAR-Media. 2007. 1232 p. (In Russian).
4. **Krasnyh L.M., Platova A.I., Bajmeeva N.V., Vasilenko G.F.** Opredelenie sodержaniya klozapina i norklozapina v plazme krovi metodom tandemnoj mass-spektrometrii [Determination of the content of clozapine and norklozapine in blood plasma by the method of tandem mass spectrometry]. Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija [Sheets of Scientific center of expertise of means for medical application]. 2014. No. 1. Pp. 27-31. (In Russian).
5. Rukovodstvo po jekspertize lekarstvennyh sredstv [The guide to examination of pharmaceuticals]. Pod red. prof. A.N. Mironova [Edited by prof. A.N. Mironov]. Moscow: Grif i K. 2013. T. 1. 328 p. (In Russian).
6. **Smirnov V.V., Egorenkov E.A., Krasnyh L.M., Vasilenko G.F., Ramenskaja G.V.** Opredelenie aktivnosti fermentov metabolizma lekarstvennyh sredstv – perspektiva ispol'zovanija v klinicheskoj praktike [Determination of the activity of enzymes of drug metabolism – the prospect of use in clinical practice]. Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija [Sheets of Scientific center of expertise of means for medical application]. 2016. No. 4. Pp. 28-32. (In Russian).
7. **Baselt R.C.** Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 9 edn. Seal Beach: Biomedical Publications. 2011.
8. **Bortel L., et al.** Total and free steady-state plasma levels and pharmacokinetics of nifedipine in patients with terminal renal failure. Eur. J. of Clinical pharmacology. 1989. T. 37. No. 2. Pp. 185-189.
9. **Breimer D.D., Schellens J.H.M., Soons P.A.** Nifedipine: variability in its kinetics and metabolism in man. Pharmacology & therapeutics. 1989. T. 44. No. 3. Pp. 445-454.
10. **Dias E., et al.** An LC-MS assay for the screening of cardiovascular medications in human samples. J. of Chromatography B. 2013. T. 937. Pp. 44-53.
11. **Gonzalez O., et al.** Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. J. of Chromatography B. 2011. T. 879. No. 3. Pp. 243-252.
12. **Grigoriev A., et al.** Development of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of nifedipine and lidocaine in human plasma. J. of Pharmaceutical and biomedical analysis. 2016. T. 131. Pp. 13-19.
13. **Kallem R.R., et al.** Sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous determination of nifedipine and atenolol in human plasma and its application to a human pharmacokinetic study. Biomedical Chromatography. 2013. T. 27. No. 3. Pp. 349-355.
14. **Kirsten R., Nelson K., Kirsten D., Heintz B.** Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part I // Clin. Pharmacokinet. 1998. T. 34. Pp. 457-482.
15. **Mancia G., et al.** ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Eur. Heart J. 2013. T. 34. No. 28. Pp. 2159-2219.
16. **Meredith P.A., Elliott H.L.** A review of the gastrointestinal therapeutic system (GITS) formulation and its effectiveness in the delivery of antihypertensive drug treatment (focus on nifedipine GITS). Integrated blood pressure control. 2013. T. 6. Pp. 79-87.
17. **Pietta P., Rava A., Biondi P.** High-performance liquid chromatography of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products. J. of Chromatography A. 1981. T. 210. No. 3. Pp. 516-521.
18. **Poole-Wilson P.A., et al.** Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with stable angina requiring treatment (ACTION trial):

- randomised controlled trial. *The Lancet*. 2004. T. 364. No. 9437. Pp. 849-857.
19. **Raemsch K.D., Sommer J.** Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine. *Hypertension*. 1983. T. 5. No. 4. Part 2. P. 1118.
20. **Rashid T.J., et al.** Factors affecting the absolute bioavailability of nifedipine. *Br. J. of Clinical pharmacology*. 1995. T. 40. No. 1. Pp. 51-58.
21. **Toal C.B., et al.** Nifedipine gastrointestinal therapeutic system (GITS) for hypertensive patients in a primary care setting: results of the Extended Release Adalat Canadian Trial (EXACT). *Clinical therapeutics*. 1997. T. 19. No. 5. Pp. 924-935.
22. **Toal C.B.** Formulation dependent pharmacokinetics – does the dosage form matter for nifedipine? *J. of Cardiovascular pharmacology*. 2004. T. 44. No. 1. Pp. 82-86.
23. **Van der Nagel B.C.H., et al.** High-throughput quantification of 8 antihypertensive drugs and active metabolites in human plasma using UPLC–MS/MS. *J. of Chromatography B*. 2017. T. 1060. Pp. 367-373.
24. **Wang D., et al.** Determination of nifedipine in human plasma by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. of Chromatography B*. 2011. T. 879. No. 20. Pp. 1827-1832.
25. **Zhou S.F.** Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Current drug metabolism*. 2008. T. 9. No. 4. Pp. 310-322.

## Therapeutic drug monitoring of nifedipine by HPLC-MS/MS in treatment of arterial hypertension

T.A. Rodina, E.S. Melnikov, S.A. Belkov, A.A. Danko, A.V. Sokolov,  
A.B. Prokofiev

The method for the determination of nifedipine and dehydronifedipine in human serum for therapeutic drug monitoring in patients with arterial hypertension using HPLC-MS/MS was developed and validated. The study involved 42 patients taking nifedipine in the form of modified-release tablets. It has been shown that therapeutic drug monitoring of nifedipine is advisable to be performed both when administering dose of 30 mg (to identify patients needing to increase the dose of the drug to achieve the desired therapeutic effect), and when administering doses of 60 mg and 90 mg to identify patients with a high tendency to the development of side-effects. Simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human serum allows to determine the phenotype of each patient according to the rate of nifedipine metabolism and to adjust the dose and the frequency of taking the drug depending on the intensity of biotransformation.

**Key words:** nifedipine, dehydronifedipine, HPLC-MS/MS, arterial hypertension, therapeutic drug monitoring.



## Особенности адаптации светлогорских мини-свиней к физическим нагрузкам

Н.В. Станкова, М.А. Савина, Г.Д. Капанадзе

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

Контактная информация: к.б.н. Станкова Наталья Владимировна, [sinayva@yandex.ru](mailto:sinayva@yandex.ru)

Проанализированы особенности адаптации светлогорских мини-свиней разных линий и пола к физической нагрузке (бег на тредбане). Отработана и описана методика приучения животных к бегу и работе с людьми. Выявлено процентное соотношение легко обучающихся и не поддающихся обучению животных. Описаны различия между этими животными. Получены животные желательного типа для закладки новой специализированной линии.

**Ключевые слова:** светлогорские мини-свиньи, лабораторные животные, биомодели, стресс, адаптация, физические нагрузки.

### Введение

Адаптация – это процесс приспособления организма к внешней среде. Спортивная тренировка основана на принципе адаптации, т.е. на способности живого организма приспосабливаться к различным условиям. С позиции теории функциональных систем сущность адаптации к физическим нагрузкам заключается в следующем. При поступлении сигнала о предстоящем выполнении физической нагрузки в организме формируется специфическая функциональная система, обеспечивающая данную двигательную реакцию. В ответ на действие сигнала возникает возбуждение соответствующих моторных и вегетативных центров, активация функции эндокринных желез, что приводит

к мобилизации скелетной мускулатуры, непосредственно осуществляющей данную двигательную реакцию, а также органов кровообращения и дыхания, обеспечивающих энергией работающие мышцы. Важным практическим результатом и показателем адаптации является повышение работоспособности. Физическая работоспособность означает потенциальную способность выполнять максимум механической работы. Уровень физической работоспособности животных весьма индивидуален и зависит от многих факторов: порода, пол, возраст, состояние здоровья, двигательная активность и др. Адаптация к физическим нагрузкам у животных определяется некоторыми генетически обусловленными нейродинамически-



ми и психодинамическими свойствами [1, 4, 6]. Для проведения исследований влияния различных препаратов на работоспособность лабораторных животных требуются обученные животные, на которых возможно моделировать тренировочный процесс подобно спортсменам. Такие исследования в основном проводятся на крысах (тредбан, плавание и др. тесты). На крупных лабораторных животных такие исследования проводить достаточно сложно из-за больших затрат на содержание и трудоемкости процесса тренировки и эксперимента [2, 3]. В лаборатории спортивной биомедицины нашего Центра успешно используются светлогорские мини-свиньи в исследованиях работоспособности, когда животные получают физическую нагрузку во время бега на беговой дорожке. В такие эксперименты отбираются обученные животные, адекватно реагирующие на исследователей и беговую дорожку. В лаборатории такие работы осложнены, с одной стороны, малым

количеством однотипных животных (возраст, живая масса, пол) в условиях ограниченного помещения для содержания и, с другой стороны, способностью животных к обучению, адаптации к физической нагрузке. Известно, что животные, как и люди, в разной степени реагируют на изменения условий внешней среды (стрессовые факторы). Это связано с особенностями высшей нервной деятельности (ВНД) животных, которая, в свою очередь, обусловлена генетически. Поэтому **целью** нашей работы было проанализировать молодых животных разных линий и пола, выявить не способных адаптироваться к физическим нагрузкам.

### Материалы и методы

Исследовали всего 44 животных, из них хрячков – 26 (живая масса  $7,42 \pm 1,65$  кг) и свинок – 18 (живая масса  $8,38 \pm 2,72$  кг), в возрасте 3,5-4,5 мес. всех линий. Животные содержались в оборудованном виварии с соблюдени-

Таблица 1

Схема тренировок мини-свиней на беговой дорожке

День эксперимента	Скорость, км/ч	Время, мин
1	0	3
2	до 3	3
3	до 4	3
4	до 4	6
5	до 4	9
6	до 5	9
7	до 5	11
8	до 5	14
9	до 5	16
10	до 5	21
11	до 5	21
12	до 5	21
13	до 5	21
14	до 5	21
15	до 5	21

ем всех норм кормления и содержания для мини-свиней. Для бега использовали три беговых дорожки Torgue T-203. Для обучения животных использовали постепенное увеличение нагрузки, дистанционный метод тренировки и принцип положительного подкрепления, электростимуляцию не применяли. Животных приучали к тредбану в течение 15-ти дней по следующей схеме. Первый раз животным показывали тредбан, ставили на него и на нем кормили, вырабатывая условный рефлекс. Во второй день животных ставили на беговую дорожку, запускали на 3 мин со скоростью до 3 км/ч, а потом кормили (поощряли, подкрепляли рефлекс). С каждым днем увеличивали время бега на тредбане и скорость, до 5 км/ч в течение 15-20 мин. Наблюдали за поведением, характером движений, потреблением корма, измеряли частоту пульса (ЧСС), составляли протокол наблюдений.

### Результаты и их обсуждение

В основе эволюции лежит генотипическая адаптация, которая является процессом приспособления популяций (совокупности особей одного вида) к условиям внешней среды с помощью наследственных изменений и природного отбора и происходит на протяжении нескольких поколений [6]. Предками светлогорских мини-свиней были представители 4-х разных пород: ландрас, дикий кабан, вьетнамская вислобрюхая, геттенгенская мини-свинья. Очевидно, что ландрас, вьетнамская и геттенгенская мини-свиньи не имели особых физических нагрузок в процессе своей жизнедеятельности, т.е. для них был характерен низкий уровень

работоспособности. Эти породы были искусственно выведены человеком с разными целями: ландрас и вьетнамская – получение мясной продукции, геттенгенская мини-свинья – для лабораторных исследований. И только кабаны (европейский и среднеазиатский подтипы) имели постоянную возможность двигаться в естественной среде обитания в поисках пищи и укрытия от врагов или во время драк, имели хорошую выносливость и резистентность. Светлогорские мини-свиньи более 30-ти лет не имели прилития дикой крови, тем не менее, сохранили гены дикого кабана и способны к длительному бегу и высоким прыжкам [7-10]. Именно такие животные с успехом используются для проведения исследований по работоспособности.

В первый день наблюдения, согласно схеме, животные знакомились с беговой дорожкой, спокойно принимали корм в новой обстановке. Из 44-х особей пятеро отказались от пищи, вели себя беспокойно.

Во второй день эксперимента животные бежали на тредбане, некоторые с осторожностью и неуверенно, некоторые – равномерно, а некоторые – очень энергично, пытались даже спрыгнуть. Характер движения фиксировали в протоколе наблюдения по следующим критериям: «+» – бежали без остановок; «+/-» – двигались с осторожностью, напряженно, иногда останавливались; «->» – вообще не двигались, упирались, садились, пытались убежать. После бега некоторые животные отказывались принимать пищу. Семь животных изначально не пошли по беговой дорожке, упирались (садились), переворачивались (рис. 1).



Рис. 1. Хрячок отказывается от бега по движущемуся полотну тредбана (скорость – 2,5 км/ч), упирается, садится.

На третий день животные, которые хорошо справились с обучением в первый день (рис. 2), переходили на следующий этап обучения согласно схеме (скорость – до 4 км/ч, время бега – 3 мин). А животным, которые удовлетворительно двигались в первый день, давали ту же нагрузку, т.е. повторяли 2-й день тренировки. На данном этапе трое животных вообще не двигались по дорожке.

В последующие дни животным постепенно добавляли нагрузку и оценивали характер движений. Животным, которые удовлетворительно («+/-») двигались в течение эксперимента, давали аналогичную нагрузку, т.е. повто-

ряли предыдущий день тренировки. К 10-му дню тренировок 8 хрячков и 1 свинка были способны держать скорость до 5 км/ч в течение 20 мин. Бежали легко, равномерно, но некоторые были слишком возбуждены и пытались выпрыгнуть (перегоняли дорожку). К 11-му дню задачу выполняли 20 хрячков и 7 свинок, к 12-му дню – 22 хрячка и 9 свинок. Дальнейшие тренировки по схеме проводились до 15-го дня с целью поддержания формы и не предусматривали увеличения нагрузки. Повторные стандартные нагрузки вызывают у животных все меньший тренировочный эффект и вскоре начинают способство-



Рис. 2. Хрячок равномерно бежит на тредбана, скорость – 5 км/ч.

вать только сохранению ранее достигнутого состояния. Таким образом, мы получили животных, подготовленных к исследованиям работоспособности.

Из 26-ти хрячков, участвовавших в эксперименте, 22 хорошо адаптировались к физической нагрузке, 4 не смогли адаптироваться. Из 18-ти свинок адаптировались только 9. Можно предположить, что у хрячков адаптация закреплена генетически лучше. Хрячки, которые хорошо бежали, имели живую массу в среднем на 1,58 кг меньше, чем хрячки, не способные к бегу. Свинки, показавшие хороший результат, были в среднем на 2,71 кг меньше, чем свинки, не способные к бегу. В данном исследовании были изучены мини-свиньи четырех линий. Обнаружено, что наименее способными к физической нагрузке оказались животные линии Ст (табл. 2).

В результате проведенных исследований выявлены животные желательного типа, с устойчивыми характеристиками ВНД, для разведения и закладки новой специализированной линии, адаптированной к физическим нагрузкам, т.к. животные, способные адаптироваться к стрессу, имеют более крепкое здоровье и меньше подвержены заболеваниям. Намечена дальнейшая работа по изуче-

нию ВНД светлогорских мини-свиней на основе наблюдений за поведением животных во время стресса.

### Выводы

1. Светлогорские мини-свиньи быстро адаптируются к физическим нагрузкам в тесте на тредбане при постепенном увеличении нагрузки и поощрении в виде корма.

2. Оптимальный возраст приучения – 3,5-4,5 мес., когда животные имеют живую массу 7-9 кг.

3. Установлено, что хрячки адаптируются лучше, чем свинки: адаптацию не смогли пройти 15,4% хрячков и 50% свинок от числа всех исследованных животных.

4. Животные, не способные к бегу, имели живую массу в среднем на 1,58 и 2,71 кг больше для хрячков и свинок соответственно, чем их сверстники.

5. Отобраны животные желательного типа для закладки новой линии, данные критерии оценки рекомендуется использовать для выбраковки животных.

6. Требуются дальнейшие исследования поведения и ВНД светлогорских мини-свиней по линиям с использованием других поведенческих тестов.

Таблица 2  
Количество животных, получивших оценки «+» и «-» по линиям, гол.

Линия	Хряки		Свинки	
	«+»	«-»	«+»	«-»
Ст	1	3	0	4
С8	9	1	6	0
С22	8	0	2	1
С3	4	0	1	4

### Список литературы

1. *Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А.* Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов-на-Дону: Ростовский ун-т. – 1977. – 109 с.
2. *Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В.* Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 72-74.
3. *Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Станкова Н.В., Ревакин А.О., Матвейенко Е.Л., Костогрызова Р.Г., Люблинский С.Л., Колышев И.Ю., Берзин И.А.* Оценка эффективности рецептуры «МиоАктив-Спорт» в модельных условиях высоких физических нагрузок // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 70-75.
4. *Павлов С.Е., Кузнецова Т.Н.* Адаптация и стресс в спорте // В сб.: «Актуальные вопросы медицинской реабилитации в современных условиях». – М., 1999. – С. 307-312.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. – 2010. – 358 с.
6. *Сапин М.Р.* Анатомия (с основами спортивной морфологии). – М.: Медицина. – 2003. – С. 384-395.
7. *Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д.* Оптимизация светлогорских мини-свиней для биомедицинских исследований // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 33-49.
8. *Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д.* Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции // Биомедицина. – 2012. – № 1. – С. 49-53.
9. *Станкова Н.В., Савина М.А., Капанадзе Г.Д.* Формирование новых линий светлогорских мини-свиней // Биомедицина. – 2017. – № 3. – С. 95-101.

10. *Тихонов В.Н.* Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование. – Новосибирск. СО РАН. – 2010. – 304 с.

### References

1. *Garkavi L.H., Kvakina E.B., Ukolova M.A.* Adaptacionnyye reakcii i rezistentnost organizma [Adaptive response and resistance of organism]. Rostov-on-Don: Rostov University. 1977. 109 p. (In Russian).
2. *Karkischenko V.N., Kapanadze G.D., Den`gina S.E., Stankova N.V.* Razrabotka metodiki ocenki fizicheskoj vynoslivosti melkih laboratornyh zivotnyh dlya izucheniya adaptogennoj aktivnosti nekotoryh lekarstvennyh preparatov [Working out of a technique for physical endurance of small laboratory animals for studying of different medicine]. Biomedicine. 2011. No. 1. Pp. 72-74. (In Russian).
3. *Karkischenko V.N., Kapanadze G.D., Stankova N.V., Revyakin A.O., Matveyenko E.L., Kostogryzova R.G., Lyublinskiy S.L., Kolyshev I. Yu., Berzin I.A.* Ocenka jeffektivnosti receptury «MioAktiv-Sport» v model'nyh uslovijah vysokih fizicheskikh nagruzok [Assessment of efficiency composition "MioActive-Sport" in modeling conditions of high physical activities]. Biomedicine. 2012. No. 4. Pp. 70-75. (In Russian).
4. *Pavlov S.E., Kuznetsova T.N.* Adaptaciya i stress v sporte [Adaptation and stress in sports]. In the collection "Actual problems of medical rehabilitation in modern conditions". Moscow. 1999. Pp. 307-312. (In Russian).
5. *Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskih issledovaniyah* [The guide to laboratory animals and the alternate models in biomedical researches]. Pod red. N.N. Karkischenko, S.V. Gracheva [Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev]. Moscow: Profil-2S. 2010. 358 p. (In Russian).

6. *Sapin M.R.* Anatomiya (s osnovami sportivnoy morfologii) [Anatomy (the basics of sports morphology)]. Moscow: Medicina. 2003. Pp. 384-395. (In Russian).
7. *Stankova N.V., Kapanadze G.D.* Optimizatsiya svetlogorskih mini-sviney dlya biomeditsinskih issledovaniy [Optimization of Svetlogorsk population of mini-pigs for biomedical researchers]. Biomedicine. 2010. No. 5. Pp. 33-49. (In Russian).
8. *Stankova N.V., Kapanadze G.D.* Selekcionno-geneticheskaya i eksperimentalnaya rabota s mini-svin'yami svetlogorskoj populyatsii [Selection, genetic and experimental work with mini-pigs of Svetlogorsk population]. Biomedicine. 2012. No. 1. Pp. 49-53. (In Russian).
9. *Stankova N.V., Savina M.A., Kapanadze G.D.* Formirovanie novykh liniy svetlogorskih mini-sviney [The formation of new lines of Svetlogorsk mini-pigs]. Biomedicine. 2017. No. 3. Pp. 95-101. (In Russian).
10. *Tikhonov V.N.* Laboratornye mini-svin'i: genetika i mediko-biologicheskoe ispolzovanie [Laboratory mini-pigs: genetics and biomedical use]. Novosibirsk. Siberian Branch of RAS. 2010. 304 p. (In Russian).

## Features of adaptation of the Svetlogorsk mini-pigs to exercise stresses

N.V. Stankova, M.A. Savina, G.D. Kapanadze

Features of adaptation of the Svetlogorsk mini-pigs of different lines and sex to an exercise stress are analyzed (running on a treadmill). The technique of training of animals to run and work with people is fulfilled and described. The percentage of easily trained and non-learning animals is revealed. Differences between these animals are described. Animals of desirable type for laying of the new specialized line are obtained.

**Key words:** Svetlogorsk mini-pigs, laboratory animals, biomodels, stress, adaptation, exercise stresses.



## Оценка приживаемости и безопасности применения оссеоинтегрированных чрескожных имплантатов из разных сплавов

А.А. Еманов, М.В. Стогов, В.П. Кузнецов, Е.В. Осипова, Н.В. Тушина, Е.А. Кирева, И.В. Шипицына, А.В. Губин

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

Контактная информация: к.в.н. Еманов Андрей Александрович, [A\\_Eman@list.ru](mailto:A_Eman@list.ru)

В работе проведена оценка приживаемости и безопасности оригинального чрескожного имплантата для культы трубчатой кости, выполненного из разных сплавов. Экспериментальное исследование проведено на кроликах-самцах породы шиншилла. Животным первой группы имплантировали изделие из нержавеющей стали (марка EOS PH1), во второй группе имплантат был изготовлен из титанового сплава (марка Ti6Al4V). Оба имплантата выполнены по аддитивной технологии селективного лазерного сплавления методом послойного сплавления образцов. Срок наблюдения животных составил 90 дней после имплантации. Обнаружено, что у животных первой группы в течение эксперимента наблюдалось два случая выпадения имплантата, во второй группе таких случаев зафиксировано не было. В первой группе отмечен один случай гибели животного, а также три случая хронического воспаления возле имплантата. С одинаковой частотой у животных обеих групп отмечен рост активности трансаминаз и увеличение уровня С-реактивного белка. Результаты проведенного исследования показали, что приживаемость и безопасность чрескожного имплантата из титанового сплава были выше относительно изделия, выполненного из нержавеющей стали.

**Ключевые слова:** чрескожный имплантат, оссеоинтеграция, приживаемость, безопасность.

### Введение

Использование оссеоинтегрированных чрескожных имплантатов с целью протезирования культей конечностей является достаточной новой и активно развивающейся технологией [2]. Фундаментальное и клиническое обоснование применения такой технологии в настоящее время активно разрабатывается [3-6]. Случаи использования данной технологии в отечественной медицине

единичны [1], т.к. существенным ограничением ее использования является отсутствие доступных имплантатов.

Авторами разработан оригинальный чрескожный имплантат для культы трубчатой кости (Патент № 152558 РФ, МПК А61F 2/28. Имплантат культы трубчатой кости / Кузнецов В.П., Губин А.В., Корюков А.А., Горгоц В.Г. – 2014142216/14; заявл. 20.10.2014; опубл. 10.06.2015, бюлл. № 16), экспериментальная до-

клиническая оценка приживаемости и безопасности данного имплантата, выполненного из разных сплавов, и была **целью** данного исследования.

### Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 20-ти кроликах-самцах породы шиншилла в возрасте 6-10 мес. средней массой  $3,4 \pm 0,2$  кг. Животные получены из питомника ОАО «Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий “Синтез”» (Курган). Микробиологический статус – конвенциональные животные.

В ходе исследования животные содержались в виварии ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России. Кроликов содержали в клетках без полок, по одному животному. Все клетки были оборудованы емкостями для корма и воды. В качестве подстила использовали опилки нехвойных пород деревьев. Клетки подвергали ежедневной влажной уборке. Корм выдавался животным один раз в день, чистая стерильная питьевая вода – без ограничений. До начала эксперимента все животные выдерживались в карантине в течение 21 суток.

Содержание животных регламентировалось СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»; ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур»; ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

При планировании исследования ориентировались на ГОСТ Р ИСО 10993-1-2011 «Национальный стандарт РФ. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования» и ГОСТ Р ИСО 10993-6-2011 «Национальный стандарт РФ. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации».

До начала исследования было получено одобрение локального этического комитета. Исследование проведено при соблюдении принципов гуманного обращения с лабораторными животными в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей, и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Всем животным под общим наркозом проводили ампутацию голени на границе верхней трети. Далее рассверливали костно-мозговой канал до 4-4,5 мм, вкручивали имплантат (рис. В) в культю большеберцовой кости диаметром 4,5-5 мм (в зависимости от диаметра канала) и прикрепляли аббатмент (рис. А). Далее фиксировали сегмент аппаратом Илизарова, состоящим из двух опор. Для этого проводили перекрест спиц через проксимальный метаэпифиз большеберцовой кости и дистальную часть аббатмента, дистальные спицы были с упорной площадкой (рис. Б). Аппарат Илизарова демонтировали через 6 недель (рис. Г).



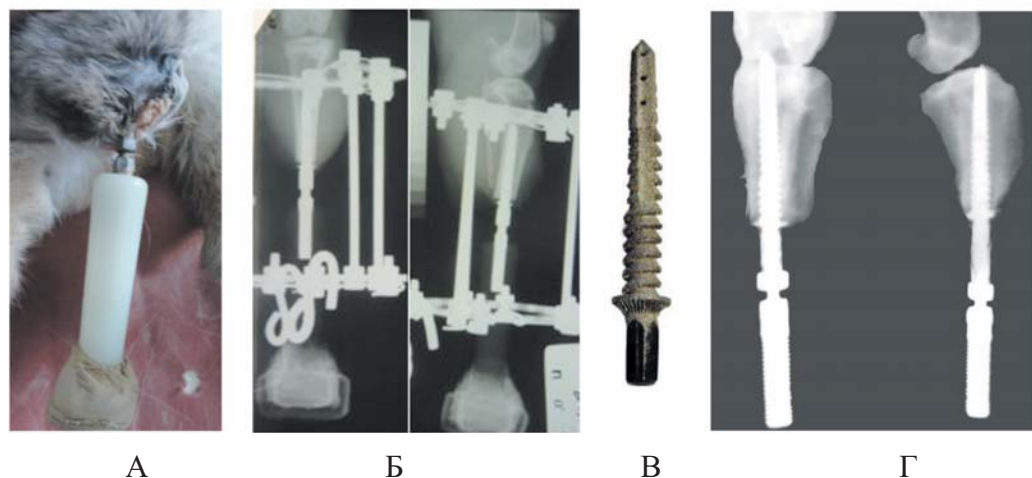


Рис. Внешний вид имплантата культи трубчатой кости и рентгенограммы прооперированной конечности на этапах эксперимента: А – пластиковый аббатмент; Б – рентгенограммы после оперативного вмешательства; В – внешний вид имплантата; Г – рентгенограммы голени кроликов через 12 недель после операции.

Использовали два типа имплантатов, выполненных из разных сплавов. Животным первой группы (n=8) имплантировали изделие из нержавеющей стали (марка EOS PH1), для второй группы (n=12) имплантат был изготовлен из титанового сплава (марка Ti6Al4V). Оба имплантата выполнены по аддитивной технологии методом селективного лазерного сплавления.

Для оценки выживаемости имплантатов осуществляли ежедневное наблюдение за животными в течение 90 сут после имплантации, после чего животных выводили из эксперимента передозировкой барбитуратов. Для дополнительной оценки эффективности изделия в сыворотке крови экспериментальных животных определяли активность ферментов-маркеров костного обмена – щелочной фосфатазы (ЩФ) и тартратрезистентной кислотной фосфатазы (ТрКФ), а также концентрацию общего кальция и неорганического фосфата.

Оценку безопасности имплантации исследуемого материала проводили на основании данных прижизненного наблюдения, гематологического и биохимического исследований крови животных.

Забор крови осуществляли из краевой вены уха на сроках до имплантации, на 28-е и 90-е сут после имплантации. В сыворотке крови определяли концентрацию общего белка (ОБ), С-реактивного белка (СРБ), глюкозы, мочевины, креатинина, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ).

Активность ферментов, а также концентрации субстратов в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi / BM 902 (F.Hoffmann-La Roche Ltd. / Roche Diagnostics GmbH), используя наборы реагентов фирмы «Vital Diagnostic» (Россия). Гематологические показатели определяли на полуавтоматическом

гемоанализаторе АВХ PENTRA 60 («Hofiba АВХ», Франция-Япония).

Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентиля – Me; 25÷75 перцентиль (табл. 1-3); для нежелательных событий (табл. 4) рассчитывали частоту встречаемости с расчётом доверительного интервала [ДИ, 5÷95%]. Достоверность различий между количественными лабораторными показателями животных 1-й и 2-й групп на сроках обследования была оценена с помощью непараметрического Т-критерия Манна-Уитни. Внутри групп достоверность различий количественных лабораторных показателей, полученных на сроках обследования, сравнивали с исходными значениями (дооперационный уровень) с помощью непараметрического W-критерия Уилкоксона. Достоверность различий между частотами нежелательных событий у животных 1-й и 2-й групп оценивали с применением точного критерия Фишера. Различия считали достоверными

при минимальном уровне значимости  $p < 0,05$ . В статистический анализ включены данные от всех животных, участвовавших в исследовании.

### Результаты и их обсуждение

Наблюдение за животными в течение постимплантационного периода показало, что клиническое состояние кроликов обеих групп было удовлетворительным. Опорная функция конечности, как правило, восстанавливалась на четвертые-пятые сутки после операции и присутствовала у всех животных на всем протяжении эксперимента.

У животных первой группы в течение эксперимента наблюдалось два случая выпадения имплантата (частота 0,250; доверительный интервал [ДИ, 5÷95%]: 0,031÷0,584), во второй группе таких случаев зафиксировано не было (частота 0,000; ДИ, 5÷95%: 0,000÷0,078). Следовательно, приживаемость титановых имплантатов была выше, чем имплантатов из нержавеющей стали.

Таблица 1  
Динамика показателей сыворотки крови кроликов экспериментальных групп, позволяющих оценивать эффективность изделия (Me; 25÷75 перцентиль)

Период наблюдения	Группа	ЩФ, ед/л	ТрКФ, ед/л	Кальций, ммоль/л	Фосфат, ммоль/л
До имплантации	1	50; 31÷62	28,8; 11,8÷31,0	3,71; 3,51÷3,77	1,31; 1,19÷1,64
	2	69; 45÷78	30,6; 24,2÷37,9	3,72; 3,68÷3,83	1,34; 1,23÷1,41
28-е сут после имплантации	1	30*; 26÷34	37,2*; 31,3÷43,1	3,39*; 3,07÷3,59	1,54*; 1,41÷1,63
	2	36*; 31÷45	41,9*; 27,6÷59,6	3,49*; 3,39÷3,70	1,40; 1,19÷1,45
90-е сут после имплантации	1	67; 58÷76	19,7; 13,6÷24,8	3,62; 3,60÷3,73	1,34; 1,32÷1,37
	2	44; 41÷66	24,1; 22,7÷25,0	3,63; 3,35÷3,80	1,34; 1,23÷1,36

Примечание: \* – достоверность различий со значениями дооперационного уровня при  $p < 0,05$ .

В свою очередь, показатели сыворотки крови, характеризующие костный и минеральный обмен, не имели достоверных отличий между группами в динамике эксперимента (табл. 1). Лишь на уровне тенденции можно заключить, что у кроликов первой группы на 28-е сут эксперимента отмечено более существенное нарушение кальций-фосфорного баланса (снижение кальция и рост фосфата сыворотки крови).

Клиническое наблюдение также показало, что в первые трое суток у всех животных выявлены отеки в области культи до трех-четырех дней. В течение нескольких дней отмечалось снижение аппетита. У четырех кроликов первой группы (50%) и у двух второй группы (16,7%) наблюдали острое гнойное воспаление мягких тканей вокруг имплантата в течение 10-14-ти дней после имплантации. Гнойное воспаление купировали антибиотикотерапией в течение 7-10-ти дней (цефазолин 0,05 г/кг). В первой группе отмечен один случай (16,7%) спонтанной гибели животного.

Хроническое воспаление в виде участков фибрина в зоне имплантата было выявлено у трех (37,5%) кроликов первой группы (гнойное отделяемое, повышение температуры, лейкоцитоз, снижение аппетита, вялость).

У животных обеих групп в постимплантационном периоде отмечали умеренный лейкоцитоз, снижение гемоглобина, значимое увеличение количества тромбоцитов по сравнению с дооперационными значениями (табл. 2). Значимых межгрупповых отличий не выявлено.

Обнаружено, что статистически достоверные отличия между биохимическими показателями животных сравниваемых групп отмечались на 90-е сут после имплантации (табл. 3). На данном сроке наблюдения в сыворотке крови животных первой группы статистически значимо относительно животных второй группы была выше концентрация мочевины, креатинина, СРБ и активность трансаминаз. Из этих показателей стоит выделить СРБ и креатинин, которые были достоверно выше у кроликов

Таблица 2  
Динамика гематологических показателей кроликов экспериментальных групп, позволяющих оценивать общее состояние животного (Ме; 25÷75 перцентиль)

Период наблюдения	Группа	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л
До имплантации	1	8,7; 6,2÷10,7	6,2; 5,7÷7,3	144; 131÷157	423; 395÷488
	2	8,8; 7,4÷9,8	6,7; 6,2÷7,1	139; 136÷149	411; 402÷438
28-е сут после имплантации	1	10,7; 9,6÷11,8	5,7; 5,3÷6,2	123; 113÷134	573*; 489÷623
	2	10,2; 9,3÷10,7	6,1; 5,4÷6,5	124; 115÷137	588*; 501÷614
90-е сут после имплантации	1	9,7; 9,2÷11,0	6,1; 5,2÷6,8	123; 114÷135	532*; 496÷589
	2	9,1; 8,5÷10,2	6,0; 5,0÷6,2	130; 123÷142	523*; 488÷587

Примечание: \* – достоверность различий со значениями дооперационного уровня при p<0,05.

Таблица 3

Динамика биохимических показателей сыворотки крови кроликов экспериментальных групп, позволяющих оценивать безопасность применяемого изделия (Ме; 25÷75 процентиль)

Период наблюдения	Группа	ОБ, г/л	Мочевина, ммоль/л	СРБ, мг/л	Креатинин, мкмоль/л	Глюкоза, ммоль/л	АЛТ, Е/л	АСТ, Е/л
До имплантации	1	68; 65÷72	5,7; 5,2÷6,4	0,0; 0,0÷0,2	99; 91÷114	7,60; 6,40÷7,76	49; 32÷89	28; 18÷47
	2	71; 66÷73	5,3; 4,9÷5,9	0,6; 0,0÷3,9	108; 95÷115	8,00; 7,38÷8,55	39; 31÷57	25; 23÷31
28-е сут после имплантации	1	67; 60÷68	4,7; 4,4÷5,8	34,5*; 27,9÷41,5	92; 83÷101	7,85; 7,03÷8,54	54; 37÷92	34; 24÷67
	2	65; 62÷72	4,4; 4,3÷5,4	21,7*; 10,7÷34,7	111; 98÷104	7,01; 6,66÷8,56	44; 34÷65	27; 22÷46
90-е сут после имплантации	1	70; 69÷71	6,9; 6,0÷7,9	17,7*; 15,4÷20,0	128*; 118÷137	7,55; 7,28÷7,83	88; 69÷106	56; 38÷74
	2	72; 64÷74	4,1*#; 4,0÷4,5	7,0#; 1,6÷11,2	94#; 88÷103	6,42; 6,16÷7,41	52#; 42÷63	23#; 22÷34

Примечания:

\* – достоверность различий со значениями дооперационного уровня при  $p < 0,05$ ;

# – достоверность межгрупповых различий при  $p < 0,05$ .

первой группы не только относительно сопоставимых показателей животных второй группы, но и относительно дооперационного уровня.

Сводные данные по частоте нежелательных событий (определение по

ГОСТ Р ИСО 14155-2014 «Клинические исследования. Надлежащая клиническая практика»), выявленные у животных при применении апробируемых изделий, представлены в табл. 4. В первой группе животных отмечен один случай

Таблица 4

Частоты нежелательных событий у кроликов экспериментальных групп, абсолютное число/общее число наблюдений (частота; доверительный интервал [ДИ]: 5÷95%)

Событие	Группа 1	Группа 2
Гибель	1/8 (0,125; ДИ: 0,000÷0,423)	0/12 (0,000; ДИ: 0,000÷0,078)
Признаки хронического воспаления (нагноение возле имплантата, лейкоцитоз)	3/8 (0,375; ДИ: 0,095÷0,713)	0/12# (0,000; ДИ: 0,000÷0,078)
Рост АСТ+АЛТ+креатинина	1/8 (0,125; ДИ: 0,000÷0,423)	1/12 (0,083; ДИ: 0,000÷0,296)
Рост СРБ	3/8 (0,375; ДИ: 0,095÷0,713)	5/12 (0,417; ДИ: 0,166÷0,694)

Примечание: # – достоверность межгрупповых различий при  $p < 0,05$ .

спонтанной гибели животного (частота 0,125; 95%-й ДИ, 5÷95%: 0,000÷0,423), а также три случая хронического воспаления возле имплантата (частота 0,375; ДИ, 5÷95%: 0,095÷0,713), различия по частоте случаев хронического воспаления достоверны при  $p < 0,05$ .

В обеих группах отмечено по одному случаю выявления высоких значений активности АЛТ и АСТ при повышенной концентрации креатинина. Однако, в связи с разницей в объеме сравниваемых групп, данное нежелательное событие имеет разную долю: 0,125 (0,125; ДИ 5÷95%: 0,000÷0,423) для первой группы и 0,083 (0,083; ДИ, 5÷95%: 0,000÷0,296) – для второй группы, различия между группами недостоверны. Частота повышения концентрации СРБ в сыворотке крови животных первой группы составила 0,375 (0,375; ДИ: 0,095÷0,713), у животных второй группы – 0,417 (0,417; ДИ: 0,166÷0,694), различия между группами недостоверны.

Причинно-следственная связь между всеми отмеченными в ходе исследования нежелательными событиями и тестируемыми имплантатами оценена нами как возможная (при оценке связи ориентировались на градации, принятые в письме Росздравнадзора от 28.12.2012 г. № 04И-1310/12 «О порядке проведения мониторинга безопасности медицинских изделий в ходе клинических испытаний»).

### Вывод

При оценке приживаемости и безопасности изученных имплантатов чрескожный имплантат из титанового сплава обладал большими преимуществами в части соотношения эффективность/безопасность относительно из-

делия, выполненного из нержавеющей стали.

### Список литературы

1. Корюков А.А., Губин А.В., Кузнецов В.П., Борзунов Д.Ю., Антипов А.В., Овчинников Е.Н., Резник А.В., Еманов А.А., Владимирова О.Н. Возможности улучшения функции и косметики культи пальцев кисти методом оссеоинтеграции // Гений ортопедии. – 2016. – № 4. – С. 22-28.
2. Brånemark R., Berlin O., Hagberg K., Bergh P., Gunterberg B., Rydevik B. A novel osseointegrated percutaneous prosthetic system for the treatment of patients with transfemoral amputation: A prospective study of 51 patients // Bone Joint J. – 2014. – Vol. 96-B. – No. 1. – Pp. 106-113. doi: 10.1302/0301-620X.96B1.31905.
3. Gholizadeh H., Abu Osman N.A., Eshraghi A., Ali S. Transfemoral prosthesis suspension systems: a systematic review of the literature // Am. J. Phys. med. rehabil. – 2014. – Vol. 93. – No. 9. – Pp. 809-823. doi: 10.1097/PHM.0000000000000094.
4. Hagberg K., Hansson E., Brånemark R. Outcome of percutaneous osseointegrated prostheses for patients with unilateral transfemoral amputation at two-year follow-up // Arch. phys. med. rehabil. – 2014. – Vol. 95. – No. 11. – Pp. 2120-2127. doi: 10.1016/j.apmr.2014.07.009.
5. Jeyapalina S., Beck J.P., Bloebaum R.D., Bachus K.N. Progression of bone ingrowth and attachment strength for stability of percutaneous osseointegrated prostheses // Clin. orthop. relat. res. – 2014. – Vol. 472. – No. 10. – Pp. 2957-2965. doi: 10.1007/s11999-013-3381-0.
6. Tomaszewski P.K., Verdonschot N., Bulstra S.K., Rietman J.S., Verkerke G.J. Simulated bone remodeling around two types of osseointegrated implants for direct fixation of upper-leg prostheses // J. Mech. behav. biomed. mater. – 2012. – Vol. 15. – Pp. 167-175. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.06.015.

### References

1. Korjukov A.A., Gubin A.V., Kuznetsov V.P., Borzunov D.Ju., Antipov A.V., Ovchinnikov E.N., Reznik A.V., Emanov A.A., Vladimirova O.N. Vozmozhnosti uluchsheniya funktsii i kosmetiki kul'tej pal'cev kisti metodom osseointegratsii [Possibilities of improving the function and cos-

- metics of the finger stumps by the method of osseointegration]. *Genij ortopedii* [Genius of orthopedics]. 2016. No. 4. Pp. 22-28. (In Russian).
2. *Brånemark R., Berlin O., Hagberg K., Bergh P., Gunterberg B., Rydevik B.* A novel osseointegrated percutaneous prosthetic system for the treatment of patients with transfemoral amputation: A prospective study of 51 patients. *Bone Joint J.* 2014. Vol. 96-B. No. 1. Pp. 106-113. doi: 10.1302/0301-620X.96B1.31905.
  3. *Gholizadeh H., Abu Osman N.A., Eshraghi A., Ali S.* Transfemoral prosthesis suspension systems: a systematic review of the literature. *Am. J. Phys. med. rehabil.* 2014. Vol. 93. No. 9. Pp. 809-823. doi: 10.1097/PHM.0000000000000094.
  4. *Hagberg K., Hansson E., Brånemark R.* Outcome of percutaneous osseointegrated prostheses for patients with unilateral transfemoral amputation at two-year follow-up. *Arch. phys. med. rehabil.* 2014. Vol. 95. No. 11. Pp. 2120-2127. doi: 10.1016/j.apmr.2014.07.009.
  5. *Jeyapalina S., Beck J.P., Bloebaum R.D., Bachus K.N.* Progression of bone ingrowth and attachment strength for stability of percutaneous osseointegrated prostheses. *Clin. orthop. relat. res.* 2014. Vol. 472. No. 10. Pp. 2957-2965. doi: 10.1007/s11999-013-3381-0.
  6. *Tomaszewski P.K., Verdonshot N., Bulstra S.K., Rietman J.S., Verkerke G.J.* Simulated bone remodeling around two types of osseointegrated implants for direct fixation of upper-leg prostheses. *J. Mech. behav. biomed. mater.* 2012. Vol. 15. Pp. 167-175. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.06.015.

## Evaluation of survival and safety of percutaneous osseointegrated implants made of various metal alloys

A.A. Emanov, M.V. Stogov, V.P. Kuznetsov, E.V. Osipova, N.V. Tushina, E.A. Kireeva, I.V. Shipitsyna, A.V. Gubin

In the work, an assessment was made of the survival and safety of the original percutaneous implant for the stump of a tubular bone made from different metal alloys. An experimental study was performed on male rabbits of the Chinchilla breed. The animals of the first group were implanted with a stainless steel product (grade EOS PH1), in the second group the implant was made of a titanium alloy (grade Ti6Al4V). Both implants are made by the additive technology of selective laser fusion by the method of layer-by-layer fusion of samples. The period of observation of the animals was 90 days after implantation. It was found that in animals of the first group two cases of implant prolapse were observed during the experiment, in the second group there were no such cases. In the first group there was one case of death of an animal, as well as three cases of chronic inflammation near the implant. With the same frequency, the animals of both groups showed an increase in the activity of transaminases and an increase in the level of the C-reactive protein. The results of the study showed that the survival rate and safety of a transdermal implant from a titanium alloy was higher relative to a product made of stainless steel.

**Key words:** percutaneous implant, osseointegration, survival, safety.

## Стимулирующий эффект различных форм коллагеновых раневых покрытий на процесс эпителизации ран кожи

Н.В. Калмыкова<sup>1</sup>, А.А. Андреев-Андриевский<sup>2,3,4</sup>, И.А. Демьяненко<sup>1</sup>,  
В.Н. Манских<sup>2</sup>, Е.А. Лагерева<sup>2,4</sup>, А.С. Попова<sup>2,3,4</sup>, Ю.С. Хац<sup>1</sup>, А.П. Суслев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> – ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», Москва

<sup>3</sup> – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

<sup>4</sup> – ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Контактная информация: Калмыкова Нина Владимировна, k.nina.v@mail.ru

Химические и биологические свойства коллагена, основного структурного белка соединительных тканей, обуславливают его способность к стимуляции репаративной регенерации кожи. В настоящее время выпускается множество раневых покрытий на основе коллагена для лечения ран различной этиологии. Однако особенности биологического действия разных типов раневых покрытий на течение раневого процесса в стандартных моделях *in vivo*, как правило, подробно не охарактеризованы. В настоящей работе исследовали воздействие различных форм коллагеновых раневых покрытий (мембраны, порошка и гидрогеля) на репаративные процессы в полнослойных эксцизионных кожных ранах у крыс. Наркотизированным животным хирургически удаляли полнослойный кожный лоскут в межлопаточной области спины. На сформированный раневой дефект крысам опытных групп накладывали раневые покрытия из коллагена. Раны животных контрольной группы заживали под струпом. На 7-е и 14-е сутки после нанесения ран животных выводили из эксперимента и проводили забор кожных лоскутов с раной для гистологического исследования. Полученные гистологические препараты подвергали морфологическому и морфометрическому анализу. Результаты проведенного эксперимента показали, что заживление ран под коллагеновыми раневыми покрытиями приводило к ускорению эпителизации раневой поверхности. Данный эффект был наиболее выражен при применении покрытия в виде гидрогеля. Мы предполагаем, что повышенная терапевтическая эффективность данной формы может быть обусловлена созданием влажного микроокружения раны, а также повышенной биодоступностью коллагена для ферментативного гидролиза кератиноцитами.

**Ключевые слова:** коллаген, раневые покрытия, заживление полнослойных кожных ран.

### Введение

Коллаген, основной фибриллярный белок соединительных тканей, применяется для изготовления различных биодеградируемых медицинских изделий на протяжении многих десятилетий, начиная с конца XIX века [7, 15, 17]. Столь длительное и широкое использование данного белка в качестве биоматериала

обусловлено его высокой доступностью, простотой получения, способностью к биорезорбции, а также низкой иммуногенностью [8, 10, 16]. Одним из направлений регенеративной медицины, в котором применяют коллагеносодержащие материалы, является лечение ран кожи различной этиологии [14, 24]. Изначально интерес к коллагеновым ра-

невым покрытиям был связан с их высокой гемостатической и адсорбционной активностью, способностью коллагена в их составе выступать в качестве провизорного матрикса для миграции клеток в регенерирующих тканях [20]. Тем не менее, многочисленные исследования показали, что коллаген способен напрямую воздействовать на биохимические и клеточные процессы, происходящие в тканях раневого дефекта кожи, стимулируя таким образом репаративную регенерацию [22]. Так, коллаген, а также пептиды, возникающие при его ферментативной деградации, стимулируют привлечение лейкоцитов, фибробластов и кератиноцитов в область раны, усиливают пролиферацию данных клеток, а также секрецию ими цитокинов и ростовых факторов, стимулирующих синтез компонентов аутологичного внеклеточного матрикса и эпителизацию [9]. Особого внимания заслуживают опубликованные данные о том, что раневые покрытия на основе коллагена способны связывать и инактивировать протеолитические ферменты в раневом экссудате, обратимо связывать ростовые факторы, защищая их от протеолиза, и, более того, обезвреживать активные формы кислорода [11, 12].

В настоящее время выпускаются разнообразные формы раневых покрытий, содержащих коллаген, имеющие различные эксплуатационные, эргономические и физико-химические характеристики [6, 10, 14]. Однако особенности биологического действия каждого из них на течение острого или хронического раневого процесса подробно не охарактеризованы. В связи с этим для разработки наиболее эффективных терапевтических стратегий лечения ран

при помощи коллагеновых раневых покрытий необходимо проведение сравнительных экспериментальных и клинических исследований их действия на регенерацию кожи.

**Целью** настоящей работы явилось проведение сравнительного морфологического исследования эффекта различных форм коллагеновых раневых покрытий «КОЛЛОСТ» на репаративные процессы в полнослойных эксцизионных кожных ранах у крыс.

Отечественные медицинские изделия «КОЛЛОСТ» (ООО «БИОФАРМАХОЛДИНГ», Россия) изготавливают из коллагена волокнистого внеклеточного матрикса децеллюляризированной дермы кожи крупного рогатого скота, полученного путем многокомпонентной щелочной очистки [3]. В работе для сравнительного анализа мы использовали различные формы данных изделий, значительно различающиеся по своим структурным свойствам, а именно: «мембрану» – коллагеновую пластину толщиной 1,5 мм; «порошок» – коллаген, измельченный до мелкодисперсного порошка; «гель» – коллагеновый гидрогель.

### **Материалы и методы**

#### **Лабораторные животные**

В работе использованы 80 самцов крыс стока Wistar массой  $221 \pm 26$  г, свободных от специфицированной патогенной микрофлоры (SPF). Животные были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» (Московская обл.). Крыс содержали в индивидуальных пластиковых клетках ТЗ (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) на подстилке Lignocel («JRS», Германия)



при температуре 22-26°C, влажности 35-75%, соблюдении равных по длительности (12/12 ч) светового и темного периодов, а также при неограниченном доступе к деионизованной воде и гранулированному корму («Ассортимент-агро», Россия) в виварии ООО «НИИ Митоинженерии МГУ». Весь материал, поступающий животным, стерилизовали автоклавированием.

### **Регулирующие стандарты**

Обоснованность использования лабораторных животных в исследовании, размер выборок, прижизненные манипуляции, способ выведения животных из эксперимента рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (протокол № 87 от 12 октября 2015 г.).

### **Схема эксперимента**

В исследовании использовали модель заживления эксцизионной полнослойной кожной раны [2]. В данной модели у наркотизированных животных хирургически создают кожный дефект, удаляя полнослойный лоскут кожи на спине.

Животных разделяли на контрольную и три опытные группы методом рандомизации. В контрольной группе (n=20) заживление ран происходило под струпом. В опытных группах заживление ран происходило под коллагеновыми раневыми покрытиями «КОЛЛОСТ». На раны опытной группы № 1 (n=20) непосредственно после удаления полнослойного кожного лоскута наносили медицинское изделие «КОЛЛОСТ – мембрана»; опытной группы № 2 (n=20) – «КОЛЛОСТ – порошок»; опытной группы № 3 (n=20) – «КОЛЛОСТ – гель 7%». На 7-е (n=40) и 14-е сут (n=40) после нанесения ран живот-

ных выводили из эксперимента путем ингаляционного воздействия углекислого газа и проводили забор тканей кожного лоскута в области раневого дефекта для гистологического исследования.

### **Моделирование ран**

Крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением Золетила (30 мг/кг) в сочетании с Ксилазином (3 мг/кг). Затем в межлопаточной области спины электрической машинкой сбрасывали шерсть и обрабатывали поверхность кожи антисептиком АХД 2000 («Лизоформ», Россия). После этого при помощи скальпеля и хирургических ножниц удаляли со спины полнослойный кожный лоскут диаметром ~20 мм, создав таким образом раневую дефект. Раны животных контрольной группы оставляли непокрытыми. Фрагмент «КОЛЛОСТ – мембраны», предварительно замоченный на 15 мин в 0,9% NaCl (согласно инструкции производителя), вырезанный по форме и размерам дефекта кожи, помещали на раны крыс опытной группы № 1. Раны опытных групп №2 и 3 полностью заполняли «порошком» и «гелем» «КОЛЛОСТ» соответственно. Коллагеновые раневые покрытия фиксировали пластырем Hydrofilm («Paul Hartmann», Германия) и оставляли на ранах до момента выведения животных из эксперимента.

### **Гистологическое исследование**

После выведения из эксперимента со спины животных иссекали полнослойный кожный лоскут, содержащий раневую дефект. Вырезанные фрагменты тканей фиксировали в 10% формалине на фосфатном буфере (pH=7,2) в течение 48 ч. После фиксации полученный фрагмент кожи разделяли на две половины острым лезвием в попереч-

ной плоскости через середину раневой поверхности. Затем ткани подвергали стандартной гистологической обработке и заливали в парафин таким образом, чтобы срезанная сторона лоскута с раневой поверхностью располагалась на той стороне блока, с которой были впоследствии получены срезы при микротомировании. В дальнейшем при помощи микротомы RM2245 («Leica», Германия) изготавливали гистологические срезы полученных образцов толщиной 3 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином, а также по Ван Гизону. Гистологические препараты анализировали на микроскопе Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Германия). Репрезентативные микрофотографии получали при помощи цифровой камеры высокого разрешения MRc.5 («Carl Zeiss», Германия).

#### **Морфометрическое исследование**

Для количественной оценки репаративных процессов в кожных ранах проводили морфометрическое исследование полученных препаратов на цифровых микрофотоснимках, полученных с помощью камеры MRc.5. Для анализа площади грануляционной и рубцовой тканей, а также эпителизации на малом увеличении микроскопа (объектив  $\times 4$ ) делали серию микрофотографий, полностью захватывающих всю плоскость каждого гистологического среза. Для анализа нейтрофильной инфильтрации и показателей васкуляризации с помощью объектива  $\times 40$  получали по 2 микрофотографии краевых зон каждого раневого дефекта и по 2 микрофотографии их центральной зоны. Области съемки при этом выбирали случайным образом.

Морфометрический анализ проводили на полученных микрофотографиях

при помощи программы AxioVision 3.0 («Carl Zeiss», Германия). Для оценки интенсивности новообразования соединительной ткани в зоне раневого дефекта измеряли в  $\text{мм}^2$  площадь, занимаемую грануляционной (на 7-е сут) и рубцовой (на 14-е сут) тканями на срезе. Для оценки скорости регенерации эпидермиса рассчитывали степень эпителизации раневой поверхности (в %) как отношение длины эпителизированной поверхности раны к неэпителизированной. Для оценки воспалительной нейтрофильной инфильтрации ран подсчитывали суммарное число нейтрофилов на анализируемых участках срезов. Выражали полученные данные в виде числа нейтрофилов, приходящегося на  $1 \text{ мм}^2$  площади среза. Для оценки васкуляризации раневого дефекта измеряли число профилей сосудов, а также их площадь на анализируемых участках срезов. Затем рассчитывали число профилей сосудов, приходящееся на  $1 \text{ мм}^2$  площади среза, и плотность сосудов как процентное отношение суммарной измеренной площади сосудов и общей площади проанализированных участков срезов.

#### **Статистическая обработка**

Статистическую обработку полученных результатов производили при помощи программы GraphPad Prism, версия 6.0. Для анализа нормальности распределения полученных выборок применяли критерий Шапиро-Уилка. Для анализа равенства дисперсий применяли тест Левена. Для оценки статистической значимости отличий между выборками использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением групп по Даннету. Критическое значение уровня статистической значимости при провер-

ке гипотез о нормальности распределения полученных экспериментальных данных, равенстве дисперсий, а также отсутствии различий между экспериментальными группами принимали равным  $p=0,05$ .

### Результаты исследований

Гистологическое исследование поперечных срезов центральной области ран показало, что на 7-е сут заживления во всех исследованных группах животных дно раневого дефекта на всем своем протяжении заполнено грануляционной тканью (рис.). При этом ткани интактной кожи, окружающей раны, не имеют каких-либо видимых патологических изменений. В новообразованной соединительной ткани преобладают веретеновидные низкодифференцированные фибробласты, между которыми присутствует небольшое количество внеклеточного матрикса, окрашивающегося пикрофуксином в слабый розовый цвет. Также в грануляционной ткани присутствует большое количество сосудов микроциркуляторного русла и клеток смешанного воспалительного инфильтрата, представленных преимущественно нейтрофилами, моноцитами/макрофагами и лимфоцитами. Наблюдается краевая эпителизация ран пластами утолщенного эпидермиса (в некоторых случаях – с явлением погружного роста), наиболее выраженная в экспериментальной группе, получавшей раневую повязку «КОЛЛОСТ – гель 7%» (рис.).

На 14-е сут заживления раневой дефект у всех животных заполнен незрелой рубцовой тканью (рис.). В соединительнотканном регенерате преобладают переплетающиеся, ориентированные преимущественно параллельно повер-

ности раны зрелые пучки коллагеновых волокон, окрашивающиеся пикрофуксином в красный цвет. Между волокнами внеклеточного матрикса присутствуют зрелые фибробласты. По сравнению с 7-ми сут заживления общее число клеточных форм, клеток воспалительного инфильтрата, а также сосудов микроциркуляторного русла в новообразованной соединительной ткани значительно снижено. Количество рубцовой ткани, а также её толщина в различных участках среза сильно варьирует у отдельных животных внутри всех исследованных групп. Поверхность ран в разной степени покрыта новообразованным эпидермисом, местами утолщенным и в некоторых случаях – с явлениями погруженного роста. У крыс контрольной группы полностью эпителизированные раны не выявлены. В то же время на 14-е сут в опытной группе № 1 («мембрана») поверхность ран полностью закрыта эпидермисом у трех животных, в группе № 2 («порошок») – также у трех животных, а в группе № 3 («гель») – у пяти животных из десяти.

Морфометрический анализ показателей репаративной регенерации кожи (табл.) выявил статистически достоверное увеличение степени эпителизации раневой поверхности в опытных группах № 2 ( $p=0,004$ ) и № 3 ( $p=0,002$ ) по сравнению с контрольной группой на седьмые сутки заживления. В свою очередь, достоверность различий между контролем и группой № 1 также приближалась к уровню статистической значимости ( $p=0,059$ ). Кроме того, на данном этапе было обнаружено достоверное уменьшение площади грануляционной ткани на срезах ран животных из групп «порошок» ( $p=0,048$ ) и «гель» ( $p=0,009$ )

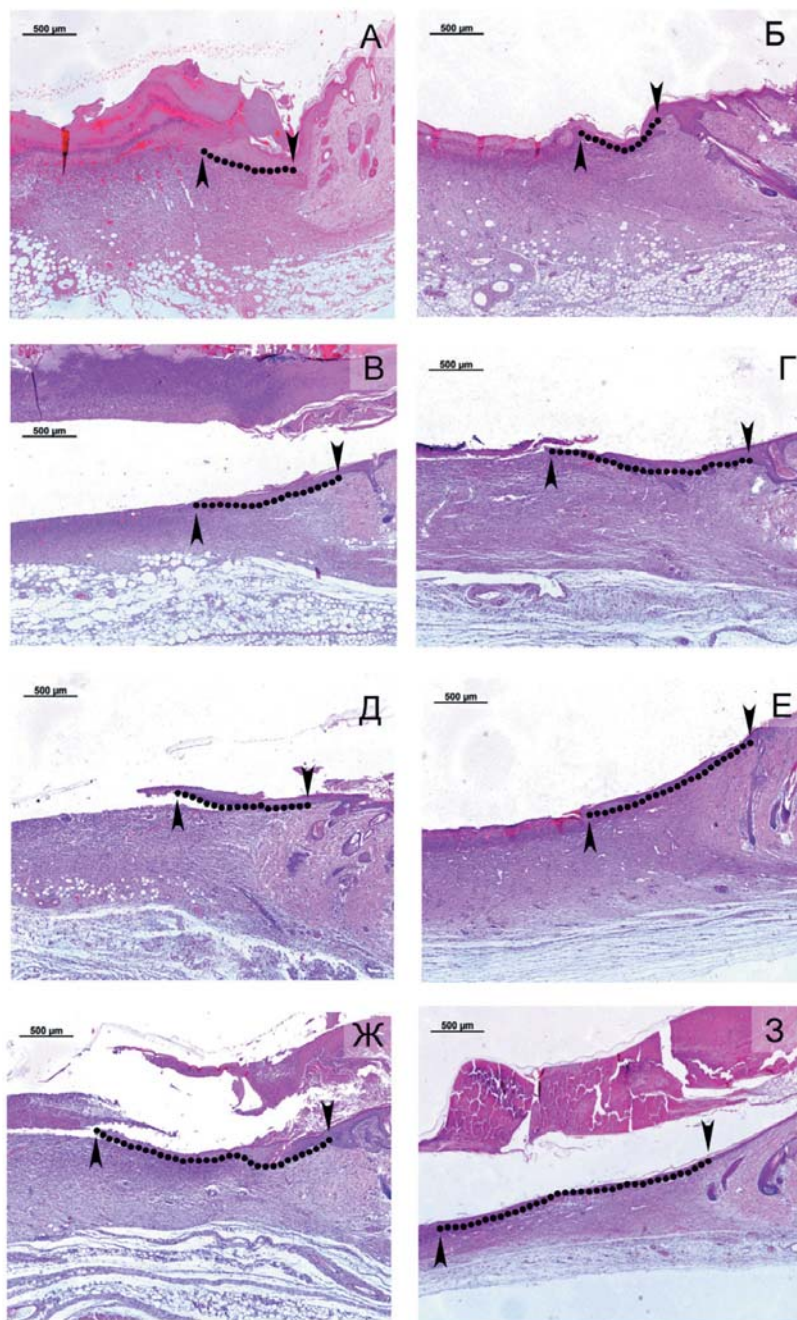


Рис. Гистологические срезы (репрезентативные микрофотографии) центральной области ран животных контрольной группы (А, Б), а также опытных групп «мембрана» (В, Г), «порошок» (Д, Е) и «гель 7%» (Ж, 3) на 7-е (А, В, Д, Ж) и 14-е (Б, Г, Е, 3) сутки заживления. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. x40. Образцы фиксированы 10% формалином на фосфатном буфере в течение 48 ч. Стрелками и пунктирной линией отмечены пласты регенерирующего эпидермиса.

Таблица  
Морфометрические показатели репаративных процессов в области раневого дефекта кожи на 7-е и 14-е сут заживления

Морфометрический параметр	Срок (сут)	Группы животных			
		Контроль	«Мембрана»	«Порошок»	«Гель»
Степень эпителизации раны, %	7	18,5±4,4	24,2±4,5	27,4±6,6*	28,6±8,6*
	14	42,5±23,0	71,6±29,5*	65,4±27,6	84,1±20,5*
Площадь грануляционной (7-е сут) или рубцовой (14-е сут) ткани, мм <sup>2</sup> /срез	7	17,8±5,9	12,7±5,3	12,5±4,3*	10,5±6,4*
	14	8,0±2,5	8,3±3,6	7,1±4,4	6,0±2,9
Число нейтрофилов, ед./мм <sup>2</sup>	7	662,2±558,8	510,8±342,7	644,9±378,2	718,4±373,7
	14	562,9±539,5	649,3±489,4	450,1±331,8	290,2±303,5
Число профилей сосудов, ед./мм <sup>2</sup>	7	5,8±2,6	5,2±3,2	6,6±2,3	7,0±4,2
	14	6,8±4,0	3,6±2,5	4,0±3,4	4,3±2,9
Объемная плотность сосудов, %	7	6,8±3,7	8,0±3,7	5,9±1,7	8,4±5,5
	14	4,8±2,7	2,8±2,8	3,3±3,7	2,2±1,9

Примечание: \* – отличие от контрольной группы статистически достоверно ( $p < 0,05$ ). Данные представлены в виде среднего арифметического значения  $\pm$  стандартное отклонение.

по сравнению с крысами контрольной группы (табл.).

Количественное гистологическое исследование ранозаживления на 14-е сут эксперимента показало статистически достоверное увеличение степени эпителизации ран в опытных группах «мембрана» ( $p=0,026$ ) и «гель» ( $p=0,002$ ) по сравнению с контрольными животными (табл.). При этом среднее значение данного показателя в группе «гель» двукратно превосходило таковое в контрольной группе.

### Обсуждение результатов

Восстановление эпителиального покрова над областью раневого дефекта кожи является ключевым параметром, характеризующим успешность его заживления. Нарушение процессов эпителизации является одним из факторов, в значительной степени способствую-

щих развитию длительно незаживающих ран [19].

Результаты проведенного морфологического исследования свидетельствуют об усилении процесса регенерации эпидермиса в полнослойных кожных ранах у крыс при их заживлении под различными формами коллагеновых раневых покрытий. Вместе с тем, на обоих исследованных сроках наиболее выраженная стимуляция эпителизации раневых дефектов наблюдалась при применении коллагенового гидрогеля. Статистически достоверное улучшение эпителизации при использовании раневых покрытий в форме порошка выявлено на более раннем (7-е сут), а при использовании мембраны – на более позднем (14-е сут) сроках заживления.

Основным клеточным компонентом эпидермиса, составляющим его структурную основу и принимающим основ-

ное участие в его физиологической и репаративной регенерации, являются кератиноциты. Из литературы известно, что контакт кератиноцитов с коллагеном типа I необходим для инициации процесса регенерации поврежденного эпидермиса [21]. Данный факт может отчасти обуславливать выявленные в настоящем эксперименте репаративные свойства коллагеновых раневых покрытий, направленные на ускорение восстановления эпителиального покрова раневого дефекта кожи. Ранее было показано, что ферментативная деградация коллагена типа I матриксными металлопротеиназами, выделяемыми кератиноцитами, обязательно предшествует началу направленной миграции эпителиальных клеток в область раны [21, 23]. Можно предположить, что различная доступность коллагена, присутствующего в составе исследованных форм раневых покрытий, для деградации данными ферментами приводит к наблюдаемым отличиям в эффекте медицинских изделий на показатель эпителизации ран на разных сроках эксперимента. Так, гидратация раневого покрытия раневым экссудатом, содержащим протеолитические ферменты, очевидно, осуществляется быстрее в случае заполнения раны мелкодисперсным порошком, нежели при наложении на неё «монолитной» коллагеновой пластины («мембраны»). Раневое покрытие в форме коллагенового гидрогеля при аппликации на раневую поверхность уже содержит в своем составе значительное количество влаги, способствуя, таким образом, эффективному поступлению коллагена в область повреждения, а также ускорению его ферментативного гидролиза. Необходимо отметить, что само по себе увлажне-

ние раневого дефекта широко известно как отдельный фактор, стимулирующий процессы репаративной регенерации кожи, включая и миграцию кератиноцитов [18, 25]. В связи с этим мы предполагаем, что эффективное обеспечение заживления ран в условиях влажной среды при применении коллагенового гидрогеля также может обуславливать повышенную эффективность данной формы раневого покрытия к стимуляции эпителизации.

Помимо эффекта коллагеновых раневых покрытий на показатель эпителизации ран, было показано статистически достоверное снижение количества грануляционной ткани в раневых дефектах кожи, заживавших под формами порошка и геля на 7-е сут эксперимента. В то же время не выявлено значимых отличий между группами по показателям воспалительной нейтрофильной инфильтрации и васкуляризации новообразованной соединительной ткани. На 14-е сут заживления не обнаружено достоверных отличий по количеству сформированной рубцовой ткани. Ранее при исследовании биохимических свойств коллагенсодержащего раневого покрытия PROMOGRAN («Johnson & Johnson», Великобритания) была показана способность коллагена наряду с окисленной регенерированной целлюлозой нековалентно связывать факторы роста [11, 12]. Экстраполируя эти данные на результаты, полученные в настоящем эксперименте, можно предположить, что снижение скорости новообразования соединительной ткани на раннем этапе заживления ран при нанесении медицинских изделий на основе коллагена в форме порошка и геля вызвано частичным временным депонированием ростовых

факторов, способствующих стимуляции новообразования соединительной ткани (например, PDGF и TGF  $\beta$ 1). Последующее же высвобождение ростовых факторов приводит к нормализации процесса регенерации соединительной ткани, приводящей к нивелированию отличий между группами на 14-е сут заживления. Способность к обратимому связыванию факторов роста коллагеном в составе раневых покрытий может играть главенствующую роль в их защите от протеолиза в условиях длительно незаживающих ран различной этиологии, обуславливая терапевтическую эффективность медицинских изделий на основе коллагена. Косвенно в пользу данного предположения говорят опубликованные данные об ускорении заживления трофических язв и пролежней в клинике при применении различных форм раневых покрытий «КОЛЛОСТ» [1, 4, 5, 13].

### Заключение

Сравнительное морфологическое исследование воздействия коллагеновых раневых покрытий в форме мембраны (пластины), порошка и гидрогеля на репаративные процессы в полнослойных эксцизионных кожных ранах у крыс показало, что в данной экспериментальной модели терапевтическое действие настоящих медицинских изделий направлено на стимуляцию эпителизации раневой поверхности. При этом наибольшую эффективность проявляет раневое покрытие в виде коллагенового гидрогеля.

### Список литературы

1. **Богомолов М.С.** Сравнительный анализ эффективности современных перевязочных средств при лечении венозных трофических язв // Раны и раневые инфекции. – 2015. – Т. 2. – № 4. – С. 33-39.
2. **Бурякина А.В., Фролова Н.Ю., Мельникова Т.И., Вишневская Е.К., Авенирова Е.Л., Сивак К.В., Караваева А.В., Зебрёв А.И., Моисеева М.Н.** Методические рекомендации по доклиническому изучению дерматотропных лекарственных средств // В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К. – 2012. – Т. 1. – С. 738-744.
3. **Калмыкова Н.В., Демьяненко И.А., Шевлягина Н.В., Андреевская С.Г., Суслев А.П.** Сравнительный анализ эффективности простого и многокомпонентного методов щелочной децеллюляризации на примере очистки волокнистого внеклеточного матрикса дермы // Морфологические ведомости. – 2016. – Т. 24. – № 4. – С. 36-45.
4. **Корейба К.А., Кудыкин М.Н., Минабутдинов А.Р.** Лечение раневых дефектов у больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы с применением биопластического материала // Хирургия. – 2015. – № 7. – С. 69-74.
5. **Корейба К.А., Минабутдинов А.Р.** Биопластические материалы на основе нативного коллагена I типа при лечении больных с синдромом диабетической стопы // Хирургия. – 2014. – № 10. – С. 83-87.
6. **Легонькова О.А., Васильев В.Г., Асанова Л.Ю.** Исследование эксплуатационных свойств полимерных перевязочных средств // Раны и раневые инфекции. – 2015. – Т. 2. – № 2. – С. 32-39.
7. **Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истратов Л.П., Леменив В.Л.** Коллаген и его применение в медицине. – М.: Медицина. – 1976. – 256 с.
8. **Abou Neel E.A., Bozec L., Knowels J.C., Syed O., Mudera V., Day R., Hyun J.K.** Collagen – emerging collagen based therapies hit the patient // Adv. drug deliv. rev. – 2013. – V. 65. – No. 4. – Pp. 429-456.
9. **Brett D.** A review of collagen and collagen-based wound dressings // Wounds. – 2008. – V. 20. – No. 12. – Pp. 347-356.

10. *Chattopadhyay S., Raines R.T.* Collagen-based biomaterials for wound healing // *Biopolymers*. – 2014. – V. 101. – No. 8. – Pp. 821-833.
11. *Cullen B., Smith R., McCulloch E., Silcock D., Morrison L.* Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers // *Wound repair regen.* – 2002. – V. 10. – No. 1. – Pp. 16-25.
12. *Cullen B., Watt P.W., Lundqvist C., Silcock D., Schmidt R.J., Bogdan D., Light N.D.* The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action // *Int. J. Biochem. cell biol.* – 2002. – V. 34. – No. 12. – Pp. 1544-1556.
13. *Dibirov M.D., Gadzhimuradov R.U., Korieba K.A., Minabutdinov A.R.* Biomedical technologies in the treatment of skin and soft tissue defects in patients with diabetic foot syndrome // *IJBM*. – 2016. – V. 6. – No. 1. – Pp. 41-45.
14. *Holmes C., Wrobel J.S., Maceachem M.P., Boles B.R.* Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review // *Diabetes metab. syndr. obes.* – 2013. – V. 6. – Pp. 17-29.
15. *Lister J.* An address on the catgut ligature // *Br. Med. J.* – 1881. – V. 1. – No. 1049. – Pp. 183-185.
16. *Lynn A.K., Yannas I.V., Bonefield W.* Antigenicity and immunogenicity of collagen // *J. Biomed. mater. res. B appl. biomater.* – 2004. – V. 71. – No. 2. – Pp. 343-354.
17. *Macewen W.* Clinical lectures on some points connected with the treatment of wounds // *Br. Med. J.* – 1881. – V. 1. – No. 1049. – Pp. 185-187.
18. *Mosti G.* Wound care in venous ulcers // *Phlebology*. – 2013. – V. 28. – Suppl. 1. – Pp. 79-85.
19. *Pastar I., Stojadinovic O., Yin N.C., Ramirez H., Nusbaum A.G., Sawaya A., Patel S.B., Khalid L., Isseroff R.R., Tomic-Canic M.* Epithelialization in Wound Healing // *Adv. wound care.* – 2014. – V. 3. – No. 7. – Pp. 445-464.
20. *Patino M.G., Neiders M.E., Andreana S., Noble B., Cohen R.E.* Collagen as an implantable material in medicine and dentistry // *J. Oral Implantol.* – 2002. – V. 28. – No. 5. – Pp. 220-225.
21. *Plicher B.K., Dumin J.A., Sudbeck B.D., Krane S.M., Welgus H.G., Parks W.C.* The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on type I collagen matrix // *J. Cell biol.* – 1997. – V. 137. – No. 6. – Pp. 1445-1457.
22. *Rangaraj A., Harding K., Leaper D.* Role of collagen in wound management // *Wounds UK*. – 2011. – V. 7. – No. 2. – Pp. 54-63.
23. *Rohani M.G., Parks W.C.* Matrix remodeling by MMPs during wound repair // *Matrix Biol.* – 2015. – V. 44-46. – Pp. 113-121.
24. *Ruszczak Z.* Effect of collagen matrices on dermal wound healing // *Adv. drug deliv. rev.* – 2003. – V. 55. – No. 12. – Pp. 1595-1611.
25. *Vasconcelos A., Cavaco-Paulo A.* Wound dressings for a proteolytic-rich environment // *Appl. microbiol. biotechnol.* – 2011. – V. 90. – No. 2. – Pp. 445-460.

## References

1. *Bogomolov M.S.* Sravnitel'nyj analiz jefektivnosti sovremennyh perevjazozhnyh sredstv pri lechenii venoznyh troficheskikh jazv [A comparative analysis of efficiency of modern dressing-room agents at treatment of venous trophic ulcers]. Rany i ranevye infekcii [Wounds and wound fevers]. 2015. T. 2. No. 4. Pp. 33-39. (In Russian).
2. *Burjakina A.V., Frolova N.Ju., Mel'nikova T.I., Vishnevskaja E.K., Avenirova E.L., Sivak K.V., Karavaeva A.V., Zebrev A.I., Moiseeva M.N.* Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniju dermatotropnyh lekarstvennyh sredstv [Methodical references on preclinical studying of dermatotropic medicines]. V kn.: Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv [In the book: Guide to carrying out preclinical study of medicines]. Moscow: Grif i K. 2012. T. 1. Pp. 738-744. (In Russian).



3. **Kalmykova N.V., Dem'janenko I.A., Shev-ljagina N.V., Andreevskaja S.G., Suslov A.P.** Sravnitel'nyj analiz jeffektivnosti prostogo i mnogokomponentnogo metodov shhelochnoj decelljuljarizacii na primere ochistki voloknistogo vnekletocnogo matriksa dermy [The comparative analysis of efficiency of simple and multicomponent methods of alkaline decellularization on the example of purification of a fibrous extracellular matrix of a derma]. *Morfologicheskie vedomosti [Morphological sheets]*. 2016. T. 24. No. 4. Pp. 36-45. (In Russian).
4. **Korejba K.A., Kudykin M.N., Minabutdinov A.R.** Lechenie ranevyh defektov u bol'nyh s nejroishemicheskoy formoj sindroma diabeticheskoy stopy s primeneniem bioplasticheskogo materiala [Treatment of wound defects in patients with a neuroischemic form of the diabetic foot syndrome with use of bioplastic material]. *Hirurgija [Surgery]*. 2015. No. 7. Pp. 69-74. (In Russian).
5. **Korejba K.A., Minabutdinov A.R.** Bioplasticheskie materialy na osnove nativnogo kollagena I tipa pri lechenii bol'nyh s sindromom diabeticheskoy stopy [Bioplastic materials based on native collagen of the type I in the treatment of patients with diabetic foot syndrome]. *Hirurgija [Surgery]*. 2014. No. 10. Pp. 83-87. (In Russian).
6. **Legon'kova O.A., Vasil'ev V.G., Asanova L.Ju.** Issledovanie jekspluatacionnyh svojstv polimernyh perevzochnyh sredstv [Research of the operational properties of polymeric dressing-room agents]. *Rany i ranevye infekcii [Wounds and wound infections]*. 2015. T. 2. No. 2. Pp. 32-39. (In Russian).
7. **Hil'kin A.M., Shehter A.B., Istranov L.P., Lemenev V.L.** Kollagen i ego primenenie v medicine [A collagen and its use in medicine]. Moscow: Medicina. 1976. 256 p. (In Russian).
8. **Abou Neel E.A., Bozec L., Knowels J.C., Syed O., Mudera V., Day R., Hyun J.K.** Collagen – emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv. drug deliv. rev.* 2013. V. 65. No. 4. Pp. 429-456.
9. **Brett D.** A review of collagen and collagen-based wound dressings. *Wounds*. 2008. V. 20. No. 12. Pp. 347-356.
10. **Chattopadhyay S., Raines R.T.** Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014. V. 101. No. 8. Pp. 821-833.
11. **Cullen B., Smith R., McCulloch E., Silcock D., Morrison L.** Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound repair regen.* 2002. V. 10. No. 1. Pp. 16-25.
12. **Cullen B., Watt P.W., Lundqvist C., Silcock D., Schmidt R.J., Bogan D., Light N.D.** The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *Int. J. Biochem. cell biol.* 2002. V. 34. No. 12. Pp. 1544-1556.
13. **Dibirov M.D., Gadzhimuradov R.U., Korieba K.A., Minabutdinov A.R.** Biomedical technologies in the treatment of skin and soft tissue defects in patients with diabetic foot syndrome. *IJBM*. 2016. V. 6. No. 1. Pp. 41-45.
14. **Holmes C., Wrobel J.S., Maceachem M.P., Boles B.R.** Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review. *Diabetes metab. syndr. obes.* 2013. V. 6. Pp. 17-29.
15. **Lister J.** An address on the catgut ligature. *Br. Med. J.* 1881. V. 1. No. 1049. Pp. 183-185.
16. **Lynn A.K., Yannas I.V., Bonefield W.** Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. mater. res. B appl. biomater.* 2004. V. 71. No. 2. Pp. 343-354.
17. **Macewen W.** Clinical lectures on some points connected with the treatment of wounds. *Br. Med. J.* 1881. V. 1. No. 1049. Pp. 185-187.
18. **Mosti G.** Wound care in venous ulcers. *Phlebology*. 2013. V. 28. Suppl. 1. Pp. 79-85.
19. **Pastar I., Stojadinovic O., Yin N.C., Ramirez H., Nusbaum A.G., Sawaya A., Patel S.B., Khalid L., Isseroff R.R., Tomic-Canic M.** Epithelialization in Wound

- Healing. Adv. wound care. 2014. V. 3. No. 7. Pp. 445-464.
20. *Patino M.G., Neiders M.E., Andreana S., Noble B., Cohen R.E.* Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. J. Oral Implantol. 2002. V. 28. No. 5. Pp. 220-225.
21. *Plicher B.K., Dumin J.A., Sudbeck B.D., Krane S.M., Welgus H.G., Parks W.C.* The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on type I collagen matrix. J. Cell Biol. 1997. V. 137. No. 6. Pp. 1445-1457.
22. *Rangaraj A., Harding K., Leaper D.* Role of collagen in wound management. Wounds UK. 2011. V. 7. No. 2. Pp. 54-63.
23. *Rohani M.G., Parks W.C.* Matrix remodeling by MMPs during wound repair. Matrix Biol. 2015. V. 44-46. Pp. 113-121.
24. *Ruszczak Z.* Effect of collagen matrices on dermal wound healing. Adv. drug deliv. rev. 2003. V. 55. No. 12. Pp. 1595-1611.
25. *Vasconcelos A., Cavaco-Paulo A.* Wound dressings for a proteolytic-rich environment. Appl. microbiol. biotechnol. 2011. V. 90. No. 2. Pp. 445-460.

## The stimulating effect of various forms of collagenic wound coverings on the epithelization process of skin wounds

N.V. Kalmykova, A.A. Andreyev-Andrievskiy, I.A. Demyanenko,  
V.N. Manskikh, E.A. Lagereva, A.S. Popova, Yu.S. Khats, A.P. Suslov

Collagen represents the main structural protein of connective tissues. The chemical and biological properties of collagen determine its ability to stimulate reparative skin regeneration. Currently, a lot of wound dressings based on collagen are available for the treatment of wounds of various etiologies. However, differences in biological action of various types of wound dressings are not described in detail in the conventional *in vivo* models. In the present study we examined the effect of different forms of collagen wound dressings, namely, membrane, powder and hydrogel, on reparative processes in full-thickness excisional skin wounds in rats. The full-thickness skin flap in the interscapular region was surgically removed in the anesthetized animals. Wounds of rats from the experimental groups were superimposed wound dressings from collagen. The wounds in the animals of the control group were healed under the scab. On the 7th and 14th day of the experiment the animals were euthanized and the skin flaps containing wounds were excised for histological examination. The obtained histological slides were subjected to morphological and morphometric analysis. The results of the experiment revealed that the collagen wound dressings significantly accelerate epithelization of wound surface. This effect was most pronounced when applying the hydrogel as wound coverage. We hypothesize that the increased therapeutic efficacy of this form may be due to the creation of a moist wound microenvironment, as well as increased bioavailability of collagen for enzymatic hydrolysis by keratinocytes.

**Key words:** collagen, wound dressings, healing of full-thickness skin wounds.

---

# Правила направления, рецензирования и опубликования рукописей научных работ в журнале «Биомедицина»

## 1. Порядок направления и опубликования рукописей в рецензируемом издании

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

место отводится статьям по разработке и внедрению новых биомедицинских технологий.

### 1.2. Рубрикация журнала:

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

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

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

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

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

В рубрике «Нормативные документы» печатаются правила обращения с лабораторными животными, отечественные и международные законодательные акты, регламентирующие использование биомоделей в экспериментах (до 3 стр.).

1.3. Актуальные разделы журнала:  
• Новые биомедицинские технологии;

• Релевантное и альтернативное биомоделирование;

• Методы биомедицинских исследований;

• Лабораторные животные;

• Генетика лабораторных животных;

• Доклинические исследования новых медицинских технологий;

• Клинические исследования новых медицинских технологий;

• Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине;

• Новые регуляторные пептиды;

• Фармаконутриенты и спортивное питание;

• Информационные материалы и нормативные документы.

1.4. Общие требования к оформлению

1.4.1. Статью следует представлять в двух экземплярах с печатной и электронной версией текста, набранной в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12 на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Нумерация страниц – сверху по центру (на первой странице номер не проставляется).

1.4.2. На первой странице следует указать:

• предполагаемый раздел журнала;

• название работы;

• инициалы и фамилии авторов;

• учреждения, в которых была проведена работа;

• город или населённый пункт.

На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов). Латинские на-

звания должны быть выделены *курсивом*.

1.4.3. В конце статьи приводится список цитированной литературы (см. п. 1.4.10 «Литература»), осуществляется его транслитерация (раздел «References», согласно требованиям «Scopus»), проставляются собственноручные подписи всех авторов рукописи. На отдельных листах печатаются реферат и ключевые слова на английском языке; контактная информация – ФИО (полностью) автора, осуществляющего связь с редакцией, учёная степень (при наличии), почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

1.4.4. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу, содержащее разрешение на публикацию в открытой печати (или копию протокола заседания экспертного совета).

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

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

---

микробная культура, субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов.

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

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

#### 1.4.7. Статистическая обработка результатов и таблицы

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

#### 1.4.8. Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке

их упоминания в тексте. Если рисунок или фотография напечатаны на отдельных листах, на обороте должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов, название статьи, номер рисунка, «верх».

Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение.

Требования к иллюстрациям на дисках или компакт-дисках:

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

#### 1.4.9. Сокращения

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

#### 1.4.10. Литература

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

В списке литературы приводятся:

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

Пример:

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

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

Пример:

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

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

Пример:

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

- для сайта: ссылка на страницу в сети Интернет.

Пример:

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

## 1.5. Корректурa

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другой раздел журнала. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование.

## 1.6. Плата за публикацию и гонорар авторам

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

## 1.7. Адрес редакции

- Почтовый адрес: 143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, влад. 1. НЦБМТ ФМБА России, редакция журнала «Биомедицина».

- Электронные адреса:

ФГБУН НЦБМТ ФМБА России – [scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru);

отв. секретарь редакции Станкова Наталия Владимировна – [sinauva@yandex.ru](mailto:sinauva@yandex.ru).

## 1.8. Сроки опубликования работ

Максимальный срок между датами поступления рукописи в редакцию и опубликования в журнале составляет шесть месяцев. Уведомление авторов в случае отклонения статьи при предварительном рассмотрении главным редактором по причине явного несоответствия работы тематике журнала происходит в течение месяца после поступления рукописи в редакцию.

---

## **2. Порядок рецензирования статей, направленных в редакцию рецензируемого издания**

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

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

2.3. Для проведения рецензирования рукописей статей в качестве рецензентов могут привлекаться как члены редакционной коллегии журнала «Биомедицина», так и высококвалифицированные учёные и специалисты других организаций и предприятий, обладающие глубокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению (как правило, доктора наук, профессора) и имеющие публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних трёх лет.

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

2.5. Рецензенты уведомляются о том, что присланные им рукописи являются частной собственностью авторов и относятся к сведениям, не подлежащим разглашению. Рецензентам не разрешается делать копии статей для своих нужд. Рецензирование проводится конфиденциально (одностороннее «слепое»). Нарушение конфиденциальности возможно только в случае заяв-

ления рецензента о недостоверности или фальсификации материалов, изложенных в статье.

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

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

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

2.9. Если статья по рекомендации рецензента подверглась значительной авторской переработке, она направляется на повторное рецензирование тому же рецензенту, который сделал критические замечания.

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

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

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

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

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

2.15. Правила, предъявляемые к рецензиям на научную статью

Задача рецензирования – способствовать строгому отбору авторских рукописей для издания и предлагать конкретные рекомендации по их улучшению. Рецензия должна объективно оценивать научную статью и содержать всесторонний анализ её научных и методических достоинств и недостатков. Рекомендуемый объем рецензий – до 15 тыс. знаков (с пробелами), примерно до 1,5 страниц текста формата А4 кеглем 12.

2.16. Требования к содержанию рецензии на научную статью

Рецензент должен:

- определить соответствие материала, изложенного в статье, профилю журнала;
- оценить актуальность содержания статьи: соответствует ли уровень изложенного в ней материала современным достижениям науки и техники;
- оценить значимость полученных результатов исследований (научных, практических);
- указать, насколько учтены требования к оформлению материала статьи: соответствие объёма статьи, наличие аннотации на русском и английском

языках, наличие списка литературы и ссылок на него в тексте, контактной информации об авторах и др.;

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

- оценить полноту и достоверность приводимых сведений;

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

- дать оценку литературного стиля изложения материала;

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

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

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

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

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



---

## ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО

Главное военно-медицинское управление МО РФ,  
Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова,  
Научно-практическое общество баротерапевтов  
Санкт-Петербурга и Ленинградской области  
17-18 мая 2018 года проводят

### *Юбилейную X Всеармейскую научно-практическую конференцию «Баротерапия в комплексном лечении и реабилитации раненых, больных и поражённых»*

На конференции предполагается рассмотреть: теоретические и прикладные вопросы лечения раненых, больных и поражённых; проблемы реабилитации человека со сниженной работоспособностью различными видами и методами баротерапии; теоретические и практические положения гипербарической физиологии и водолазной медицины.

1. Гипербаротерапия: лечебная компрессия, лечебная рекомпрессия при специфических профессиональных заболеваниях водолазов, аэробаротерапия, оксигенбаротерапия, нормоксическая гипербаротерапия. Гипербарическая оксигенация как средство повышения работоспособности, лечения и реабилитации пациентов с различными заболеваниями.

2. Нормобарическая баротерапия: оксигенотерапия, карбогенотерапия, оксигенотерапия, интервальная гипоксическая терапия. Использование дыхательных смесей с различным парциальным давлением газов для реабилитации.

3. Гипобаротерапия: общая – непрерывная, периодическая; локальная – периодическая вакуумдекомпрессия, импульсная.

4. Диагностика, лечение и профилактика специфической профессиональной патологии лиц, пребывающих в условиях повышенного давления газовой и водной среды. Определение индивидуальной устойчивости к факторам гипербарии (проверка барофункции ушей и придаточных пазух носа, устойчивость к декомпрессионному газообразованию, токсическому действию высоких парциальных давлений азота и кислорода), устойчивость к гипоксии.

5. Меры безопасности при проведении сеансов баротерапии.

6. Контроль за проектированием и строительством отделений баротерапии.

Конференция состоится в Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова по адресу: 194044, Санкт-Петербург, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, ул. Академика Лебедева, д. 6. Проезд до станции метро «Площадь Ленина».

#### **Требования к оформлению тезисов**

Тезисы объемом не более одной машинописной страницы (формат RTF, шрифт 12, Times New Roman, количество

знаков в строке не более 70, поля 2,0 см, через 1,5 интервала, с отступом в начале абзаца) принимаются на бумажном носителе (1 экземпляр с подписями авторов), плюс – в электронном виде на USB-флеш-накопителе или компакт-диске и по электронной почте.

Убедительная просьба к авторам проверять электронные носители на наличие «вирусов».

Верхняя строка – инициалы и фамилии авторов жирным шрифтом (ФИО докладчика подчеркивается шариковой ручкой на бумажном экземпляре); ниже – заглавными буквами – название работы; ниже – учреждение, город; ниже – текст.

К высылаемым тезисам необходимо приложить **анкеты участников конференции**, в которых приводятся:

1. Фамилия, имя, отчество (полностью);
2. Ученая степень, ученое звание;
3. Должность и стаж в должности;
4. Адрес и телефон (рабочие и, желательно, домашний);
5. Название доклада и необходимые технические средства его сопровождения;
6. Необходимость прислать приглашение на конференцию (указать фамилию, имя, отчество руководителя и адрес учреждения, по которому необходимо выслать такое приглашение, а также количество приглашений и фамилию, имя, отчество приглашаемых).

### **Иванов И.И.**

#### **ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ОПТИМАЛЬНАЯ ДОЗА КИСЛОРОДА ПРИ ОДНОМ СЕАНСЕ ГБО (ОДНОРАЗОВАЯ ДОЗА)**

Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова, Санкт-Петербург

[iv.ivanov50@list.ru](mailto:iv.ivanov50@list.ru)

В исследовании по проблеме оптимальной дозы кислорода при гипербарической оксигенации принимали участие 88 практически здоровых мужчин в возрасте 24-34 лет...

Рассматриваться будут тезисы, отправленные в оргкомитет до **1 марта 2018 года** по адресу: **194044, Санкт-Петербург, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, ул. Академика Лебедева, д. 6, кафедра физиологии подводного плавания**, с пометкой «**Конференция-2018**», а также по электронной почте: [an.a.an@mail.ru](mailto:an.a.an@mail.ru), [arseniyshitov@mail.ru](mailto:arseniyshitov@mail.ru).

В марте-апреле 2018 г. в адрес участников конференции будут на-

правлены **приглашения** (при необходимости).

Для участников конференции 18 мая планируется культурная программа.

#### **Контакты:**

**Андрусенко Андрей Николаевич**  
тел.: +79818600591, +79046364436;  
e-mail: [an.a.an@mail.ru](mailto:an.a.an@mail.ru)

#### **Шитов Арсений Юрьевич**

тел.: +79117078780;  
e-mail: [arseniyshitov@mail.ru](mailto:arseniyshitov@mail.ru)

# Лабораторкорм

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

## Реализуем:

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



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

Доставка в любой регион России

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

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

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

[www.laboratorkorm.ru](http://www.laboratorkorm.ru), e-mail: [info@laboratorkorm.ru](mailto:info@laboratorkorm.ru)

на правах рекламы



## БИОМЕДИЦИНА

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

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

Постановлением Совета Министров СССР основной задачей Филиала является получение и выращивание лабораторных животных. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируруемыми по генетическим, физиологическим, морфологическим показате-

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

### Филиал «Андреевка» предлагает следующих животных:

**I. Морские свинки:** альбиносы и пестрые.

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

**III. Линейные мыши и крысы:**

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

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

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

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

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

– крысы **W1STAR** – белого окраса, альбиносы. Используются для онкологических исследований, для изучения поведенческих реакций.

**IV. Межлинейные гибриды мышей:**

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

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



141551, М.О., Солнечногорский р-н, п/о Андреевка, д. 49

Тел.: 8(495)536-09-18; 8(495)536-37-58

Факс: 8(495)536-28-33

E-mail: andreevka-kv@rambler.ru

