



БИОМЕДИЦИНА

2009 1

МЕДИЦИНА
ISSN 2074-5982

2009 1

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

В СЛЕДУЮЩЕМ НОМЕРЕ:

Наноэффективность: новые биомедицинские инициативы в фармакологии

Роль ядерных рецепторов в регуляции биотрансформации ксенобиотиков

Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLeprdb/+

БИОМЕДИЦИНА

В НОМЕРЕ:

Средства для обеззараживания объектов, контаминированных спорами *B.austriacus*

Спектральная мощность ЭЭГ крыс при интраперитонеальном введении фторсодержащих фуллеренов

Исследование гомозиготности двух сублиний BALB/cY и BALB/cP высоко инбредной линии BALB/c

НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
РАМН

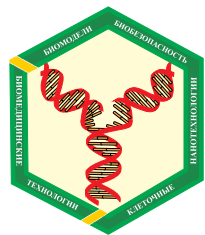
тема номера

страница 5

Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов

Научный журнал.

Основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор: академик РАН, член-корреспондент РАМН Н.Н.Каркищенко,

Г.Д.Капанадзе (к.с.-х.н., зам. главного редактора), Ю.С.Макляков (д.м.н.),
Е.Л.Матвеев (к.э.н., доц., ответственный секретарь), А.Н.Мурашев (д.б.н. проф.),
А.В.Муха (д.м.н., зам. главного редактора), Г.В.Раменская (д.ф.н., проф.),
А.О.Ревякин (к.б.н.), Д.В.Сахаров (к.б.н.), Х.Х.Семенов (к.б.н.), Д.А.Сычев (д.м.н., проф.)
А.А.Темнов (д.м.н.), В.В.Хоронько (д.б.н., проф.)

Редакционный совет:

prof. Hans-W.Ackermann (*Канада*), prof. Iorgen Backmen. (*Германия*), акад. РАМН и
РАСХН В.А.Быков, проф. Витан Влахов (*Болгария*), prof. Ralf Edwards (*Швеция*),
prof. Moineau S.-F. D'Herelle (*Канада*), акад. РАМН С.И.Колесников,
акад. РАМН А.А.Кубатиев, акад. РАМН В.Г.Кукес, prof. Michael Orme (*Великобритания*),
акад. РАН А.И.Мирошников, акад. РАН и РАМН М.А.Пальцев, акад. РАМН В.И.Петров,
акад. РАМН К.В.Судаков, prof. Solemene Umberto (*Италия*), акад. РАМН В.П.Фисенко,
член-корр. РАМН Д.Ф.Хритининцроф. Б.Д.Цыганков, акад. РАМН В.Н.Ярыгин

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

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

Адрес редакции:

105064, Москва
Малый Казенный пер. 5, стр. 1
matveenkoel@mail.ru
Тел.: 561-52-64, 917-32-17

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Н.Н.Каркищенко. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов..... 5

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

М.Ю.Озеров, В.Н.Каркищенко, Д.В.Попов, С.Ю.Пчелинцев, В.Г.Попов, Д.А.Гришин. Средства для обеззараживания объектов, контаминированных спорами *B.anthraxis*..... 28

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Н.Н.Каркищенко, Д.С.Сахаров, А.А.Филиппов, В.Б.Соколов. Изменения спектральной мощности ЭЭГ крыс после интраперитонеального введения фторсодержащих производных фуллерена-60..... 38

ГЕНЕТИКА

Х.Х.Семенов, Н.Н.Каркищенко, Т.Б.Бескова, Е.Л.Матвеевко. Исследование гомозиготности двух сублиний BALB/cY и BALB/cP высоко инбредной линии В ALB/c..... 49

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Е.В.Ших, Н.М.Милотова. Роль полиморфизма гена VDR, кодирующего рецептор витамина D, в патогенезе артериальной гипертонии..... 55

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Т.В.Брайловская, Т.А.Федорина. Морфологическая характеристика течения раневого процесса при экспериментальном моделировании резаных и рвано-ушибленных кожных ран..... 68

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

В.Н.Каркищенко, М.В.Рудковский. ЭЭГ мониторинг с применением метода многомерного шкалирования при антидепрессивной монотерапии моклобемидом..... 75

CONTENT

REVIEWS

N.N.Karkischenko. Nanosafety: new approaches to estimation of risk and nano-materials toxicity..... 5

BIOSAFTNESS

M.Yu.Ozerov, V.N.Karkischenko, D.V.Popov, S.Yu.Pchelintsev, V.G.Popov, D.A.Grishin. Means for disinfection of objects contaminated by B. anthracis spores..... 28

NANOBIOTECHNOLOGIES

N.N.Karkischenko, D.S.Sakharov, A.A.Filippov, V.B.Sokolov The changes of EEG power spectra after intraperitoneal injection of fluorine-containing C60 fullerene derivatives..... 38

GENETICS

H.H.Semenov, N.N.Karkischenko, T.B.Beskova, E.L.Matveenko. The study of homozygosis in two substrains BALB/cY and BALB/cP of high inbred BALB/c strain..... 49

CLINICAL PHARMACOLOGY

E.V.Chih, N.M.Milotova. The role of coding vitamin D receptor VDR gene polymorphism in pathogenesis of hypertension..... 55

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

T.V.Brailovskaya, T.A.Fedorina. Morphological characteristic of wound process under experimental modeling of incised and tear-contused skin wounds..... 68

BRIEF REPORTS

V.N.Karkischenko, M.V.Rudkovsky. EEG monitoring with method of multidimensional scaling under antidepressed monotherapy by moclobemid..... 75

**ПОЗДРАВЛЯЕМ
с 75-летием академика РАМН
Кукеса Владимира Григорьевича**



8 сентября 2009 года исполняется 75 лет со дня рождения директору филиала «Клиническая фармакология» Научного центра биомедицинских технологий РАМН, выдающемуся ученому, педагогу, академику РАМН Владимиру Григорьевичу Кукесу.

В 1957 году Владимир Григорьевич с отличием окончил лечебный факультет 1 Московского медицинского института им. И.М.Сеченова, где он в период с 1960 по 1962 годы проходил клиническую ординатуру

на кафедре пропедевтики внутренних болезней. Со студенческой скамьи Владимир Григорьевич проявлял большой интерес к научной работе. Успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а затем и на соискание ученой степени доктора медицинских наук.

Владимир Григорьевич стоял у истоков создания кафедр клинической фармакологии в России. С 1985 года он возглавляет кафедру клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней медицинской академии им. И.М.Сеченова. С 1992 года возглавляет Институт клинической фармакологии ФГУ НЦ ЭСМП. Владимир Григорьевич – один из пионеров многих научных направлений клинической фармакологии, в том числе по оптимизации фармакотерапии, фармакокинетики, фармакогенетики, метаболизму лекарственных средств.

За свою многогранную научную и педагогическую деятельность Владимир Григорьевич удостоен Государственной премии СССР (1985), премии г.Москвы в области медицины (2004), лауреат премий Правительства РФ (2007, 2008).

Огромный творческий опыт ученого, клинициста Владимир Григорьевич передает молодым коллегам. Он автор более 370 научных статей в российских и иностранных медицинских журналах, 21 монографии, в том числе 10 учебников. Научный руководитель 157 кандидатских диссертаций и научный консультант 69 докторских диссертаций, имеет 14 патентов, заслуженный деятель науки РФ. Инициатор, научный редактор и автор руководства по проведению клинических исследований лекарственных средств и руководства по экспериментальному доклиническому исследованию новых фармакологических веществ.

Человек высокой культуры, необычайной скромности, Владимир Григорьевич пользуется заслуженным авторитетом у коллег не только в нашей стране, но и далеко за ее пределами.

Коллектив Научного центра биомедицинских технологий РАМН., редакция журнала «Биомедицина» сердечно поздравляет с юбилеем и желает здоровья и дальнейших творческих успехов.

**Коллектив Научного центра биомедицинских технологий
и редколлегия журнала «Биомедицина»**



Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов

Н.Н.Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Уникальные свойства наночастиц ограничивают возможности прогнозов, которые могут быть сделаны из наших знаний о больших веществах. Необходимо собирать информацию о размерах частиц, их структуре и квантово-механических механизмах, а также о функциях, способности взаимодействовать с протеинами и тканями. Необходимы тесты *in vitro* для определения безопасности или рисков от использования наночастиц, выяснения их избирательной токсичности и токсикокинетики. Присоединение к фуллеренам C₆₀ пиридинов и пиримидинов усиливало их избирательную нейротропную активность, но в 3-5 раз повышало их общую токсичность. Опыты *in vitro* должны стать основой для лучшего предсказания возможной токсичности наночастиц и снижения числа использованных животных. Необходимы применение гетерогенных и генномодифицированных линий животных, переход от моделей-животных к животным моделям и использование компьютерного моделирования в нанобиотехнологиях.

Ключевые слова: нанориски, наномишени, фуллерены, избирательная нанотоксичность, биомоделирование нанопроцессов, модели животных.

Наночастицы, наноматериалы и нанотехнологии их производства кардинально отличаются по своим свойствам и эффектам, комплексу физических, химических и биологических свойств от веществ в форме макроскопических дисперсий и сплошных фаз. Безопасность наноматериалов и нанотехнологий является важнейшим фактором, регламентирующим промышленное производство и внедрение в здравоохранение нанопродуктов. Для абсолютного большинства наноматериалов не известны механизмы поступления в организм, биосовместимости, биотрансформации, транслокации в органах и тканях, элиминации и, что особенно важно, их токсичности. В

России, США, странах Евросоюза, Канаде, Японии, Китае и других странах ведутся обширные исследования по оценке безопасности и потенциальных рисков, связанных с производимыми наноматериалами [5, 11]. В России разработаны и в 2007 году утверждены Постановлением Госсанэпиднадзора «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» и Приказом Роспотребнадзора – методические рекомендации «Оценка безопасности наноматериалов» [<http://stroy.databases.ru/Data1/52/52003/index.htm>].

Биомишени токсического действия для наноматериалов

Определим основные термины, понятия нанотехнологий и примерную классификацию наноматериалов.

Нанотехнологии – совокупность принципов, методов и технологий, развивающихся на атомном, молекулярном или макромолекулярном уровне, направленных на создание и использование структур, способов и систем модификации объектов и/или их компонентов в масштабе 1-100 нм, обладающих принципиально новыми свойствами и функциями.

Наноматериалы – продукция и материалы, содержащие структурные элементы в виде наночастиц, обладающие качественно новыми свойствами, позволяющими осуществлять их интеграцию в полноценно функционирующие микро- и макросистемы.

Нанориски – количественные или качественные проявления негативного воздействия наноматериалов на здоровье и репродуктивные последствия людей и животных и среду их обитания.

Критерии нанобезопасности – отсутствие или крайне низкий уровень объективных параметров нанорисков в отношении человека и окружающую среду.

Нанотест-системы – биомедицинские, физические, химические, информационные модели для оценки, валидации и экспертизы наноматериалов и нанотехнологий.

В соответствии с современными представлениями о форме, составе и физико-химических свойствах наноматериалов, можно выделить следующие направления исследований:

– углеродные наночастицы (фуллерены, нанотрубки, графены, нанопены, нанопровода и др.),

– неуглеродные простые наночастицы на основе кремния, магния, цинка, титана, золота, серебра и др. металлов,

– квантовые точки, нанороботы,

– наночастицы бинарных и композитных соединений,

– препараты наночастиц полимеров, биополимеров и др. сложных веществ.

Учитывая особенности поступления наночастиц в организм человека и животных, основными органами-мишенями являются ткани дыхательной, интестинальной, иммунной, кожной систем, а критичными по последствиям действия наноматериалов являются головной мозг, костный мозг, репродуктивные и выделительные органы. Отсутствие единой шкалы приоритетов для оценки безопасности всего многообразия наноматериалов и низкая информативность, а, зачастую, неприменимость традиционных токсико-гигиенических характеристик к наноразмерным структурам, делает необходимым поиск и использование новых биомедицинских подходов к их оценке.

Можно полагать, что мишенями для наночастиц, в том числе углеродных, являются биологические макромолекулы (ДНК, РНК, белки), биологические мембраны, в том числе гистогематические (ГГБ), гематоэнцефалические (ГЭБ) барьеры, системы окисления-восстановления, в том числе перекисного.

Молекулы фуллеренов (C_{60} и C_{70}) обладают высокой электроотрицательностью, что позволяет использовать их для направленного транспорта различных

Таблица

Изменение усредненных биохимических показателей в крови крыс через 3 часа после введения исследованных фуллеренилов в дозе 300 мг/кг

Показатель	Норма	Фуллеренилы
Глюкоза, mmol/l	7-8	7-7,5
АЛТ, U/l	32-38	29-31
АСТ, U/l	70-160	100-140
Щелочная фосфатаза, U/l	350-450	90-140

веществ и лекарств. Направленная доставка р-циклодекстрина с «привязанным» остатком фуллерена обеспечивала высокую ДНК-расщепляющую активность при освещении видимым светом [26]. Высокая эффективность биологического действия также достигается за счет объединения в одной молекуле и действующего начала (фуллерена как «генератора» синглетного кислорода), и системы его направленной доставки к молекуле-мишени (катионные группы связываются с анионными группами ДНК) [38].

Наночастицы соизмеримы с биологическими молекулами, вирусами, и, благодаря своим размерам, могут иметь новые химические и биологические свойства по сравнению с материалами бо́льших размеров. Они также могут входить и проникать в организм, взаимодействовать с клетками и тканями, недоступными для больших частиц способами. Наночасти-

цы захватываются клетками и попадают в неожиданные внутримолекулярные пространства (например, митохондрии или ядро) [2, 5, 8, 29].

Обратимся в качестве примера к фуллеренам, которые мы исследовали на протяжении ряда лет. Фуллерены C_{60} считаются малотоксичными (1200-2500 мг/кг). Соединения C_{60} с глутатионом, цистином или бета-аланином [21] являются альтернативными акцепторами свободных радикалов с хорошей биосовместимостью и отсутствием видимой токсичности. Многогидроксильные фуллерены также являются хорошими антиоксидантами [14]. $C_{60}(OH)_{24}$ – фуллеренол обладает защитным действием в отношении вызываемого доксорубицином оксидантного стресса [22]. Некоторые исследователи считают, что защитное действие фуллеренила возможно, когда оксидантный стресс в клетках печени слишком высок. В нормальных же условиях $C_{60}(OH)_{24}$ вызывает гепатотоксический эффект [22]. Несмотря на противоречивость немногочисленных данных по их физиологической активности, следует отметить, что фуллеренол в концентрации 30 нмоль предохраняет ткани ЦНС от повреждения, вызванного оксидантным стрессом, нормализует поведенческие реакции, устраняет явления энцефалопатии [37].

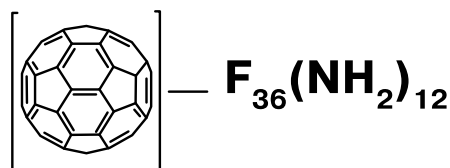


Рис. 1. Структурная формула фуллеренила $C_{60}-F_{36}(NH_2)_{12}$

Сотрудником нашего Центра к.б.н. Д.С.Сахаровым было показано, что при интраперитонеальном введении крысам модифицированных фуллеренов в разных дозах в динамике отмечались изменения спектральных мощностей электрической активности мозга (СМЭАМ) в частотной полосе от 1 до 45 Гц, преимущественно во фронтальных и теменно-затылочных областях коры (рис. 2).

Таким образом, можно констатировать способность фуллеренов распространяться в организме и взаимодействовать с различными органами-мишенями, вмешиваться в интимные внутримозговые регуляторные процессы. Одним из приоритетных органов-мишеней для фуллеренов является головной мозг. Но дальнейший прогресс в понимании механизмов действия, поиске и детализации мишеней для фуллеренов требуют иных подходов к биомоделированию на наноразмерном уровне.

Целью таких моделей должны стать ответы на такие вопросы как:

- каким путем наночастицы проникают в органы-мишени?
- могут ли наночастицы получить доступ к тканевым пространствам и приводить к системной токсичности?
- применима ли концепция химической адсорбции к наночастицам?
- каковы риски после местного и системного применения наночастиц?
- каково отношение наночастиц к липидным доменам, протеинам и способны ли они доносить лекарства, используя природные наноносители?
- как взаимодействуют наночастицы с рецепторами и модифицируют ли они эффекты лекарств?
- каковы механизмы проникновения наночастиц через ГГБ и ГЭБ?

— какова токсикокинетика наночастиц и влияет ли она на кинетику лекарств и других ксенобиотиков?

— могут ли они инициировать воспаление?

— модифицируются ли в организме углеродные наночастицы?

— каковы проявления эффектов и механизмы токсичности нанометаллов?

Это далеко не все вопросы, требующие незамедлительного ответа, хотя по некоторым из них уже имеются научные результаты. Так, частицы цинка и оксида титана, используемые в продуктах для ухода за кожей, способны проникать через барьер *stratum corneum* кожи кролика, с наивысшим поглощением из водяных и масляных растворов [20]. Известны различия между наночастицами и «традиционными» опасными химическими веществами, которые заключаются в том, что дезактивация наночастиц значительно более сложная и менее эффективная ввиду их твердой структуры, чем для обычных химических веществ из-за их растворимости.

Наночастицы уже используют в косметических средствах, таких как отбеливатели в зубных пастах, отражающих материалах в солнечных экранах, серебряные наночастицы используют в антисептических покрытиях. Наночастицы используют также в лекарствах, которые вводят через кожу, легкие или непосредственно в большой орган. Такие новые свойства дают большие возможности, но ставят вопрос о безопасности наночастиц [29].

На уровне наших современных знаний о природе взаимодействия наночастиц с биологическими субстратами можно составить многостраничный труд, заполненный одними лишь вопросами.

Но жизнь требует ответа уже сегодня, что диктует необходимость внесения новых биомедицинских инициатив по оценке нанобезопасности и наноэффективности современных материалов.

Для установления органных, тканевых и атомно-молекулярных мишеней для наночастиц требуется построение и создание принципиально новых моделей, переход от животных-моделей к моделям животных, альтернативное, математическое и компьютерное моделирование, осуществляемое на принципиально новых основах.

Идентификация рисков наноматериалов

Наночастицы с размерностью 1-100 нм имеют совершенно иные физико-химические параметры, механизмы и точки биомедицинского приложения. Это связано с нахождением большинства атомов на межфазной, внешней поверхности частиц, что в свою очередь обуславливает новые для медиков и биологов *квантово-механические* закономерности их действия. Иные электромагнитные, спектральные, физико-химические, биологические механизмы проявляются в уникальности мембранопроницаемости, антимикробного действия, влияния на регуляторный аппарат живых клеток, в том числе генный, в наличии особой механической прочности наноструктур и т.д. Развитие нанотехнологий и создание новых наноматериалов, обеспечивая научно-технический прогресс будущего, в то же время создает зону риска для человека и окружающей его среды.

До последнего времени наночастицы в аспекте *рисков* систематически не изучались, но некоторые эпидемиологи-

ческие исследования с их использованием были проведены [31]. Дополнительно был выявлен ряд факторов неблагоприятного влияния наноматериалов в различных организмах и окружающей среде [30, 36]. Фармацевтическое использование также было источником информации о потенциальной транслокации наночастиц от сайта внесения к периферийным областям организма [15].

Крайне противоречивые данные касаются нанобезопасности фуллеренов. По одним данным фуллерены C_{60} имеют общую токсичность на уровне 2500 мг/кг, по другим 1200-1500 мг/кг. Если согласиться с данными об их крайне низкой общей токсичности, то трудно объяснить данные ряда авторов, согласно которым фуллерен C_{60} токсичен по отношению к эритроцитам крыс и человека, при этом его токсичность не связана с оксидантным стрессом [4]. Предполагается токсичность и водорастворимого фуллерена C_{60} [7].

Хотя существуют серьезные данные по фуллерену и его производным, в которых авторы не отмечают *in vivo* ни острой, ни хронической токсичности, однако факт накопления фуллеренов в организме является, безусловно,стораживающим, если не отрицательным, при рассмотрении возможностей применения фуллерена в медицине [25]. В отличие от фуллерена C_{60} , нанотрубки, смешанные углеродные наночастицы ускоряли сосудистый тромбоз [32].

В тестах для наночастиц необходимо особое внимание уделить характеристике состоящих из них наноматериалов. При оценке нанобезопасности полученных инженерными способами наноматериалов, таких как фуллерены, одно- и многослойные углеродные трубки, ок-

сиды металлов наноразмеров, такие как TiO_2 , частицы с диаметром в нанометр низкой растворимости, считающихся наноматериалами, должны быть найдены принципиально новые процедуры изучения токсичности и точек окончания эксперимента при *ингаляционном, пероральном и трансдермальном* путях проникновения наночастиц.

Ингаляционные риски. Переносимые по воздуху дискретные наночастицы преимущественно двигаются конвекцией и диффузией. Частицы такого размера осаждаются преимущественно в дыхательных путях путем диффузии [24]. Наночастицы могут проходить через биологические мембраны и ткани, которые непроницаемы для больших частиц. Показано проникновение частиц диоксида титана (TiO_2) наноразмера в интерстиций легких, а кинетика иридия включает транслокацию его во вторичные органы [20, 35]. Эффекты ингаляционного влияния наноматериалов могут проявляться и вне дыхательных путей. Изучены эффекты загрязнения воздуха и показано, что повышение смертности прямо связано с чистыми частицами [16]. Исследования учитывали изучение респираторных и кардиоваскулярных эффектов. В хорошем обзоре относительно судьбы наночастиц, описана их деградация в легких и потенциальный провоспалительный и оксидативный стресс, как нанозависимый клеточный отклик [10].

При введении крысам C_{60} в дозах 1,5 и 3 мг/кг эндотрахеально, с использованием воды как транспортного средства, уже через сутки обнаружили увеличение результатов перекисного окисления липидов в жидких продуктах бронхоальвеолярных полостей. Те же изменения отмечались и спустя 3 месяца, при этом

не наблюдалось больше никаких негативных изменений в структуре и функциях тканей легких [35].

Токсикологи как никогда нуждаются в новых технологиях получения информации об эффектах влияния дискретных наночастиц для понимания воздействия наноматериалов, поскольку силы сцепления, поддерживания наночастиц как агрегатов и агломератов, также как и их аэродинамический диаметр, влияют на их способность переноситься по воздуху, поступать в организм и распределяться в нем. Процедуры оценки функционирования основных тканей и органов могут стать хорошей базой для контроля на животных, хотя могут быть не менее важны альтернативные подходы, включая клеточный, субклеточный уровни и математическое моделирование [1, 3, 20, 34].

Пероральные риски. Одним из важнейших путей проникновения наночастиц, по-видимому, является желудочно-кишечный тракт. Проникновение наночастиц от 10 до 100 нм через стенки желудочно-кишечного тракта наблюдаются при обычном и принудительном кормлении через зонд [20]. Хотя имеющиеся данные указывают, что при пероральном введении фуллерены не всасываются, не эффективны и экскретируются, прежде всего, с калом [20], отрицать способность наночастиц преодолевать ГТБ в стенках желудка и кишечника было бы опрометчиво.

Трансдермальные риски. Пока нет информации о том, могут ли наночастицы проникать через эпидермальный барьер и аккумулироваться в тканях дермы. Аvascularный эпидермис может являться депо для наночастиц, недоступных для переноса фагоцитами. Прин-

ципиально важным является выявление рисков развития воспаления в кератиноцитах, оценки процессов дезактивации наночастиц в коже и особых условий растворимости наночастиц в липопротеидных эпидермальных структурах.

Наноматериалы и наночастицы способны проникать в *stratum corneum* и оказывать токсическое воздействие на нижние слои. Адсорбция наночастиц может осуществляться путем: перемещения по межклеточному фосфолипидному пути, внутриклеточно (возможно путем эндоцитоза), межклеточно, через волосяные фолликулы или потовые протоки. За счет дополнительного транспорта наночастицы могут подвергаться экскреции [20].

В настоящее время развиваются модели *in silico* и *in vitro* для замены животных при исследовании наноматериалов. Существующие методы *in silico* ставят своей целью определить чувствительность кожи к определенным наноматериалам. Модели и экспертные системы QSAR отображают риск и/или потенциальную информацию через идентификацию влияния основных компонентов или их комбинаций на животных, если

данные введены ранее в базу. Несмотря на отсутствие в системе данных по токсикологическим точкам окончания эксперимента для человека или детальных руководств, как именно оценивать риск для человека, система позволяет выявить ранние фазы чувствительности кожи к наноматериалам без использования тестов на животных [27].

Существует ли избирательная токсичность на наноуровне?

Уникальные физико-химические свойства, которыми обладают наноматериалы, требуют изучения возможных рисков и вреда, наносимых человеку и окружающей среде, а также развития лучшего фундаментального понимания моделей воздействия наноматериалов как факторов, которые продвигают всесторонние исследования токсикологии и оценки безопасности.

Исходя из классического деления фармакологических и токсических веществ на *агонисты* и *антагонисты*, к которым априори можно отнести все наноматериалы, следует обратить особое внимание на известный постулат А.Альберта, что

«токсичность антагонистов является их наиболее ценным свойством, поскольку... служит на благо здоровья человека» [9]. Не обсуждая спорность такого взгляда, согласимся с тем, что для

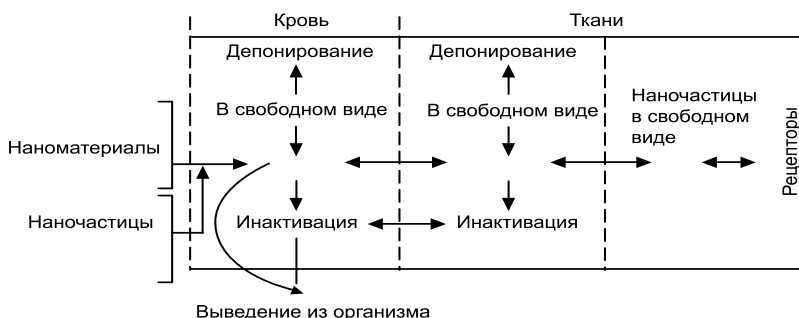


Рис. 3. Теоретические принципы адсорбции, распределения и выведения наноматериалов, а также комплементарности наночастиц с рецепторами.

искомых нановоздействий во многих случаях была бы важна *избирательная токсичность*.

Для многих лекарственных средств характерна следующая закономерность: при условии полной обратимости токсического действия и избирательности эффектов, они тем *ценнее*, чем *токсичнее*. Данное заключение отнюдь не парадокс, а фармакологический факт не только для лекарств, но, по-видимому, и для веществ наноразмерного уровня. Однако мы должны учитывать, что в отношении наноразмерных частиц не могут быть в полном объеме приложимы наши представления о физико-химических механизмах, поскольку в силу вступают квантово-механические закономерности. Уже имеющиеся публикации о позитивных и неблагоприятных эффектах наноматериалов крайне противоречивы. Проиллюстрируем на примере фуллеренов.

Известно, что в результате *реакций замещения* химических веществ образуются соединения того же класса, а *реакции присоединения* дают соединения другого класса. Однако для наночастиц, включая фуллерены, реакции замещения *невозможны*, так как в них *ничего замещать*. А при присоединении любых атомных или молекулярных структур, фуллерены остаются соединениями того же класса.

Фуллерены C_{60} с такой легкостью присоединяют свободные радикалы [6], что позволяет назвать эту молекулу «губкой для радикалов». Это предопределяет их антиоксидантную активность и целый ряд уникальных фармацевтических свойств, с различными порогами острой токсичности.

Синтезированные А.А.Филипповым по нашему предложению C_{60} -фуллеренилы, содержащие пиридины и пи-

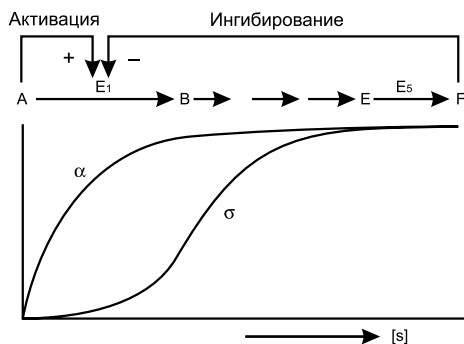


Рис. 4. Гипотетически кинетика наночастиц и наноматериалов соответствует кинетике аллостерических или регуляторных ферментов в процессе биотрансформации веществ. А – субстрат, F – продукт, В-Е – промежуточные соединения, E1 – E5 – ферменты.

римидины, обнаружили высокую избирательную токсичность, чем исходные продукты. Так, четвертичная водорастворимая аммониевая соль фторфуллеренпиридилийфторида $C_{60}[FNC_5H_5]+F-$ уже в дозах 300 мг/кг обнаруживала признаки острой токсичности в отношении головного мозга и ряда паранхиматозных органов. Избирательность действия этих фуллеренилов на мозг установлена нами методами оценки СМЭАМ и нарушения когерентных связей в основных зонах конвекситальной коры головного мозга крыс.

Рассматривая взаимодействие наночастиц, как и любых других веществ с тканями, легко представить его в виде занятых ими комплексов реакционно-активных групп. Подобное явление описывается в рамках *оккупационной теории*. И.Ленгмюр показал четкую взаимосвязь физики и химии таких взаимодействий. После его работ стала понятна суть явления адсорбции, обусловленного суммой всех химических связей (ван-дер-ваальсовыми, водородными, ионными, ковалентными, электростатическими

и т.д.). Но пока не ясно, насколько приложима оккупационная теория к квантово-механическим процессам, по законам которых работают наночастицы.

Примером регуляторов в биологических системах может стать инактивация наноматериалов как токсикантов (рис. 3). Первый фермент в мультиферментных системах биотрансформации является обычно регулятором. Поскольку аллостерические ферменты часто участвуют в регулировании (регуляторные ферменты), роль сигнала управления (α) играет эффектор (положительный – активатор, отрицательный – ингибитор) (рис. 3-4).

Кинетика ферментативных реакций в отношении токсиканта протекает в присутствии эффектора и характеризуется графически либо сигмоидной кривой, либо изменением наклона кривой в присутствии эффектора. Таким образом, закон действующих масс (Гульдберг-Вааге) подчеркивает механизм обратной связи (рис. 4).

Согласно Ленгмюру, если при адсорбции не происходит образование ковалентных связей, то это – обратимый процесс, когда положение его равновесия устанавливается в соответствии с законом действующих масс (рис. 4). Из этого закона Ленгмюр вывел уравнение:

$$\frac{X}{m} = \frac{abc}{1+ac}$$

где X – масса адсорбированного вещества, m – масса адсорбента, c – концентрация неадсорбированного вещества, a и b – константы.

Это уравнение показывает, что адсорбент насыщается при высоких значениях c . Если $c > 1$, то правая часть уравнения равна b . Мы привели некоторые

представления из оккупационной теории и уравнение Ленгмюра потому, что они поясняют, почему при каждом последующим удвоении дозы лекарств на основе нановеществ их позитивный эффект может быть менее ощутимым, а *токсический* способен возрастать. При этом кривая зависимости эффекта от дозы должна бы представлять собой гиперболу для наносубстанций (рис. 4).

Но будут ли наночастицы подчиняться уравнению Ленгмюра, а их проявления укладываться в границы оккупационной теории? Следующие примеры, по крайней мере, не отрицают такую вероятность. Показано, что агрегаты наночастиц, вероятно, могут быть объектом механизма нормального макрофагового клиренса. Продемонстрировано [31], что при последующих внутритрахеальных вливаниях ультрачистых частиц TiO_2 , они были фагоцитированы альвеолярными макрофагами, которые предотвращали как реакцию воспаления легких, так и проникновение ультрачистых частиц в промежуточные ткани. Однако наночастицы способны вызывать воспаление в дыхательных путях, вероятно как следствие вовлечения в процесс относительно большой площади поверхности. В исследованиях [10] ингаляции $10 \text{ мг/м}^3 \text{ TiO}_2$ в течение 13 недель вызвали воспаление легких у крыс и мышей, аналогичное вызванному значительно более высокими дозами чистого TiO_2 .

В процессе биомоделирования адсорбционных способностей наночастиц в коже и других тканевых структурах в целях установления избирательной токсичности наноматериалов, краеугольным камнем является корректность в планировании и проведении экспериментов. Другим краеугольным камнем исследо-

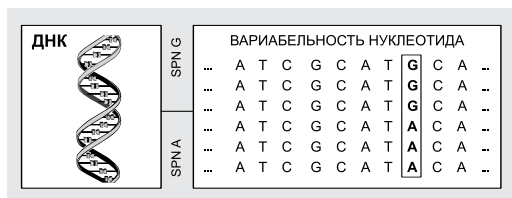


Рис 5. Идентификация SNPs для различных популяций лабораторных животных, связанных с вариабельностью нуклеотидных последовательностей в нанотехнологиях.

ваний избирательной токсичности является поиск и выбор альтернативных моделей. Исследования *in vitro* показали, что многослойные углеродные нанотрубки (не являющиеся оптимизированными для биологических приложений) способны инициировать раздражение в эпидермальных кератиноцитах человека, которые являются первичной процедурой локального изучения [28]. Иными словами необходим выбор путей: использования клеточных культур *in vitro*, диффузии через клетки, системных моделей кожи или иных тканевых барьеров. В качестве модели *in vivo* используется кожа крыс или мини-свиньей. Однако существуют ограничения в получении качественных и количественных показателей при изучении избирательной токсичности наноматериалов *in vivo*. В некоторых случаях было бы лучше изучать взаимодействие *in vitro* для оценки стартовой дозы токсичности в *in vivo*-эксперименте.

Сочетание *in vivo*-методов с альтернативным моделированием позволит уже на этом этапе изучения наноматериалов выяснить: в какой мере *избирательная токсичность* присуща наносубстанциям и каким из них? В свою очередь это поможет открыть пути для конструирования лекарств с неожиданными и крайне важными для медицины свойствами.

Нанотоксикология: новые подходы к животным-моделям

Большинство токсикологов понимают необходимость контроля за внутрииндивидуальной изменчивостью. Но большинство из них такой контроль не любят и избегают его, поскольку он снижает норму сигнал/шум, лежащую в основе ошибочно отрицательных результатов. Токсикологи, конечно, учитывают, что животные должны быть одинакового веса, должны иметь одинаковую диету, быть свободными от болезней, и находиться в контролируемой внешней среде. Они также должны быть одинаковы по биомаркерам токсичности, которые токсикологи предполагают измерять. Но не все понимают, что это может быть достигнуто исключительно за счет использования *гетерогенных, инбредных, геномодифицированных* или *нокаутных* линий. А это для токсикологов далеко «не поле чудес», с безрадостными объемами исследований на крысах и крупных животных [12].

В то же время мировой опыт показывает, что в токсикологических исследованиях именно мыши (49,3%) являются наиболее часто используемым видом, далее следуют крысы (15,8%), не-млекопитающие (14,4%), сельскохозяйственные животные (7,6%), мелкие млекопитающие, исключая крыс и мышей (6,9%), приматы (4,3%) и другие животные (1,6%).

Индивидуальные особенности включают генетические и не-генетические компоненты. Токсикологи пытаются контролировать не-генетические компоненты, но не делают даже попыток контролировать генетические особенности. Еще Russell и Burch указывали, что «в

токсикологических тестах надо использовать гетерогенных животных» [33], что при оценках наноматериалов становится не только желательным, но и обязательным условием.

Клинико-генетические наблюдения различий лекарств и токсикантов дали толчок к развитию токсикогенетики. Подчеркнем, что токсикогенетика изучает общие особенности генетической детерминированности, а геномика объясняет индивидуальные различия эффекта токсикантов. Индивидуальные особенности человека и животных определяются вариабельностью нуклеотидных последовательностей, например SNP G и SNP A (рис. 5).

Не вызывает сомнения, что наночастицы взаимодействуют с ДНК и вмешиваются в генетические процессы организма. Это относится и к металлам, и к двуокиси кремния, и к углеродным частицам. Хотя основная совокупность данных свидетельствует о том, что сам фуллерен и некоторые его производные ни остро, ни хронического жесткого токсического действия в условиях *in vivo* и *in vitro* не проявляют, тем не менее, это утверждение справедливо только в тех случаях, когда не проявляются фотодинамические свойства и не образуются при действии света активных форм кислорода (АФК).

Установлено, что фуллерен C_{60} индуцировал в клетках саркомы у мышей и глиомы у крыс и человека образование АФК, после чего наблюдался некроз с повреждением мембраны клетки, без измельчения ДНК, в то время как соединение этого фуллерена с гидроксильными группами $C_{60}(OH)_n$ вызывало апоптоз с разрушением ДНК и отсутствием асимметрии в проницаемости мембраны [23].

Способность связываться с двухцепочечной ДНК позволяет расщеплять ее при облучении видимым светом вследствие катионно-водорастворимого производного фуллерена [38].

В этом случае высокая эффективность биологического действия также достигается за счет объединения в одной молекуле и действующего начала (фуллерена как «генератора» синглетного кислорода), и системы его направленной доставки к молекуле-мишени (катионные группы связываются с анионными группами ДНК). Поэтому абсолютно необходимы новые подходы к дизайну экспериментов по оценке наноматериалов на гетерогенных животных, принципы которых разработаны и хорошо оптимизированы [17].

При оценке наночастиц и наноматериалов оправдано использование нового теста на 28-дневную токсичность, который включает 4 уровня доз, на крысах обоего пола в количестве 10 аутобредных голов в каждой группе, всего – 80 голов, например, WAG или Wistar. Для минимизации использования животных, в эксперимент включают 3-5 линий крыс (например, линии WAG/GY, F344/Y, BK/Y, AUG/LacY, LEW/Y, созданные или поддерживаемые в нашем Центре) по 3 головы от каждой линии вместо 10 голов WAG. Этот эксперимент будет включать: 4 уровня доз, животных двух полов, три линии и 3 крысы в каждой группе, всего – 72 крысы. Какие достоинства, преимущества и чувствительность у этого эксперимента?

Выбор линии. Генетическое подобие среди имеющихся в наличии линий мышей и крыс всегда существует, как и информация об их продолжительности жизни, спонтанных патологиях и дру-



Рис. 6. Мыши линии B10.GFP, все их органы, ткани, клетки и субклеточные структуры флуоресцируют в ультрафиолетовом облучении.

гих характеристиках линий. Данные по контролю за животными можно собрать очень быстро, и они будут более надежными, чем текущие данные по аутбредным стокам, которые не проверяют на аутентичность [12].

Практичность эксперимента. Не составит труда использовать 12 голов крыс обоего пола (пара пометов) каждой из трех линий. Проведение эксперимента ничем не отличается от традиционного. Чтобы сделать его еще практичнее, можно взять три линии с разным окрасом, и разделить его на три небольших эксперимента, включающего по 24 животных. Результаты можно объединить в процессе статистического анализа. Цель эксперимента – сравнение *наноматериалов*, их *доз*, а не *линий*.

Новые знания. Минимальное количество животных на дозу \times пол \times количество групп в эксперименте должно быть 2, если генетические вариации в отклике определены (каждая крыса WAG генетически отличается и генетические вариации не определены). Поэтому, в принципе, возможно проведение эксперимента с 2 крысами каждой из 5 линий. Чем

больше линий, тем меньше практическая значимость, но *больше* учет *генетической восприимчивости* в эксперименте с получением адекватной информации и *новых знаний*.

Чувствительность и преимущества. Проведен небольшой эксперимент по изучению хронического действия фуллеренола в дозах 25, 50 и 100 мг/кг, вводимых еженедельно. Сравнялось действие на группе крыс WAG по 8 животных на каждую дозу по сравнению с экспериментом, включающим 2 животных из 4 инбредных линий. Норма сигнал/шум была существенно выше в группах инбредных животных. Инбредные линии показали ярко выраженную токсичность доксорубина и протективное действие фуллеренола на сердце и печень [22], в эксперименте только с WAG это выявлено не было. Это дает преимущество в уменьшении количества животных в эксперименте, при том, что его чувствительность существенно повышается.

Восприимчивость и достоинства. Эксперимент, поставленный на нескольких линиях, часто показывает различную восприимчивость линий. Оценка нанобезопасности должна основываться на самой чувствительной линии, но в ряде случаев необходимо найти *ген* такой *восприимчивости*. Это поможет уяснить механизм нанотоксичности и получить данные для инновационных лекарств в будущем. К сожалению, токсикологи никогда не делали попыток использовать такой дизайн [17].

Если вместо крыс использовать мышей, то понадобятся более радикальные изменения. По зарубежным данным именно мыши (91,4%) были наиболее часто используемым видом для генных

модификаций, а лишь затем – крысы (3,6%), зебрафиши (2,3%), свиньи (1,4%) и другие виды, включая цыплят, овец и коров (1,3%). Наиболее часто использовались для генных модификаций мыши линий C57BL/6 (48,1%), 129Sv (11,1%), Balb/c (4,3%), CD1 (2,5%) и FVB (0,3%). Преимущество в использовании мышей заключается в широкой доступности различных линий и обширной базы данных по генетике мыши, соответствии генов мыши/человека, и относительная простота генетических манипуляций с мышью. Генетические модификации могут включать «вставку» необходимого гена.

Другой подход включает короткие по продолжительности тесты с использованием нескольких биомаркеров для выявления определенного вида нанотоксичности. Эти эксперименты имеют высокую норму сигнал/шум и хорошую повторяемость. Если механизм нанотоксичности понятен, то его легко повторить в тестах *in vitro*.

Нанобезопасность: от животных-моделей к моделям животных

Современные технологии существенно отличаются от тех, которые были во времена Russell'a и Burch'a столетия назад. Неизменными остаются принципы гуманной экспериментальной техники, получившие название «Концепции трех R» [33]. Уже нельзя просто «взять животное», а следует выбрать между все возрастающим числом хорошо описанных видов животных, инбредных, трансгенных, нокаутных линий. В биомедицине наблюдается переход от выбора животных для эксперимента к созданию специализированных линий под задачи исследования. Новые парадигмы

современной биомедицины и биотехнологий заключаются в том, что жизнь может быть изучена не только в целостном организме, но и в отдельных клетках вне животного, что дает новый импульс альтернативному биомоделированию.

В 2008 г. за открытие зеленого флуоресцентного белка (GFP) О.Симомура, М.Чалфи и Т.Роджер были удостоены Нобелевской премии. На основе аналогичных исследований в нашем Центре осуществляется перенос гена зеленого белка (мышь линии B10.GFP) на генотип мышей линии C57BL/KsLeprdb/+, на основании которых создаются новые биомодели для визуализации и поиска новых эффективных способов лечения и оценки наноматериалов (рис. 6).

Можно ли считать эти направления исследований в качестве альтернативного биомоделирования? На данном этапе развития науки на этот вопрос следует ответить утвердительно, рассматривая его как концептуальное пространство создания новых «моделей животных», что существенно изменит взгляды на путях инновационного нанотоксикомоделирования. Такие предпосылки уже имеются, а в лабораториях генетики и постгеномных технологий нашего Центра они осуществляются. Их суть заключается в том, что когда создается новая генетически модифицированная модель животного, меняются сама суть, понятия и определения нового вида «эксперимента». В системе «новых экспериментов» следует сначала выделить четыре фазы: получение овоцитов из суперовулированных самок мышей (фаза 1), отбор и имплантация удачных эмбрионов в суррогатных матерей (фаза 2); маркировка новорожденных детенышей и генетический анализ тканей (фаза 3); программы кросс-бридинга,

включающие получение, создание запаса животных, дополнительный генетический анализ (*фаза 4*).

Основные же условия использования животных в эксперименте, такие как научная методология, возможность применения принципа трех R, оценка баланса между страданиями животных и важностью целей исследования позиционируются в *фазе 5*. Хотя этические нормы в большинстве своем подразумеваемы, они редко бывают научными. Одни из них несомненны: *научные*, в виде составления плана на основе подходящей методологии; *экономичные* для уменьшения количества животных; *эмпатичные*, в форме использования методов, уменьшающих страдания/дискомфорт; *скромные*, т.е. использование клеточных культур вместо животных. Другие, как, например, баланс и основа логики – *этический принцип пропорциональности* – дискуссионны [2, 3].

Разумеется, никто не будет создавать новую линию, моделирующую те или иные особенности животных для каждого наноматериала. Но и на существующих биомоделях можно просто не увидеть возможные риски и опасности нанопродуктов. По мере накопления данных о свойствах и закономерностях действия наночастиц будут выявляться требования к животным-моделям и *моделям животных*. Важно то, что пути их конструирования на основе фенотипических полиморфизмов существуют уже сейчас.

Альтернативные модели

Естественно, что в тестах на оценку токсичности наноматериалов применительно к человеку и окружающей среде

пока использовали лишь общие подходы. Необходимы новые оценки потенциальной токсичности ингаляций, оральной и кожной токсичности таких наноматериалов как углеродные частицы, двуокись кремния, фуллерены, оксид магния, оксид цинка и диоксид титана. Диоксид титана используется в 70% мирового производства красителей и косметики. В то же время он классифицирован Международным Агентством по изучению рака как возможный канцероген человека [20].

Необходимо развитие и поиск альтернативных моделей на основе методов оценки физико-химических, протеиновых и иммунных процессов.

Химическое взаимодействие наноматериалов. Окислительный потенциал, образование свободных радикалов, липидные и водорастворимые составляющие, твердые/жидкие фракции наночастиц и их свойства, летучесть, рН наноматериалов, могут быть измерены экспериментально, или, в ряде случаев, рассчитаны с определенной степенью достоверности. Традиционно эти химические параметры используются в QSAR-моделях для предсказания токсикологических точек окончания эксперимента (т.е. с использованием уже существующих данных из экспериментов на животных). Могут быть также включены качественные показатели: данные по кинетике (взаимодействия, липофильность, гидроскопичность) с использованием имеющихся баз данных по опытам *in vivo*. В моделях *in silico* входные химические параметры для наноматериалов могут быть также построены эмпирически.

Наночастицы и протеины. Для лучшего понимания любого метаболического

процесса при действии наноматериалов необходимо установить взаимодействие с протеинами для стимулирования иммунного отклика. Разработан подход *in chemico* для определения профиля взаимодействия с использованием панели из шести простых пептидов AcFAAXAA, где X = Cys, Lys, Tyr, His или Arg с окончанием H₂N-FAAAAA N-нуклеотида. В этом подходе можно получить взаимодействие пептидов отобранных нуклеотидов для предварительного тестирования, но не иммуногенетический отклик действия наночастиц, который определяют исключительно *in vivo*.

Хотя нет необходимости воздействовать прямо на ткани для выяснения их чувствительности при оценке наноматериалов, в настоящее время создаются клинические «воспалительные» базы данных, с использованием dodecyl – SDS для оценки потенциальных «наноомик»-технологий при создании баз данных для оценки рисков наноматериалов (рис. 7). Интерстициальная жидкость оптимальна для протеомики, метаболомики (масс-хроматографическая спектрометрия газов) и анализа цитокинов (люминимультиспектральный анализ). Эти исследования дают большое количество данных для транскриптомики, которые затем подвергаются анализу с использованием большого числа биоинформационных методов, включая платформу Cytoscape (США). Этот набор аналитических подходов весьма полезен для идентификации большого числа новых генных сетевых работ и методик, которые, как ожидается, могут быть полезны в применении новых информационных средств и «наноомик» технологий для определения точек окончания эксперимента в других ситуациях и случаях (рис. 7).

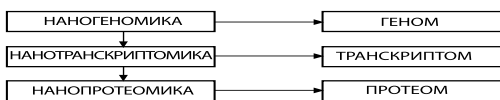


Рис. 7. На основе изучения генополиморфизма возникли три уровня аналитических подходов (*ген-РНК-белок*) на путях от геномики к протеомике, которые становятся базой для оценки нанобезопасности.

Наноиммунные процессы. В этом направлении также осуществляется активный поиск новых альтернативных моделей.

а) *Эпидермальное воспаление.* Создание воспалительного отклика было индуцировано на предплечье и было отображено биопсия кожи для анализа методами транскрипотими (полная последовательность генома человека), протеомики (в совокупности с масс-спектроскопией с использованием ITRAQ™ пептидные метки) и иммуногистохимии. Кератиноциты – преобладающие эпидермальные клетки внутри кожи. Они производят большое количество воспалительных цитокинов, которые поднимают тревогу в клетках Лангерганса в присутствии инфекционных агентов или наночастиц. С учетом этой роли в моделировании расширения деятельности клеток Лангерганса, активность кератиноцитов может быть использована как модель эпидермального воспаления. Эта информация может быть базовой для последующих исследований. Хотя тестов, утвержденных Европейским центром по валидации альтернативных методов, для определения повреждений кожи при воздействии наноматериалов пока нет, они активно разрабатываются [27].

б) *Активация дендритных клеток.* Два метода, основанных на моделях клеток, подобных моноцитам человека,

находятся в настоящее время на рассмотрении для изучения возможностей их применения в нанотехнологиях. Например, была проведена серия опытов для изучения откликов дендритных клеток с лигандами Toll-like рецепторов до или в процессе воздействия наночастиц для выявления, могут ли эти молекулы синергетически усиливать рецепторы дендритных клеток или цитокиновую экспрессию [27]. Индуцированные наночастицами отклики (как для сенсibilизаторов, так и для не-сенсibilизаторов) могли быть синергетически усилены стимулированием Toll-like рецепторов. Результаты совместных исследований (COLIPA, Sens-it-iv Framework VI integrated project) направлены на изучение того, что, как предполагается, различные раздражители, включая наночастицы, активируют дендритные клетки различными путями. Забегая вперед можно сказать, что для определения дополнительных точек окончания эксперимента (т.е. цитокиновой секреции при воздействии наноматериалов [27]) могут понадобиться методы дополнительной активации существующих дендритных точек, в соответствии с их химически обусловленными доменами [27].

в) *Пролиферация Т-клеток*. Первичная пролиферация Т-клеток как отклик на химическое воздействие наноматериалов – индикатор того, что субстанция является иммуногенной. Имеются публикации по первичной пролиферации Т-клеток *in vitro*. Но протоколы по ко-культурам Т-клеток делают такие подходы трудозатратными и пока крайне сложными для стандартизации [27].

Статистические модели или высокая точность ошибки

Точность является результатом выбранной для моделирования цели. Клеточная культура – модель низкой точности человека. Нечеловекообразные приматы или мини-свиньи – модели более высокой точности, т.к. в большей степени отражает человека. Поскольку люди аутобредны, то этим часто аргументируют выбор аутобредных животных для эксперимента, подкрепляя их некими статистическими выкладками, которые зачастую соответствуют парадоксу Марка Твена: «Есть ложь, наглая ложь и статистика».

Ошибка при построении такого рода «статистических моделей» заключается в постулате того, что модели должны быть точными. В действительности нам нужны модели для различения компонент, которые являются токсичными и нетоксичными на заданном уровне дозы наноматериалов. Абсолютно не важно, будет это получено с помощью «черного ящика», на клеточных культурах, мышцах или приматах. Важно одно, правильно ли модель отражает токсичность для человека или окружающей среды. Мы не должны строить модель, подобную человеку во всех отношениях. Хорошая статистическая модель для токсикологии в конечном счете не модель с неконтролируемыми генетическими вариациями, найденными у человека. Клинические испытания должны быть большими, так как люди имеют большую изменчивость. Кривые оценки доза–отклик, оцененные токсикологами, зачастую неточны, так как они получены на неконтролируемых по генетическим признакам животным, но тем не менее экспериментаторы пере-

дают их своим коллегам-клиницистам для получения результата с большими затратами, неточностями и иными неприемлемыми издержками.

Анекдотично, но классический статистический анализ играет весьма *несущественную роль* в оценке токсикологических эффектов [17, 18], в том числе и для нанопродуктов. Типичный кратковременный тест токсичности может включать данные по гематологии, клинической биохимии, весу органов и результаты гистологии, а также другие переменные, насчитывающие более 100 наблюдений по каждому животному – или более 8000 показателей. Результаты, как правило, конфиденциальны для коммерческих компаний и регулирующих органов, поэтому не понятно, какие статистические методы были использованы в конкретном случае или как они были интерпретированы. Если же результаты таких исследований публикуются, в отчет включают лишь несколько результатов, а использованные стандартные статистические методы, зачастую не подходят к сложным экспериментам.

Это может привести к *ложным положительным выводам*. С другой стороны поправка Бонферони может не подходить к данным исследованиям, так как показатели коррелируют друг с другом. Более подходящими являются многовариантные методы (широко используемый теперь анализ *микроэкспериментов*), но они сложны для интерпретации результатов. Если используются несколько инбредных линий, это добавляет сложности. Результаты экспериментов должны интерпретироваться максимально доступно. Далеко не все различия между испытываемыми группами действительно важны токсикологически [17].

Оценка безопасности наноматериалов без использования животных может проводиться на основе моделирования процессов, например с помощью методов Монте Карло. Новые экспериментальные подходы, основанные на *ex vivo* кожи человека, изучают такие параметры как сравнительные концентрации нанопродуктов на коже и кинетику наночастиц. Затем могут быть проведены исследования *in silico* для извлечения информации о сравнительной биоактивности кожи и установления математических параметров данных. Однако реальные показатели биоактивности свободных наноматериалов в стенке ЖКТ, альвеолах или коже зависят от их метаболизма, адсорбции тканей и понимания механизмов происходящих процессов [27].

Компьютерные модели

Современные методы *компьютерного моделирования* позволили разработать алгоритмы и программы для более точного прогноза ожидаемой токсичности, а также эффектов воздействия на здоровье человека. Эти компьютерные программы получили обобщенное название *модели количественных соотношений между структурой и активностью* (Quantitative Structure-Activity Relationship – QSAR models).

Модель ТОРКАТ для изучения на крысах пероральных препаратов содержит 19 моделей QSAR, данные из этих моделей были получены для обработки экспериментальных данных по летальным дозам (LD_{50}) на основе оценки 4000 химических веществ. Каждая *количественная модель определения структуры токсичности QSAR* оценивает LD_{50} для крыс по пероральным препаратам

для определенного набора химических средств. Модель ТОРКАТ для изучения на крысах препаратов, применяемых в виде ингаляций, содержит 5 моделей QSAR, и данные по всем этим моделям были получены в эксперименте по средним летальным концентрациям LC_{50} для почти тысячи химических веществ, включая наноматериалы. В модели учтены время проведения эксперимента 0,5-14 часов, точки окончания экспериментов и концентрации. Химические вещества были сгруппированы в 5 классических моделей. Каждая QSAR-модель оценивает острую LC_{50} для крыс по специфическому классу химических веществ в единицах моль/м³/час [39]. Развитие нанотехнологий требует создания аналогичных и специальных моделей по всем группам наноматериалов.

В Отчете международного семинара по методам *in vitro* для оценки системы острой токсичности (Report of the International Workshop on *in vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity) указывается, что для оценки острой токсичности нет необходимости проводить тесты для выявления всех специфичных эффектов по влиянию на органы в моделях *in vitro*. Вместо этого, может быть достаточно, провести тестирование энергетического метаболизма и способности химических веществ, а значит и наноматериалов, нарушать функции эпителиального барьера. Кроме того, не существует методов *in vitro* для прогноза острой токсичности в опытах с ингаляциями, хотя некоторые модели еще находятся на стадии развития и компьютерного моделирования.

В настоящее время не существует подходящих альтернативных методов существующих для оценки биокинетических

факторов, а также токсико- и фармакокинетики наносоединений. Эти методы необходимо использовать в комбинации с альтернативными методами определения точек окончания эксперимента, в соответствии со стратегией развития схем новых методов включая острую токсичность [13, 19]. В любом случае, обозримое будущее не сулит полную замену лабораторных животных альтернативными и статистическими моделями, хотя научные тенденции альтернативного и компьютерного моделирования и желания исследователей вселяют надежду на прогресс в этой области знаний.

Заключение

Влияние инженерно созданных нанотехнологических материалов на здоровье изучено недостаточно. До настоящего времени дебатов и дискуссий в литературе больше, чем конкретных данных об их действии. Наноматериалы не являются простым гомогенным классом. Большое число параметров, характеризующих физико-химические и квантово-механические свойства наночастиц и наноматериалов, пока не экстраполированы в отношении человека и окружающей среды в аспекте их рисков, безопасности и токсикологических характеристик.

Отсутствуют адекватные модели, которые позволили бы познать сущность нанотоксического действия различных материалов. Это в равной степени относится как к животным-моделям, так и к альтернативным, математическим, компьютерным моделям на уровне клеточного и субклеточного действия наноматериалов. Это подтвердилось при исследовании нами биологических и

токсикологических проявлений модифицированных фуллеренов (фуллеренилов), которые, несомненно, являются перспективными средствами для модуляции поведения человека и животных, основой для создания инновационных лекарств, направленного транспорта физиологически активных веществ к органам-мишеням.

Наши собственные исследования и данные литературы говорят о том, что наночастицы и наноматериалы, несмотря на их структурную уникальность и особенности квантово-механических механизмов, не являются экзотичными для биологической системы. В своем действии, созданные на основе нанотехнологий вещества, по-видимому, укладываются в закономерности *оккупационной теории* и принципы *избирательной токсичности*. Нами установлено, что достаточно токсичный пиридин, присоединенный к фуллерену C_{60} (низкотоксичному продукту) в 3-5 раз повышает токсичность фторфуллеренпиридинфторида. Аналогично возрастает токсичность C_{60} при присоединении к нему пиримидинов.

Важно лишь то, чтобы для оценки нанобезопасности были предложены и использованы корректные подходы к биомодели, построенные на оптимальных и новых принципах исследований, способных предложить новые пути изучения нанотоксичного действия новых материалов.

Несмотря на то, что современная токсикология зиждется на основных правилах, сформулированных в книге R.A.Fisher'a «The Design of Experiments», опубликованной в 1942 г., главный постулат, заключающийся в использовании в токсикологических экспериментах *гетерогенных животных*, до настоящего

времени токсикологами игнорируются [17]. Оценка безопасности наночастиц и наноматериалов должна осуществляться либо на существующих линиях животных, но с использованием *принципа гетерогенности*, либо, что более оптимально, на специально создаваемых животных-моделях. Более оправдано создание специальных генномодифицированных линий и поиск *моделей животных*.

Построение токсикологических экспериментов при использовании гетерогенных животных должно осуществляться в направлении поиска наиболее чувствительной и адекватной в отношении человека линии животных, с задачей поиска *генов восприимчивости* к нанотоксическому действию исследуемых материалов.

Познание сути токсико-кинетических процессов на квантово-механическом уровне позволит с наибольшей полнотой выявить и идентифицировать риски при использовании наноматериалов в отношении человека, животных и окружающей среды.

Для выяснения свойств *избирательной токсичности* наноматериалов необходимо сочетание *in vivo*-моделей с новыми альтернативными моделями для выяснения вопроса: каким наночастицам и в какой мере присуща нанотоксичность.

Статистическое и компьютерное моделирование должно быть не только адаптировано при оценке рисков и безопасности наноматериалов, а развиваться в новом направлении, учитывая физико-химические и квантово-механические сущности наноматериалов. Только использование системного и комплексного подхода к оценке рисков и

токсичности наноматериалов позволит создать предпосылки к построению единой концепции нанобезопасности.

Литература

1. Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели лекарственной токсикологии. // *Биомедицина* № 4, с. 5-23, 2006.
2. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т.1. Основы биомедицины и фармако-моделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
4. Косенко Е.А., Соломадин И.Н., Маров Н.В. и др. Роль гликолиза и антиокислительных ферментов в токсическом действии β -амилоидного пептида A β 25–35 на эритроциты // *Биоорг. химия*, 34 (5): 654-660, 2008.
5. Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды / Под ред. Ю.А. Рахманина. – Москва, 2007.
6. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. – СПб: Изд-во Росток, 2006.
7. Соломадин И.Н., Маров Н.В., Венедиктова Н.И. и др. Токсическое действие A β 25-35 и фуллерена C60 на эритроциты // *Изв. РАН, сер. биол.*, № 4, с. 507-512, 2008.
8. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. – М.: Техносфера, 2007.
9. Albert A. The physico-chemical basis of therapy // *9th Edition, London-NT*, 2007.
10. Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A. et al. Pulmonary responses of mice, rats and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles // *Toxicol. Sci.*, 77, 347-357, 2004.
11. Challenge and opportunity on the critical path to new medical products. – Rockville, MD, USA: US food and drug administration (FDA, 2004) // <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/whitepaper.html> /
12. Chia R., Achilli F., Festing M.F.W., Fisher E.M. The origins and uses of mouse outbreed stocks // *Nature Genetics*, 37, pp. 1181-1186, 2005.
13. Committee on Toxicity testing and assessment of environmental agents. Toxicity testing in the 21st century a vision and a strategy. – Washington, DC, USA: The National Academies Press, v-196, 2007.
14. Corona-Morales A.A., Castell A., Escobar A. et al. Fullerene C60 and ascorbic acid protect cultured chromaffin cells against levodopa toxicity // *J. Neurosci. Res.*, Jan 1;71(1):121-6, 2003.
15. Cui D., Gao H. Advance and prospect of bionanomaterials // *Biotechnol. Prog.*, 19, 683-692, 2003.
16. Dockery D.W., Pope C.A., Xu X. et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities // *N.Engl. J. Med.*, 329, 1753-1759, 1993.
17. Festing M.F.W. Fifty years after Russell and Burch, toxicologists continue to ignore genetic variation in their test animals // *ATLA*, 37, pp. 1-5, 2009.
18. Festing M.F.W. Genetic variation in human and laboratory animal populations and its implications for toxicological research and human risk assessment // *Molecular and cellular mechanisms in toxicology*, pp. 165-184. – Boca Raton, FL,

USA: CRC Press, Inc., 1995.

19. Gribaldo L., Gennari A., Blackburn K. et al. Acute Toxicity // *ATLA* 33 Suppl. 1, p.27-34, 2005.

20. Holsapple M.P., Farland W.H., Landry T.D. et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs // *Toxicological Sciences*, 88(1):12-17, 2005.

21. Hu Z., Guan W., Wang W. et al. Synthesis of beta-alanine C60 derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells // *Cell Biol. Int.*, Aug;31(8):798-804, 2007.

22. Injac R., Perse M., Cerne M. et al. Protective effects of fulleranol C60(OH)24 against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer // *Biomaterials*, Feb;30(6):1184-96, 2009.

23. Isakovic A., Markovic Z., Todorovic-Markovic B. et al. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene // *Toxicol. Sci.*, May;91(1):173-83, 2006.

24. James A.C., Stahlhofen W., Rudolf G. et al. The respiratory tract deposition model proposed by the ICRR Task Group // *Radiation Protection Dosimetry*, 38, 159-165, 1991.

25. Jensen A.W., Wilson S.R., Schuster D.I. Biological applications of fullerenes // *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 4. P. 767-779, 1996.

26. Liu Y., Zhao Y.-L., Chen Y., et al. A water-soluble β -cyclodextrin derivative possessing a fullerene tether as an efficient photodriven DNA-cleavage reagent // *Tetrahedron Lett.*, vol. 46, pp. 2507-2511, 2005.

27. Maxwell G., Aleksic M., Aptula A.

et al. Assuring consumer safety without animal testing: a feasibility case study for skin sensitization // *ATLA*, 36, pp. 557-568, 2008.

28. Monteiro-Riviere N.A., Nemanich R.J., Inman A.O. et al. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes // *Toxicol. Lett.*, 155, 377-384, 2005.

29. Nanoparticale safety: are animal tests fit for the purpose? // *Frame News*, No.63, p.3, 2009.

30. Oberdorster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass // *Environ. Health Perspect.*, 112, 1158-1062, 2004.

31. Oberdorster G., Utell M.J. Ultrafine particles in the urban air: To the respiratory tract- and beyond? // *Environ. Health Perspect.*, 110, A440-A441, 2002.

32. Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis // *Br. J. Pharmacol.*, Nov;146(6):882-93, 2005.

33. Russell W.M.S., Burch R.L. The Principles of Human Experimental Technique. – London, UK: Methuen. 238 pp., 1959.

34. Selvi B.R., Jagadeesan D., Suma B.S. et al. Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo // *Nano Lett.*, Oct;8(10):3182-8, 2008.

35. Semmler M., Seitz J., Erbe F. et al. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from rat lung, including transient translocation into secondary organs // *Inhal. Toxicol.*, 16, 453-459, 2004.

36. Trajković S., Dobrić S., Jačević V. et al. Tissue-protective effects of fulleranol

$C_{60}(OH)_{24}$ and amifostine in irradiated rats // *Colloids Surf B Biointerfaces*, Jul 1;58(1):39-43, 2007.

37. Tykhomyrov A.A., Nedzvetsky V.S., Klochkov V.K., Andrievsky G.V. Nanostructures of hydrated C_{60} fullerene ($C_{60}HyFn$) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals // *Toxicology*, Apr

18;246(2-3):158-65, 2008.

38. Yamashita K., Iwataki T., Hatta T. et al. Fluorescence microscopic visualization of a DNA-cationic fullerene complex // *Nucleic Acid Symp. Ser.*, No. 44, pp.173-174, 2000.

39. Zuang V., Alonso M.A., Botham P.A. et al. Skin Irritation and Corrosion // *ATLA* 33, Suppl. 1, 35-46, 2005.

NANOSAFETY: NEW APPROACHES TO ESTIMATION OF RISK AND NANOMATERIALS TOXICITY

N.N. Karkischenko

Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow

The unique characteristics of nanoparticles limit the predictions that can be made from knowledge of the bulk material. It is necessary to gather information on particles size, their structure and quantum-mechanic mechanisms, abilities to bind serum proteins and tissues interaction. *In vitro* tests should be carry out, and the results made available to allow their selective toxicity and toxicokinetics. Connection piridins and pirimidins to fullerene C_{60} strengthen their neurotrophic activity, but raises 3-5 times their general toxicity. *In vitro* test also should be base for better predictions of probable nanoparticle toxicity and reduce animals in experiments. It is necessary to use heterogenic and engineering stocks, transition from models of animals to animal-models and using of computer modeling in nanobiotechnologies.

Key words: nanorisks, nanotarget, fullerenes, selective nanotoxicity, biomodelling of nanoproceses, models of animals.



Средства для обеззараживания объектов, контаминированных спорами *B. anthracis*

М.Ю.Озеров¹, В.Н.Каркищенко², Д.В.Попов¹, С.Ю.Пчелинцев¹,
В.Г.Попов¹, Д.А.Гришин¹

¹ Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская область

² Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Данная работа является первой в серии статей, посвященных проблеме обеззараживания объектов, контаминированных спорами сибиреязвенной инфекции. В ней широко рассмотрены общепринятые способы проведения дезинфекционных мероприятий и влияние активных компонент спор *B. anthracis*. В следующих статьях планируется затронуть вопросы применения биологических дезинфицирующих средств на основе бактериофагов для обеззараживания объектов и почвы, обсемененных спорами *B. anthracis*.

Ключевые слова: биотерроризм, споры *B. anthracis*, бактериофаги.

Болезнетворные микроорганизмы, в частности *B. anthracis*, представляют серьезную угрозу здоровью человека и животных [26]. В настоящее время вероятность заражения сибирской язвой в развивающихся странах высокая, но и развитые страны также не застрахованы от вспышек этого заболевания и актов биотерроризма. Данная работа является первой в серии статей, посвященных проблематике борьбы с сибиреязвенной инфекцией, в которой рассматриваются общепринятые способы проведения дезинфекционных мероприятий при контаминации сибиреязвенными спорами. В следующих работах планируется затронуть вопросы применения биологических дезинфицирующих средств на основе бактериофагов для обеззараживания объектов и почвы, обсемененных спорами *B. anthracis*.

Несмотря на значительные успехи в области вакцинопрофилактики, изобретения новых антибиотиков, проблема лечения, профилактики и ликвидации сибирской язвы далека до завершения. Применение бактерицидных средств для предупреждения и контроля распространения *B. anthracis* в окружающей среде в настоящее время является общепринятым. Как известно, дезинфицирующее средство, используемое для деконтаминации загрязненных патогенами объектов, должно отвечать основным требованиям: обладать выраженным биоцидным эффектом; краткой экспозицией воздействия на микроорганизм; не должно вызывать коррозии металлов и повреждать других материалов; входящих в состав объектов обработки; сохранять активность в присутствии органических веществ; быть удобным в применении

(хорошо растворяться, иметь длительные сроки хранения, быть экологически безопасным и др.); не оказывать токсического и алергизирующего действия на персонал; совместно с используемым оборудованием для дезинфекции иметь экономически оправданную стоимость.

Вопросами поиска и разработки дезинфицирующих препаратов занимаются во всем мире. Однако в настоящее время нет международных правил, регулирующих испытания и регистрацию бактерицидных средств. Например, тесты широко, используемые в Европе, не разрешены в США [23] и Канаде [9], также и в Австралии [14] имеются свои собственные стандарты. Также возросли требования к безопасности дезинфицирующих средств для здоровья человека и животных, и для окружающей среды [21, 22, 24].

Основные действующие вещества, входящие в состав дезинфицирующих средств и механизм их действия на споры *B. anthracis*

В качестве средств дезинфекции при сибирской язве рекомендованных к применению в чрезвычайных ситуациях Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» Российской Федерации и Агентством по защите окружающей среды США, являются препараты различного химического состава (табл. 1). К ним относятся галогены и их производные (хлорная известь, гипохлорит кальция, ДП-2 и др.), окислители (пергидроль, перфторид калия и др.), альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид и др.). Также широко приме-

няются щелочи, фенолы, спирты, газы (окись этилена, бромид метилена и др.).

Альдегиды. Наиболее часто используются формальдегид (метаналь) и глутаровый альдегид (пентадиаль). Альдегиды хорошо растворимы в воде, за исключением формальдегида не имеют запаха.

Механизм их действия обусловлен взаимодействием карбонильной группы альдегидов с аминогруппами белков, что приводит к изменению нативных пространственных структур белковых молекул. Диальдегиды таким образом сшивают молекулы белков, образуя нерастворимые высокомолекулярные структуры с измененной биологической активностью.

Формальдегид (метаналь, или муравьиный альдегид) – НСОН – газ, растворимый в воде и органических растворителях. Его применяют в виде водных или спиртовых растворов. 40% водный раствор формальдегида называется формалином. Растворы формальдегида неустойчивы, при их хранении в процессе химических реакций образуются токсичные или малорастворимые продукты.

Глутаровый альдегид (пентадиаль) – $\text{НОС}-(\text{CH}_2)_3-\text{СОН}$ – в водном растворе и в кислой, и щелочной среде полимеризуется. Для эффективного воздействия глутарового альдегида на микроорганизмы необходима щелочная среда; оптимальным является значение pH 7,5-8,5 [3]. Для уничтожения спор сибирской язвы используют 5% раствор глутарового альдегида, нагретый до 50°C [4]. Глутаральдегид проявляет большую спороцидную активность по сравнению с формальдегидом (табл. 1).

Хлорсодержащие дезинфектанты. К наиболее распространенным хлор-

Таблица 1

Основные действующие вещества, входящие в состав дезинфицирующих средств, применяемых для уничтожения спор *B. anthracis* при химической дезинфекции [8]

Действующее вещество	Концентрация	Тест культура	Время	Эффективность
Гипохлорит кальция	20 ppm Cl ₂ , pH 8,0; 20°C	3 × 10 ⁵ –4 × 10 ⁵ спор <i>Bacillus subtilis</i> в 5,0 мл стерильной дистиллированной H ₂ O	4,8 мин	99% убито
	25 ppm Cl ₂ , pH 6,0; 20°C	2 × 10 ⁷ спор/мл <i>B. metiens</i> в 10 мл стерильной дистиллированной H ₂ O	2,5 мин	99% убито
Свободный хлор	2,4-2.3 мг/л Cl ₂ , pH 7,2; 22°C	1,1 × 10 ⁵ суспензия спор <i>B. anthracis</i>	1ч	>99,99% убито (1 спора/мл выжила)
Гипохлорит натрия (NaOCl)	0,05%, pH 7,0; 20°C	суспензия спор <i>B. subtilis globigii</i> , 1,6-2,2 × 10 ⁹ КОЕ/мл	30 мин	99,99% убито
	0,05%, pH 11,0; 20°C			50% спор выжило
Перекись водорода (H ₂ O ₂)	25,8%, 24°C	<i>B. subtilis globigii</i> суспензия спор	15 мин	0,001% спор выжило
	25,8%, 76°C		<1 мин	< 0,0001% спор выжило
	0,88 М/л, pH 5,0	10 ⁶ КОЕ/мл <i>B. subtilis</i> суспензия спор	3 час	100% убито
	0,88 mol/L, pH 4,3	10 мл <i>B. subtilis</i> суспензия спор нанесенная на стальные пластины	6 час	100% убито
Надуксусная кислота (CH ₃ COOOH)	0,13 М/л, pH 5,0; 6,5; 8,0	106 КОЕ/мл <i>B. subtilis</i>	<30 мин	100% убито
	0,39 М/л, pH 4,0; 7,0; 9,0	10 мл <i>B. subtilis</i> суспензия спор нанесенная на стальные пластины	24 час	100% убито
Формальдегид (CH ₂ O)	4% в воде	10 ⁸ /мл <i>B. anthracis</i>	2 час	10 ⁴ инактивировано
	400 мг/м ³ , 30% отн. влажность	10 ² –3 × 10 ⁸ <i>B. globigii</i> NCTC 10073 высушенные на дисках	22 мин	1 log ₁₀ снижение при 23,5°C-25°C
	280 мг/м ³ , 50% отн. влажность		31 мин	
	250 мг/м ³ , 80% отн. влажность		16 мин	
	400 мг/м ³ , 98% отн. влажность		9 мин	
Глютаровый альдегид (C ₅ H ₈ O ₂)	2% в воде, pH 8,0	10 ⁸ спор <i>B. anthracis</i> /мл	15 мин	10 ⁴ инактивировано
Натрия гидроксид (NaOH)	5%, 27,8°C	7 × 10 ⁹ спор/мл <i>B. subtilis</i>	1,5 час	99% убито
	5%, 21,1°C		3,6 час	99% убито

содержащим дезинфицирующим средствам (ДС) относятся неорганические вещества – хлор, гипохлориты, диоксид хлора, и органические вещества – хлорамины, хлорпроизводные циануровой кислоты и гидантоина. Содержащие хлор дезинфицирующие вещества обладают широким спектром антимикробного действия. Эффективность указанных препаратов оценивается по массовой доле активного хлора (Cl^{+1}).

Все вышеуказанные хлорсодержащие вещества в растворах взаимодействуют с водой; при этом образуется хлорноватистая кислота:

- 1) молекулярный хлор в воде диспропорционирует;
- 2) гипохлориты в водных растворах гидролизуются;
- 3) хлорамины также в воде гидролизуются.

В процессе дальнейших химических реакций происходит образование сильных окислителей – кислорода и хлора, которые и обуславливают дезинфицирующие свойства. Образовавшаяся хлорноватистая кислота нестойкая и разлагается на соляную кислоту с выделением кислорода. Далее соляная кислота вступает в реакцию с хлорноватистой кислотой с образованием хлора и перекиси водорода.

Механизм действия хлорсодержащих соединений заключается в окисляющем действии кислорода и хлора. Вследствие небольшого размера молекул хлор и кислород попадают в бактериальную клетку через поры клеточной мембраны путем диффузии [11].

Хлорноватистая кислота, вследствие выделения молекулярного хлора, может действовать не только как окислитель, но и как непосредственно хлорирующее

вещество. В микробной клетке наряду с процессами окисления может протекать хлорирование amino- и иминогрупп структурных компонентов протоплазмы. Следует также отметить, что в результате гидролиза гипохлоритов раствор имеет щелочную реакцию, из-за чего происходит частичное омыление жиров, щелочной гидролиз пептидов, образуются растворимые продукты, легко удаляемые с поверхности оборудования: глицерин и соли высших жирных кислот, соли аминокислот. Хлорсодержащие ДС наиболее активны в слабокислых и нейтральных растворах.

Препараты, содержащие гипохлориты, высокочувствительны к органическим загрязнениям, эффективно нейтрализуются белками, в меньшей степени – другими органическими соединениями. Гипохлориты, диоксид хлора и хлор раздражают слизистые оболочки глаз и верхних дыхательных путей. Необходима тщательная мойка после дезинфекции для удаления остатков ДС. Для уничтожения спор *B. anthracis* ранее использовались 5% растворы гипохлорита натрия, содержащие также 1,6-2% щелочи. В таком растворе споры погибают через 3 часа. Для большей надежности рекомендовано увеличить экспозицию до 4 часов [1]. Хлорсодержащие препараты обладают сильным корродирующим действием. Следует отметить, что хлорсодержащие соединения не совместимы с некоторыми полимерами, например, ацетилцеллюлозой, полиамидами, и не должны быть использованы для их дезинфекции (табл. 2).

Окислители. *Перекись водорода* обладает универсальным противомикробным действием. Вызывает гибель спор большинства спорогенных бактерий в

Таблица 2

Основные действующие вещества, входящие в состав дезинфицирующих средств, применяемых для уничтожения спор *B. anthracis* при газовой дезинфекции [8]

Действующее вещество	Концентрация	Тест культура	Время	Эффективность
Оксид этилена (C ² H ⁴ O)	Комнатная температура	<i>B. globigii</i> and <i>B. anthracis</i> высушенные на стальных пластинах	1 час	100% убито
	500 мг/л, 30-50% отн. влажность, 54,4°C	~10 ⁶ спор <i>B. globigii</i> на негигроскопичных поверхностях	30 мин	4-log снижение
		10 ⁶ спор <i>B. globigii</i> на негигроскопичных поверхностях		6-log снижение
Диоксид хлора (ClO ₂)	40 мг/л, 60-80% отн. влажность, 25°-27°C	1,4×10 ⁶ /0,2 мл <i>B. subtilis</i> subsp. <i>Niger</i> высушенных на бумаге и алюминиевой фольге	1 час	100% убито
	30 мг/л, 80-85% отн. влажность, 30°C	10 ⁶ спор/биологический индикатор; <i>B. subtilis</i> subsp. <i>Niger</i>	30 мин	100% убито (90%, около 4,4 мин)
	6-7 мг/л, 20-40% отн. влажность, 23°C	10 ⁶ спор/биологический индикатор; <i>B. subtilis</i> subsp. <i>Niger</i>	30 мин	101 КОЕ/ биологический индикатор (90% убито, около 4,2 мин)
	70-75% отн. влажность для 0,5; 23°C		15 мин	0 КОЕ/ биологический индикатор (90% убито, около 1,6 мин)
Бромид метилена (CH ₃ Br)	3,4-3,9 г/л, комнатная температура, в присутствии влаги	1×10 ⁵ -5×10 ⁷ спор <i>B. anthracis</i> высушенных на стерильных полосках бумаги	24 час	100% убито
Пары надуксусной кислоты (CH ₃ COOOH)	1 мг/л, 80% отн. влажности	6×10 ⁵ -8×10 ⁵ <i>B. subtilis niger</i> высушенные на бумажных дисках-фильтрах и стекле	10 мин	<1 споры осталось на бумаге и стекле
	1 мг/л, 60% отн. влажности			2 споры осталось на бумаге; 38 спор на стекле
	1 мг/л, 40% отн. влажности			24 споры осталось на бумаге; 1530 спор – на стекле
Озон (O ₃)	1,0 мг/л в воде pH 3	1,8×10 ⁵ спор/мл <i>B. cereus</i>	5 мин	<101 КОЕ/мл выжило
	3,0 мг/L, 95% отн. влажность	10 ⁸ -2×10 ⁸ <i>B. subtilis</i> , высушенные на фильтровальной бумаге	1,5 ч	<0,001% выжило
	900 ppm, выдержанные при 65-70% отн. влажность 15 ч	5×10 ⁷ спор/стеклянный купон	30 мин, 80% отн. влажность	10 выжило

том числе *B. anthracis*. Противомикробное действие H_2O_2 связано с ее высокой окислительной активностью. Выделяющийся при ее разложении микробными и тканевыми протеазами кислород окисляет сульфгидрильные и гидроксильные группы белков и липидов, вызывая гибель микробов.

Высокая популярность перекиси водорода как противомикробного средства связана с тем, что она хорошо переносится кожей и слизистыми оболочками, не накапливается в организме при длительном применении, не оказывает токсического и аллергенного действия, является экологически чистым продуктом, высокотехнологична, экономична. Применяют для дезинфекции различных объектов, предстерилизационной очистки инструментов, а также как антисептик для профилактической и терапевтической антисептики.

Вместе с тем, препарат быстро разлагается на свету, при взаимодействии с металлами, органическими веществами, со щелочами. Поэтому в органических субстратах, содержащих тканевые и микробные пероксидазу и каталазу, противомикробная активность H_2O_2 быстро снижается. Кроме того, в последнее время отмечено снижение фоновой чувствительности микробов к перекиси водорода и появление устойчивых к этому препарату вариантов бактерий. Это обусловлено селекцией активных продуцентов каталазы. Как следствие нестабильности препарата и снижения чувствительности микробов, в растворах H_2O_2 нередко обнаруживают заносные, в том числе и патогенные, микроорганизмы.

Надукусная кислота – CH_3COOOH (НОАс) – производное пероксида водорода и уксусной кислоты. Производные

уксусной кислоты взрыво- и пожароопасны. В водной среде НОАс подвергается обратимому гидролизу на пероксид водорода и уксусную кислоту. Поэтому активными действующими веществами растворов, содержащих НОАс, одновременно являются уксусная кислота и пероксид водорода.

НОАс – неустойчивое соединение, разлагается в водных растворах (параллельно с гидролизом с образованием уксусной кислоты и молекулярного кислорода). Поэтому растворы надкислот, подлежащие хранению, содержат стабилизаторы пероксидных компонентов. НОАс проявляет более мощное антимикробное действие, чем пероксид водорода. Бактерицидная и спороцидная концентрация НОАс – 0,001% и 0,3%; перекиси водорода – соответственно 1% и 3% [6, 12].

Обнаружено, что механизм действия НОАс заключается в окислительном деструктурировании важнейших компонентов клеток и клеточных мембран благодаря образованию сильных окислителей – радикалов $CH_3COO\cdot$ и $CH_3CO\cdot$ [11]. Под действием НОАс происходит разрыв гидросульфидных и дисульфидных связей в белках и белковых ферментах [10]. Взаимодействие с ненасыщенными участками жирных кислот – структурных компонентов клеточных мембран – приводит к нарушению их моделирующей и транспортной функций [5]. Внутри клетки НОАс может также окислить эстеразы, нарушая при этом соотношение концентраций внутриклеточных компонентов и изменяя направление процесса их переноса через мембрану [13].

В отличие от пероксида водорода, НОАс не разрушается каталазой, т.к. деструктурирует этот фермент [15]. Наряду

с денатурацией белков НОАс оказывает деструктивное действие на нуклеиновые кислоты [18]. Спороцидное действие НОАс проявляется в концентрации 0,3% [15]. При воздействии на микроорганизмы НОАс и пероксид водорода проявляют синергизм. Наибольшее антимикробное действие НОАс проявляет при рН=2,03. Оптимальная температура воздействия – 37°С. Снижение кислотности и повышение температуры ведет к снижению скорости инактивации микроорганизмов [2]. При повышении рН и температуры возрастает скорость разложения НОАс. Например, воздействие НОАс на споры *B. anthracis* в присутствии 4% лошадиной сыворотки превышает активность глутарового альдегида в 32 раза, формальдегида – в 64 раза [19]. НОАс умеренно токсична, по окончании обработки самопроизвольно разлагается на нетоксичные продукты – уксусную кислоту и кислород (табл. 2).

Газовые способы дезинфекции. При дезинфекции газовым методом концентрация, влажность, температура и структура поверхностей оказывают большое влияние. Окись этилена вызывает алкилирование сульфидгидрильных амино-, карбокси-, фенольных- и гидроксильных групп веществ входящих в состав спор или вегетативных клеток, в основном – ДНК. Окись этилена проникает в пористые материалы (хорошо абсорбируется резиной и многими пластиками); таким образом, пары не легко удалить коротким проветриванием. Окись этилена также легко воспламеняется [8].

Остаточные споры не полностью уничтожаются после 30 минутной экспозиции диоксидом хлора при относительной влажности 20-40%, тогда как все споры элиминируются при повышении

влажности до 70-75% [17]. Диоксид хлора взрывоопасен, обладает эмбриотоксическим действием.

Пары надуксусной кислоты плохо проникают в пористые поверхности и легко воспламеняются. Уровень контаминации, чистоты поверхностей и относительная влажность воздуха влияют на эффективность использования паров надуксусной кислоты в качестве спороцида [20].

Органические материалы могут сорбировать и вступать в химическую реакцию с оксидом пропилена, снижая его эффективность. Органические материалы также могут физически защищать споры от оксида [7].

Спороцидные свойства озона также находятся под влиянием относительной влажности воздуха: чем она ниже – тем большее время требуется для уничтожения спор [16].

В настоящее время в России для уничтожения спор *B. anthracis* разрешено около 50 наименований дезинфицирующих средств. Основными являются: аквин, анавидин, асептол 2000, асмол-Д, бианол, биопаг-Д, БИОР-Н, БИОР-1, бромосепт 50% раствор, велтаб, велтогран, велтодез, велтолен, велтолен-экстра, гамма-Д, дезискраб (голубой), дезискраб (желтый), дезоксон-1, деконекс 50 плюс, деконекс 55 Эндо, делансаль, дисмозон Пур, ди-хлор, ДП-2Т, ДСВУ-1, дюльбак растворимый, жавель-клейд, клиндезин 3000, клиндезин-Окси, клиндезин-Форте, клорсепт 25 (17), колдСпор, комбинированный дезинфектант, криодез, лизафин (жидкий концентрат), лизафин-специаль (жидкий концентрат), лизоформин-3000, люмакс-Стерил, новодез-Форте, НУ-САЙДЕКС, офаль, ПВК, пероксид водорода, пероксимед, пер-

форм, пресепт, пресепт гранулы, Рик-Д, САЙДЕКС ОПА, САЙДЕКС, септодор-Форте, септоцид Р плюс, септустерил, спитадерм, Ф-2, хлорамин-Б, хлорная известь, хлорэфект, эригид Форте.

Новое поколение дезинфицирующих средств для деконтаминации объектов основано на перекиси водорода с различными антикоррозионными и стабилизирующими добавками, поверхностно-активные вещества и др. В качестве носителя пероксида водорода используются неорганические соли: фториды калия, бария, аммония, метасиликат натрия, орто- и пиррофосфат натрия, сульфат натрия и др. При использовании фтористого калия в качестве носителя пероксида образуется несколько модификаций: ПФК-1 (моносольват), ПФК-2 (смесь моно- и дисольвата), ПФК-3 (дисольват), ПФК-4 (трисольват), ПФК-К (моносольват кислого фторида калия). В перечисленных сольватах содержание пероксида водорода варьирует от 28% до 65%. Все сольваты представляют собой порошок белого цвета с различной степенью стабильности, хорошо растворимого в воде. Они могут быть приготовлены в виде таблетированных форм. Для всех сольватов ведется поиск стабилизаторов, позволяющих сохранить активность в течение нескольких лет. Наиболее стабильные результаты по времени инактивации спор получены при применении 6 и 10% растворов, 2,5 и 1,5 часа соответственно.

Таким образом, процесс обеззараживания объектов при контаминации спорами *B. anthracis* сложен, его эффективность зависит от следующих факторов:

— от химической природы ДВ и его механизма действия, от концентрации ДВ в препарате и его концентрации в ра-

бочем растворе;

— от устойчивости спор к применяемому дезинфицирующему средству и их количества на обрабатываемом объекте;

— от физико-химических свойств обрабатываемого объекта, его формы, величины, наличия на нем загрязнений органической и неорганической природы;

— от способа обработки объекта дезинфицирующим средством (орошение, мытье, погружение в растворы, протирание ветошью, смоченной в дезрастворе, обработка направленными аэрозолями поверхности, заполнение аэрозолями герметичного помещения, газация или создание бактерицидных паров и дымов в обрабатываемом помещении);

— от времени воздействия дезинфицирующего раствора на споры.

Все вышеперечисленные дезинфицирующие средства не дают 100% гарантии уничтожения спор и обладают выраженными недостатками. Это, прежде всего, касается экологической безопасности, безвредности для человека и животных, безвредности по отношению к обрабатываемым сложным приборам. Биологических дезинфицирующих средств для борьбы со спорами *B. anthracis* на рынке не существует. В следующей работе авторы планируют представить характеристику сибиреязвенных бактериофагов и рассмотреть эффективность их действия на вегетативную и споровую формы сибиреязвенной бациллы.

Литература

1. *Вашков В.И.* Антимикробные средства и методы дезинфекции. — М.: Медицина, 1977.

2. Пудова О.Б., Никольская В.П., Буянова В.В., Тутова К.В. Количественная оценка спороцидной активности различных модификаций пероксигидратов фторида калия, перекиси водорода, надкусусной кислоты // *Дезинфекционное дело*, 3: 19-22, 1999.
3. Рутала В.А. Дезинфекция, стерилизация и удаление отходов / В: Внутрибольничные инфекции. – М.: Медицина, 159-211, 1990.
4. Федорова Л.И., Арефьева Л.С., Путинцева Н.А., Веремкович Н.А. Современные средства дезинфекции. Характеристика, назначение, перспективы. – М.: Медицина, 1991.
5. Baldry M.G.C., Fraser J.A.L. Disinfection with peroxygens // In: Payne KR, ed. *Industrial Biocides*. – New York: John Willey & Sons, 91-116, 1988.
6. Baldry M.G.C. The Bactericidal, fungicidal and sporocidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid // *J. Appl. Bacteriol.*; 54: 417-423, 1983.
7. Bruch C., Koesterer M. The microbicidal activity of gaseous propylene oxide and its application to powdered or flaked foods // *Food Research*; 25:428-35, 1960.
8. Bruch C. Gaseous sterilization // *Annu. Rev. Microbiol.*; 16: 245-63, 1961.
9. Canadian General Standards Board. Assessment of Efficacy of Antimicrobial Agents for Use on Environmental Surfaces and Medical Devices. Document #CAN/CGSB-2.161-M97. Ottawa.: Canadian General Standards Board, 1997.
10. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N. Microbiology including human and molecular genetic. – London: Harpet & Row, 1980.
11. Faraci M.M., Marquis R.E., Rutherford G.C., Shin S.Y. Sporocidal action of peracetic acid and protective effects of transition metal ions // *J. Ind. Microbiol.*; 15: 486-492, 1995.
12. Favero M.S., Bond W.W. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilisation and preservation*. – New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
13. Fraser J.A.L. Novel application of peracetic acid in industrial disinfection // *Chempec 86 BACS Symposium*, 65-69, 1986.
14. Government of Australia; Therapeutic Goods Admin. The Standard for Microbiocides and Sterilants (TGO 54) // <http://www.tga.health.gov.au/docs/html/tgo/tgo54b.htm>, 2005.
15. Greenspan F., MacKellar D.G. The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes // *Food Technology*; 5: 95-97, 1951.
16. Ishizaki K., Shinriki N., Matsuyama H. Inactivation of Bacillus spores by gaseous ozone // *J. Appl. Bacteriol.* 60:67-72, 1986.
17. Jeng D., Woodworth A. Chlorine dioxide gas sterilization under square-wave conditions // *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:514-9, 1990.
18. Maillard J.Y., Beggs T.S., Day M.J. et al. Damage to Pseudomonas aeruginosa PA01 bacteriophage F116 DNA by biocides // *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 540-544, 1996.
19. Malchesky P.S. Medical Application of peracetic acid. / In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilisation and preservation*. – New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
20. Portner D., Hoffman R. Sporicidal effect of peracetic acid vapor // *Appl. Microbiol.*, 16:1782-5, 1968.
21. Ravis S.M., Shaffer M.P., Shaffer C.L. et al. Glutaraldehyde-induced and formaldehydeinduced allergic contact dermatitis among dental hygienists and

assistants // *J. Am. Dent. Assoc.* 134, 1072-1078, 2003.

22. Sattar S.A. The use of microbiocides in infection control: a critical look at safety, testing and applications. Allen Denver Russell Memorial Lecture // *J. Appl. Microbiol.*, 101:743-753, 2006.

23. US Environmental Protection Agency (EPA) Antimicrobial Pesticide Products // <http://www.epa.gov/opp00001/factsheets/antimic.htm>, 2003.

24. Waters A., Beach J., Abramson M.

Symptoms and lung function in health care personnel exposed to glutaraldehyde // *Am. J. Ind. Med.*, 43: 196-203, 2003.

25. Whitney E.A.S., Beatty M.E., Taylor T. et al. Inactivation of *Bacillus anthracis* spores // *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, No. 6, pp. 623-627, 2003.

26. World Health Organization. Communicable Diseases 2002: Global Defence Against the Infectious Disease Threat. – Geneva: World Health Organization, 2003.

MEANS FOR DISINFECTION OF OBJECTS CONTAMINATED BY *B. ANTHRACIS* SPORES

M.Yu.Ozerov, V.N.Karkischenko, D.V.Popov,

S.Yu.Pchelintsev, V.G.Popov, D.A.Grishin

Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow

The Institute of Immunological Engineering, Lyubuchany, Moscow Region

This review starts a series of articles dedicated to the problem of disinfection of objects contaminated by anthrax spores. Authors discuss widely used methods of disinfection and influence of active components on the spores of *B. anthracis*. The next articles are planned to be focused on anthrax bacteriophages and their use for elimination of anthrax spores.

Key words: bioterrorism, spores of *B. anthracis*, bacteriophages



Изменения спектральной мощности ЭЭГ крыс после интраперитонеального введения фторсодержащих производных фуллерена-60

Н.Н.Каркищенко¹, Д.С.Сахаров¹, А.А.Филиппов², В.Б.Соколов²

¹Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

²Российский Научный Центр «Курчатовский институт», Москва

Фуллерены и их производные в будущем могут широко применяться в технике и медицине. В данной работе мы исследовали влияние фторсодержащих производных фуллеренов-60 (фуллеренилов) на функциональное состояние мозга бодрствующих крыс с помощью спектрального анализа ЭЭГ. Углеродные наночастицы вводили интраперитонеально в дозе 100 мг/кг и спустя 3 минуты регистрировали ЭЭГ в течение часа. В каждом опыте применяли только один из фуллеренилов, растворимых в диметилсульфоксиде ($C_{60}F_{24}$, $C_{60}F(NO_2)$, $C_{60}F_{48}$) или в воде ($C_{60}F_{36}(NH_{2/12})$, $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$). Данные, полученные при введении фуллеренилов, нормировали к значениям, полученным в фоне, либо при введении диметилсульфоксида. Было установлено, что фуллеренилы даже при интраперитонеальном введении проникают через гематоэнцефалический барьер, в краткие сроки значительно и на относительно длительный период изменяют функциональное состояние головного мозга. Эти реакции различны и, видимо, зависят от физико-химических особенностей углеродных наночастиц. В статье обсуждаются результаты инъекции каждого из фуллеренилов.

Ключевые слова: спектральная мощность ЭЭГ, интраперитонеальное введение, фторсодержащие производные фуллерена-60, фуллеренилы.

Возможность широкого использования в технике и медицине наноматериалов, основанных на аллотропной модификации углерода – фуллеренах и их производных, сегодня представляет большой интерес [16, 18, 21, 24]. В связи с этим необходимо определить степени биобезопасности углеродистых наночастиц для человека и окружающей среды, особенно учитывая тот факт, что, например, диаметр молекулы фуллерена C_{60} составляет около 0,7 нм, что более чем в 2 раза меньше толщины молекулы ДНК; такие частицы могут беспрепятственно проникать через клеточную и ядерную

мембрану, обнаруживаясь в различных субклеточных структурах, включая ядро [20]. Существует ряд работ, где указывается, что углеродные наночастицы проникают через гематоэнцефалический барьер [21, 25], в частности, путем эндцитоза эндотелиальными клетками, выстилающими капилляры в мозге [15].

Одной из частных задач биомедицины в этом направлении является оценка безопасности фуллеренов для центральной нервной системы и поведения животных. Тем более что существуют работы, указывающие на негативное влияние наноматериалов [12, 13]. Кроме того, в

литературе нам пока не встретились исследования изменений функционального состояния головного мозга после введения фуллеренов с применением метода электроэнцефалографии (ЭЭГ).

Данная работа посвящена анализу спектральной мощности электрической активности мозга при интраперитонеальном (внутрибрюшинном) введении растворов фуллеренилов, в нашем случае, – фторсодержащих производных фуллерена-60.

Материалы и методы

Опыты были проведены на 8 бодрствующих 3-месячных белых крысах линии WAG/GY в хроническом эксперименте. Животных обоего пола, полученных из НЦБМТ РАМН (Светлые горы), содержали по барьерной системе, в клетках по 3 крысы в каждой со свободным доступом к питью и пище (комбинированный корм, фирма ООО «Лабораторкорм»), микробиологический статус крыс – SPF. За неделю до начала эксперимента животных анестезировали (Zoletil 100, фирма VIRBAC-06516-CARROS, Франция, доза 55 мг/кг), фиксировали в стереотаксисе, в стерильных условиях эпидурально вживляли электроды, в качестве которых применяли штырьковые разъемы с антикоррозийным покрытием, на пластмассовой платформе. Электроды располагали в симметричных точках обоих полушарий, согласно координатам относительно брегмы: фронтальные **Fp1**, **Fp2** (A4, L2); **F3**, **F4** (A2, L2); центральные **C3**, **C4** (P1, L4); теменные **P3**, **P4** (P3, L4). Регистрацию ЭЭГ осуществляли монополярно, референтный электрод (**Ref.**) располагали в носовых костях (рис. 1).

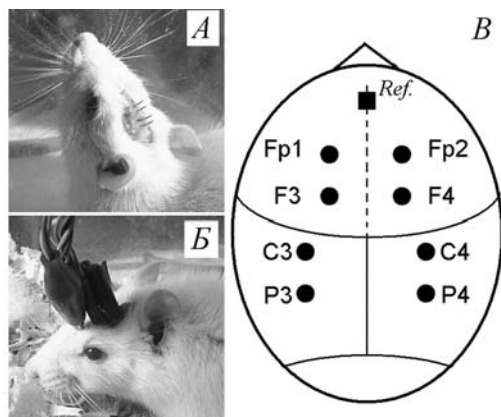


Рис. 1. Расположение электродов на голове крысы. А – крыса с вживленными электродами в свободном поведении. Б – крыса с установленными на электроды контактами для регистрации ЭЭГ, зажим типа «крокодил» установлен на референтном электроде. В – схема расположения электродов на черепае крысы, используемая для построения графических карт.

Наиболее удобными для исследования оказались производные полифторидов фуллеренов $C_{60}F_{24}$ и $C_{60}F_{24}$. $C_{60}F_{24}$ синтезировали по реакции $C_{60}Br_{24}$ с дифторидом ксенона в безводном HF при комнатной температуре. В этих условиях атомы брома в полибромфуллерене замещаются на атомы фтора. $C_{60}F_{48}$ синтезировался по реакции дифторида криптона KrF_2 с фуллереном C_{60} в безводном фтористом водороде в течение 48 часов. $C_{60}F(NO_2)$ синтезировали путем свободнорадикального присоединения к $C_{60}F_{24}$ двуокиси азота. К раствору $C_{60}F_{24}$ в неполярных растворителях при перемешивании при пониженной температуре добавляли сконденсированную двуокись азота. За ходом реакции следили по прекращению выпадения осадка желтого цвета. Выпавший осадок отфильтровывали на бумажном фильтре. Остатки растворителя и непрореагировавшего диоксида азота удаляли в вакууме.

Водорастворимый $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ синтезировали по реакции электрофильного замещения атомов фтора в $C_{60}F_{48}$. К суспензии $C_{60}F_{48}$ в абсолютном бензоле при комнатной температуре добавляли сухой аммиак до полного насыщения, затем фильтровали полученный амин, промывали спиртом, эфиром и высушивали в вакууме. Наконец, фторфуллеренпиридинийфторид $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ синтезировали по реакции замещения атомов фтора в $C_{60}F_{24}$ пиридином в воде при повышенной температуре в течение 6-8 часов. По окончании реакции полученный раствор фильтровали, жидкую фазу упаривали. Полученную таким образом четвертичную аммониевую соль промывали спиртом, эфиром и сушили в вакууме.

Спустя неделю после операции каждое животное помещали в экспериментальную камеру, к разьему на черепе присоединяли контакты и наблюдали за нативной ЭЭГ в течение 15 минут, при этом крыса находилась в свободном поведении. На следующий день эту процедуру повторяли, но 15 минут регистрировали фоновую ЭЭГ. Далее внутрибрюшинно вводили раствор фуллеренила в дозе 100 мг/кг, спустя 3 минуты после введения которого регистрировали ЭЭГ в течение 1 часа. В каждом опыте применяли раствор только одного из фуллеренилов: $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F(NO_2)$, растворимых в диметилсульфоксиде (ДМСО) или гидрофильных $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$, $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$. Объем растворителя составлял 2 мл/кг. Опыты с одним и тем же животным проводили с интервалом в 5-7 дней. Все манипуляции осуществлялись в соответствии с международными нормами этического обращения с животными. На каждом животном был проведен контрольный опыт, когда вместо раство-

ра фуллеренила вводили только ДМСО необходимого объема.

ЭЭГ регистрировали на электроэнцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан-131-03» (фирма «Медиком МТД», Таганрог). Фильтры высоких частот устанавливали на 70 Гц, постоянная времени составляла 0,3 с, режекторный фильтр удалял колебания частотой 50 Гц. Частота опроса составляла 250 Гц. После удаления артефактов запись, содержащую данные ЭЭГ, делили на несколько 64-секундных файлов, таким образом, получали число n для каждого опыта. Спектральную мощность электрической активности мозга (СМ ЭАМ) анализировали с помощью пакета программ MatLab-5 в стандартных физиологических диапазонах частот: дельта (Δ) – 1-4 Гц, тета (θ) – 4,25-8 Гц, сигма (σ) или альфа (α) – 8,25-13 Гц, бета (β) – 13,25-30 Гц, гамма (γ) – 30,25-45 Гц. Эпоха анализа составляла 4 с. Изменения СМ ЭАМ при действии фуллерена для каждого опыта нормировались к фоновым значениям, полученным до инъекции. Достоверность отличий между выборками для одного опыта по каждому диапазону и отведению оценивали по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, для группы опытов с испытанием одного и того же фуллерена – по критерию Стьюдента. Принимали во внимание только достоверные изменения СМ ЭАМ ($p < 0,05$).

Результаты

При введении растворов фуллеренилов наблюдались индивидуальные особенности в реактивности мозга, однако существовали и общие закономерности в ЭЭГ. В начале следует указать на то, что

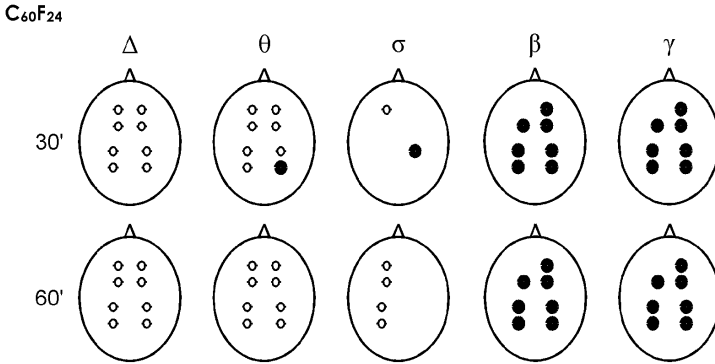


Рис. 2. Изменение СМ ЭАМ после инъекции фуллеренила $C_{60}F_{24}$ ($n=105$ записей по группе). Верхняя строка – изменения в первые 30 минут после введения вещества, нижняя строка – изменения СМ ЭАМ во второй половине эксперимента. По горизонтали представлены диапазоны частот. Большие закрашенные кружки – достоверное повышение СМ ЭАМ, маленькие незакрашенные – достоверное снижение. Отсутствие достоверных изменений по отношению к ДМСО на картах не обозначено.

инъекция одного ДМСО в контрольных опытах ($n=202$ записи по группе) сама по себе вызывала достоверное снижение СМ ЭАМ во всех исследуемых проекционных точках коры, во всех частотных диапазонах, кроме γ , где в центрально-теменных областях обоих полушарий изменений не наблюдалось. Спустя 30 минут после введения растворителя постепенно происходило повышение СМ ЭАМ в Δ -, θ -, σ -диапазонах во всех отведениях.

При сравнении СМ ЭАМ во время действия фуллеренов с данными, полученными после инъекции ДМСО, оказалось, что изменения ЭЭГ, следующие за введением углеродных наночастиц зашумлены результатами, полученными при введении диметилсульфоксида. Кроме этого, снижалась двигательная активность животных, а при движении крыс наблюдалась симптоматика, характерная для раздражения брюшины. Таким образом, электрографические и

поведенческие реакции позволили сравнивать изменения при действии фуллеренилов не с фоновыми значениями, а с теми, которые были получены при введении их растворителя соответственно в первые и последующие 30 минут опыта.

В первой и второй половинах часа после инъекции фуллеренила спектральные характеристики различались с разной степенью выражен-

ности. Главным образом, это проявлялось индивидуально. В ходе анализа по группе некоторая динамика также имела место, но при таком анализе можно было наблюдать относительную устойчивость изменений в течение опыта.

В экспериментах с введением фуллеренила $C_{60}F_{24}$ ($n=105$ записей по группе) в β - и γ -диапазонах происходило увеличение спектральной мощности почти во всех регистрируемых точках, тогда как в Δ - и θ -диапазонах преобладало снижение мощности спектра (рис. 2). Через 30 минут СМ ЭАМ достоверно уменьшилась и в σ -диапазоне в левом полушарии, где сначала достоверных изменений почти не наблюдалось.

Преимущественное снижение спектральной мощности в полосе 1-8 Гц наблюдалось и после инъекции фуллеренила $C_{60}F_{48}$ ($n=80$ записей по группе), (рис. 3). Усиление колебаний имело место в γ -диапазоне в центрально-теменных областях обоих полушарий, однако этих

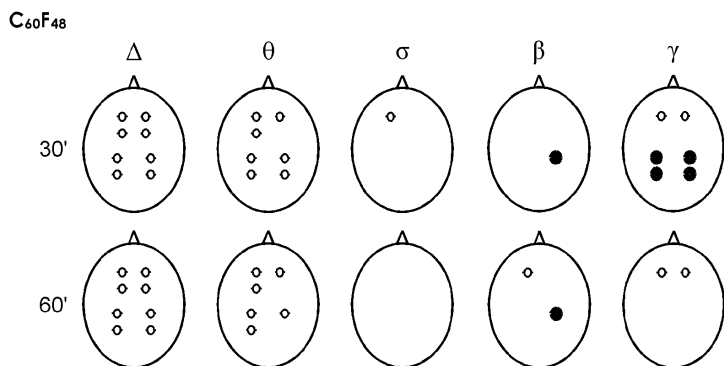


Рис. 3. СМ ЭАМ после введения $C_{60}F_{48}$ ($n=80$ записей по группе). Остальные обозначения, как на рис. 2.

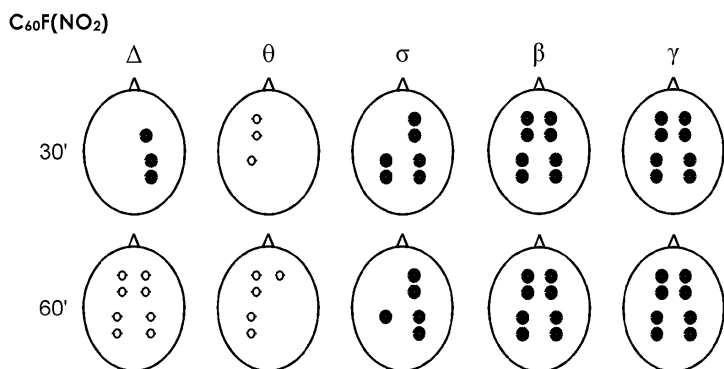


Рис. 4. Изменение СМ ЭАМ после введения $C_{60}F(NO_2)$, ($n=98$ записей по группе). Остальные обозначения, как на рис. 2.

изменений уже не наблюдалось во второй половине опыта. Кроме того, во фронтальной коре отмечалось стойкое снижение СМ ЭАМ.

Устойчивую реакцию головного мозга мы наблюдали после введения фуллеренила $C_{60}F(NO_2)$, ($n=98$ записей по группе): повышение спектра мощности в σ -диапазоне, главным образом, в правом полушарии, а в β -, γ -диапазонах – во всех регистрируемых точках (рис. 4). θ -диапазон характеризовался снижением мощности в левом полушарии. Динамические изменения наблюда-

лись в Δ -диапазоне. В первой половине эксперимента произошло повышение спектральной мощности в правом полушарии, в левом достоверных изменений не обнаружилось, то есть возникла межполушарная асимметрия. Через 30 минут к концу опыта асимметрия исчезла, а изменения приобрели другой знак – произошло снижение мощности Δ -ритма по всей коре.

Сравнение влияния водорастворимого фуллеренила $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ ($n=131$ запись по группе) осуществлялось по отношению к фоновым данным (рис. 5). При этом отмечалось снижение мощности колеба-

ний в Δ - и θ -диапазонах, в других частотных полосах уменьшение значений спектральной мощности регистрировалось только во фронтальной коре. Повышение σ -активности симметрично в центрально-теменных областях было устойчивым в течение всего эксперимента. Кроме того, во второй половине опыта в различных зонах центрально-теменных областей возникло повышение мощности θ - и β -ритма, тогда как в полосе 30-45 Гц снижение СМ ЭАМ генерализовалось.

В наших экспериментах несколь-

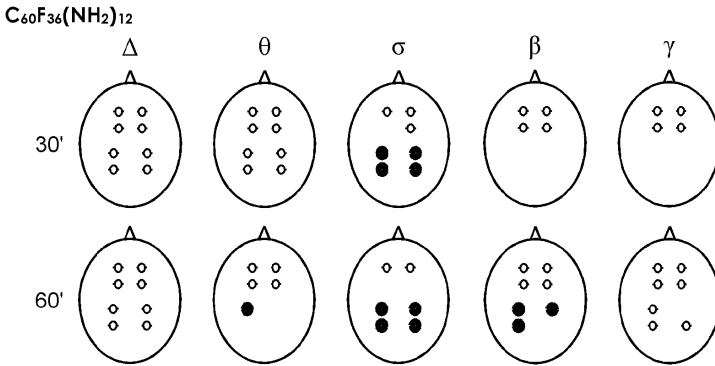


Рис. 5. СМ ЭАМ после инъекции водорастворимого фуллеренила $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ ($n=131$ запись по группе). Верхняя строка – изменения в первые 30 минут после введения вещества, нижняя строка – изменения СМ ЭАМ во второй половине эксперимента. По горизонтали представлены диапазоны частот. Большие закрашенные кружки – достоверное повышение СМ ЭАМ, маленькие незакрашенные – достоверное снижение. Отсутствие достоверных изменений по отношению к фоновым значениям на картах не обозначено.

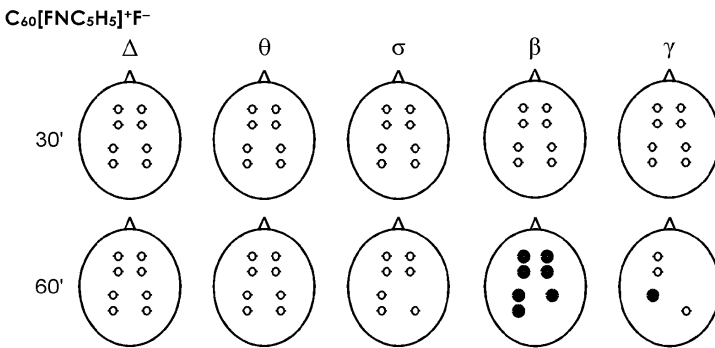


Рис. 6. СМ ЭАМ после введения водорастворимого фуллеренила $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ ($n=73$ записи по группе). Остальные обозначения, как на рис. 5.

ким животным вводили водорастворимый фторфуллеренпиридинийфторид $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ ($n=73$ записи по группе), (рис. 6). Влияние данного соединения на электрическую активность мозга в первые 30 минут выражалось в распространенном по коре снижении спектральной мощности во всех частотных диапазонах. Во второй половине опыта умень-

шение мощности касалось низкочастотной полосы (Δ , θ , σ) и отдельных зон коры в γ -диапазоне, вместе с тем, отмечалось усиление мощности β -ритма.

Обсуждение результатов

В наших экспериментах введение ДМСО интраперитонеально сильно изменяла двигательную активность и ЭЭГ крыс. Спустя 30 минут после введения растворителя мощность низкочастотных ритмов (Δ , θ , σ) возвращалась к фоновому уровню, к концу эксперимента нарушения двигательной активности становились менее выраженными, что говорит об элиминации диметилсульфоксида. Следует подчеркнуть, что при анализе поведения

после инъекций фуллеренилов, растворимых в ДМСО, следует использовать другой способ введения.

Ранее указывалось, что по сравнению с введением фуллерена C_{60} внутрь желудочка мозга, при интраперитонеальной инъекции не наблюдалось изменений двигательной активности в острый период, они были отставлены и проявлялись

спустя месяц. Также при внутрибрюшинном введении в меньшей степени увеличивались концентрации моноаминов в мозге [24]. Результаты наших экспериментов показали, что углеродные наночастицы уже через небольшой промежуток времени начинают оказывать влияние на головной мозг даже при внутрибрюшинном способе введения. Более того, эта реакция различна и, вероятно, зависит от физико-химических свойств фуллеренилов. Маленькие размеры наночастиц и быстрая реакция мозга не вызывает у нас сомнения в том, что фуллеренилы проникают через гематоэнцефалический барьер. Согласно нашим данным, углеродные частицы, вероятно, могут находиться в мозге в течение часа, вызывая специфические изменения в СМ ЭАМ.

Все эксперименты проходили днем, когда крысы были неактивны и могли спать. Известно, что во время медленного сна в коре головного мозга доминирует Δ -ритм [11], также он обнаруживается во время наркоза [23] и других состояниях, характеризующихся снижением уровня сознания. Снижение мощности Δ -ритма и усиление ритмики в высокочастотных диапазонах (β , γ) после введения фуллеренилов $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$ может говорить об активации животного, его переходу к состоянию бодрствования. γ -активность также положительно коррелирует с развитием реакции тревоги и во время реализации ориентировочного рефлекса [3], а реципрокные взаимоотношения Δ - и γ -ритмики при переходе от сна к бодрствованию рассматривались и ранее [17].

Обсуждая электрофизиологический показатель повышения уровня бодрствования, необходимо указать на массу работ,

где анатомическим субстратом высших когнитивных функций является лобная кора. Так, она связана с процессами внимания [10], в ней происходит оценка значимости поступающей зрительной информации [1, 7], префронтальная кора необходима для оценки вероятностных характеристик среды [6]. Следовательно, увеличение мощности β - и γ -ритмов во фронтальной коре после инъекции $C_{60}F_{24}$ или $C_{60}F(NO_2)$ можно объяснить возможным усилением когнитивных процессов восприятия и внимания, связанными с оценкой окружающей обстановки. Наоборот, снижение мощности высокочастотных ритмов при $C_{60}F_{48}$ или $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ связано с подавлением познавательных функций. Наши результаты перекликаются с работой, где однократное введение в желудочек мозга крыс водорастворимого гидратированного фуллерена $C_{60}(OH)_n$ в дозе 7,2 нмоль/желудочек значительно улучшало выполнение когнитивной задачи [19].

Повышение мощности в σ -диапазоне часто связывают с возникновением сонных веретен во время поверхностного синхронизированного сна [9, 17], эта ритмика сменяет Δ -волны в медленноволновом сне [8] и может непосредственно предшествовать быстрому сну [22]. Снижение спектральной мощности в σ -диапазоне после инъекций $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$ вместе с повышением мощности высокочастотных ритмов еще раз указывает на возникновение состояния активации у крыс. После инъекции $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ усиление ритмики в диапазоне 8-13 Гц, вероятно, связано со снижением уровня бодрствования, кроме того, еще через 30 минут увеличилась мощность и в частоте 14-30 Гц. В сопряжении с уменьшением мощности β - и γ -ритмов во фронтальной коре это может говорить

не столько об активации коры, сколько с появлением в ней высокочастотных веретен, которые некоторыми исследователями относят к полосе 11-16 Гц [8].

Снижение θ -активности спустя 3 минуты после интраперитонеального введения любого фуллеренила, возможно, указывает на отсутствие ярко выраженной длительной стрессорной, в том числе, болевой реакции как на саму инъекцию, так и на раствор фуллеренила. В других исследованиях после интраперитонеального введения, например, раствора этанола [5] отмечалось повышение мощности θ -ритма в дорзальных областях неокортекса или гиппокампа, что также отражается в общей ЭЭГ.

Среди полученных результатов интересные изменения СМ ЭАМ наблюдались после введения $C_{60}F(NO_2)$. Вероятно, данный фуллеренил вызывает повышение уровня функционального состояния, а, кроме того, он может обладать свойством, характерным для психотропных препаратов, так как введение этих веществ в определенном интервале доз приводит к росту мощности колебаний в полосе 9-12 Гц [4].

Уменьшение значений СМ ЭАМ во всех частотных диапазонах при действии $C_{60}[FNC_5H_5]+F-$ может являться показателем негативных изменений в функциях центральной нервной системы, так как подобные явления наблюдаются в состоянии комы [2], они же могут быть предвестниками смерти мозга [14]. Однако на восстановительный процесс через 30 минут после инъекции указывает повышение мощности β -ритма.

Следует учесть, что поскольку мы сравнивали действия гидрофобных фуллеренилов на ритмику мозга по отношению к реакциям при введении их раство-

рителя, изменения в сторону снижения на этом условном фоне представляются нам глубокими, так как сам диметилсульфоксид вызывал глобальное снижение СМ ЭАМ. Тогда как повышения, вероятно, количественно не столь значительны.

Выводы

1. Метод внутривентрикулярного введения фуллеренов, растворенных в ДМСО, непригоден, для изучения изменения поведения, так как данная инъекция сильно изменяет двигательную активность крыс и дает искаженный результат.

2. Фуллеренилы, растворенные в ДМСО или воде, при интраперитонеальном введении проникают через гематоэнцефалический барьер, в краткие сроки значимо и на относительно длительный период изменяют функциональное состояние головного мозга; эти реакции различны и, видимо, зависят от физико-химических особенностей углеродных наночастиц.

3. Инъекция $C_{60}F_{24}$ и $C_{60}F_{48}$ приводила к снижению спектральной мощности в Δ - и θ -диапазонах частот и повышению в β - и γ -диапазонах; после введения $C_{60}F_{48}$ изменения в высокочастотных диапазонах были менее выражены, кроме этого, отмечалось снижение мощности γ -ритма во фронтальных областях коры.

4. После введения фуллеренила $C_{60}F(NO_2)$ отмечалось повышение СМ ЭАМ Δ -ритма в правом полушарии, а во второй части эксперимента происходило снижение мощности по всей коре, также уменьшалась θ -активность; вместе с тем, повышение спектров мощности отмечалось в полосе 8-45 Гц в течение всего эксперимента.

5. Водорастворимый $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$

симметрично повышал σ -активность в центрально-теменных областях, что было устойчиво в течение часа, в остальных частотных диапазонах в течение первой половины эксперимента отмечалось снижение СМ ЭАМ главным образом во фронтальных областях, во второй половине происходило повышение мощности спектра в центрально-теменных отведениях в полосе 13-30 Гц.

6. Фторфуллеренпиридинийфторид в первые 30 минут снижал активность электрическую активность всех анализируемых областей мозга во всех частотных диапазонах, во второй половине опыта отмечалось усиление мощности β -активности.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении работы и консультирование В.И. Королевой и В.И. Давыдову (Институт высшей нервной деятельности РАН, Москва).

Литература

1. Батуев А.С. Высшие интегративные системы мозга. – Л.: Наука, 254 с., 1981.

2. Добронравова И.С. Реорганизация электрической активности мозга человека при угнетении и восстановлении сознания (церебральная кома): Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. – М.: ТОО «Корина», с.18. 1996.

3. Думенко В.Н. Высоочастотные компоненты ЭЭГ и инструментальное обучение. – М.: Наука, с. 29, 2006.

4. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, с.355-381. 2007.

5. Кожечкин С.Н., Свидерская Н.Е.,

Коштянц О.Х., Середенин С.Б. Влияние этанола в различных дозах на ЭЭГ крыс. Многопараметрический анализ // *Эксперим. клин. фармакология*, Т. 67, № 5, с. 46-50. 2004.

6. Преображенская Л.А., Иоффе М.Е. Влияние повреждения префронтальной коры на поведение собак в условиях конфликта между вероятностью и ценностью подкрепления // *Фундаментальные и клинические аспекты интегративной деятельности мозга: Материалы Межд. чтений, посвящ. 100-летию со дня рождения чл.-корр. АН СССР, акад. Ан АрмССР Э.А. Асратяна: Москва, ИВНД и НФ РАН, 27-30 мая 2003 г.* – М.: МАКС Пресс, с.186, 2003.

7. Черенкова Л.В., Юннатов Ю.А. Влияние повреждения ассоциативных зон неокортекса на характер выполнения задачи зрительно-моторной координации у кошек // *Журн. высш. нерв. деят.*, Т. 30, № 5, С. 954-963, 1980.

8. Bjorvatn B., Fagerland S., Ursin R. EEG power densities (0.5-20 Hz) in different sleep-wake stages in rats // *Physiol Behav. Vol. 63, No. 3, pp. 413-417, 1998.*

9. Cipolla-Neto J., Negrão N., Afeche S.C., Paludetti L.A., Benedito-Silva A.A., Marques N., Menna-Barreto L. Remarkable similarities between the temporal organization of neocortical electrographic sleep patterns of rats and humans // *Braz J Med Biol Res. Vol. 21, No. 3, pp. 599-601, 1988.*

10. Dalley J.W., Theobald D.E., Bouger P., Chudasama Y., Cardinal R.N., Robbins T.W. Cortical cholinergic function and deficits in visual attentional performance in rats following 192 IgG-saporin-induced lesions of the medial prefrontal cortex // *Cereb Cortex. Vol. 14, No. 8, pp. 922-932, 2004.*

11. Dang-Vu T.T., Desseilles M., Laureys S., Degueldre C., Perrin F., Phillips C., Maquet P., Peigneux P. Cerebral correlates of delta waves during non-REM sleep revisited // *Neuroimage*. Vol. 28, No. 1, pp. 14-21, 2005.
12. Isakovic A., Markovic Z., Todorovic-Markovic B., Nikolic N., Vranjes-Djuric S., Mirkovic M., Dramicanin M., Harhaji L., Raicevic N., Nikolic Z., Trajkovic V. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene // *Toxicol Sci*. Vol. 91, No. 1, pp. 173-183, 2006.
13. Kamat J.P., Devasagayam T.P., Priyadarsini K.I., Mohan H., Mittal J.P. Oxidative damage induced by the fullerene C60 on photosensitization in rat liver microsomes // *Chem Biol Interact*. Vol. 114, No. 3, pp. 145-159, 1998.
14. Klein H.J., Rath S.A., Göppel F. The use of EEG spectral analysis after thiopental bolus in the prognostic evaluation of comatose patients with brain injuries // *Acta Neurochir Suppl*. Vol. 42, pp.31-34, 1988.
15. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs // *Adv Drug Deliv Rev*. Vol. 47, No. 1, pp. 65-81, 2001.
16. Lyon D.Y., Alvarez P.J. Fullerene water suspension (nC60) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation // *Environ Sci Technol*. Vol. 42, No. 21, pp. 8127-8132, 2008.
17. Maloney K.J., Cape E.G., Gotman J., Jones B.E. High-frequency γ electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat // *Neurosci*. Vol. 76, No. 2, pp. 541-555, 1997.
18. Misirkic M.S., Todorovic-Markovic B.M., Vucicevic L.M., Janjetovic K.D., Jokanovic V.R., Dramicanin M.D., Markovic Z.M., Trajkovic V.S. The protection of cells from nitric oxide-mediated apoptotic death by mechanochemically synthesized fullerene (C(60)) nanoparticles // *Biomaterials*. Vol. 30, No. 12, pp. 2319-2328, 2009.
19. Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G., Marsagishvili L.G., Shpagina M.D., Kaminsky Y.G., Andrievsky G.V., Klochkov V.K. Effects of hydrated forms of C60 fullerene on amyloid 1-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task // *J Nanosci Nanotechnol*. Vol. 7, No. 4-5, pp. 1479-1485, 2007.
20. Porter A.E., Muller K., Skepper J., Midgley P., Welland M. Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography // *Acta Biomater*. Vol. 2, No. 4, pp. 409-419, 2006.
21. Selvi B.R., Jagadeesan D., Suma B.S., Nagashankar G., Arif M., Balasubramanyam K., Eswaramoorthy M., Kundu T.K. Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo // *Nano Lett*. Vol. 8, No. 10, pp. 3182-3188, 2008.
22. Tobler I., Deboer T. Sleep in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi* // *Sleep*. Vol. 24, No. 2, pp. 147-54, 2001. *Comment in: Sleep*. Vol. 25, No. 1, pp. 11-13. 2002.
23. Xu J., Zheng C., Liu X., Pei X., Jing G. Detecting brain activity variation of rat during anesthesia by spectral entropy // *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. Vol. 7, pp 6985-6988, 2005.
24. Yamada T., Jung D.Y., Sawada R., Matsuoka A., Nakaoka R., Tsuchiya T. Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60]fullerene on

brain functions differ in rats // *J Nanosci Nanotechnol.* Vol. 8, No. 8, pp. 3973-3980, 2008.

25. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S.,

Sueki K., Nakahara H., Enomoto S., Ambe F. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // *Chem Biol.* Vol. 2, No. 6, pp. 385-389, 1995.

THE CHANGES OF EEG POWER SPECTRA AFTER INTRAPERITONEAL INJECTION OF FLUORINE-CONTAINING C₆₀ FULLERENE DERIVATIVES

N.N. Karkischenko¹, D.S. Sakharov¹, A.A. Filippov², V.B. Sokolov²

¹Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow

²Russian Research Center "Kurchatov Institute", Moscow

In the future fullerenes and their derivatives widely can be applied in the technician and medicine. We investigated influence of fluorine-containing C₆₀ fullerene derivatives (fullerenyles) upon a brain functional state of waking rats by spectral analysis of EEG method. The EEG was recorded within an hour after 3 minutes of the intraperitoneal injection of carbon nanoparticles in a dose of 100 mg/kg. In different experimental days we introduced one of the fullerenyles solved in a dimethylsulfoxide (C₆₀F₂₄, C₆₀F(NO₂)C₆₀F₄₈) or in a water (C₆₀F₃₆(NH₂)₁₂, C₆₀[FNC₅H₅]⁺F⁻). EEG data normalized to the background value or at influence of simple dimethylsulfoxide. It has been fined fullerenyles even after the intraperitoneal injection cross the blood-brain barrier and evoke relative long-term effect considerable change of a brain functional state for short time. These reactions are different and probably depend on physical and chemical properties of carbon nanoparticles. Results of each fullerenyles injection are discussed.

Key words: EEG power spectra, intraperitoneal injection, fluorine-containing C₆₀ fullerene derivatives, fullerenyles.



Исследование гомозиготности двух сублиний BALB/cY и BALB/cP высоко инбредной линии BALB/c

Х.Х.Семенов, Н.Н.Каркищенко, Т.Б.Бескова, Е.Л.Матвеевко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Настоящая работа посвящена исследованию гомозиготности мышей двух сублиний: BALB/cY – поддерживаемой в ГУ НЦБМТ РАМН лабораторией генетики, и BALB/cP – находящейся на размножении в питомнике лабораторных животных филиала ФИБХ РАН. Исследование проводилось методом изотрансплантации кожи. Установлено, что у мышей BALB/cY трансплантаты прижились стопроцентно. Это означает, что мыши линии BALB/cY – гомозиготны, генетически стандартны. Согласно результатам исследования между мышами линии BALB/cY и BALB/cP проявилась сублинейная гистонесовместимость. Вместе с тем, генетически неоднородными оказались мыши внутри самой сублинии BALB/cP.

Ключевые слова: трансплантация, гомозиготность, инбредные мыши, сублиния.

Иммуногенетика – наука, включающая в себя методы и принципы как генетики, так и иммунологии. Одно из главных направлений в иммуногенетике составляет генетика совместимости тканей. Основные данные, которые определяют современный уровень в этой области знаний были получены в результате изучения одного объекта – лабораторной мыши [6]. Причина выбора мышей в качестве объекта исследований заключается в том, что уже в первой половине прошлого столетия было выведено большое количество инбредных линий мышей [8], а также в исключительных успехах генетики мыши [5]. Использование генетически контролируемых животных составляет необходимое условие успешного развития генетики совместимости тканей.

Гомозиготность, генетическая стандартность линейных животных поддерживается строгим соблюдением правил

разведения инбредной линии – постоянным, тесным инбридингом, методом братско-сестринского скрещивания. Однако даже при тщательном соблюдении всех правил существует опасность возникновения гетерозиготности в высоко инбредных линиях животных. Причиной тому могут явиться как спонтанные мутации, вызванные естественным фоном радиации и другими вредными факторами окружающей среды, так и случайные скрещивания [7]. Поэтому необходимым условием для производства качественных лабораторных животных является обеспечение постоянного контроля генетической чистоты инбредных линий по генам гистосовместимости.

Материалы и методы

Для исследования были использованы мыши двух сублиний высоко инбред-

ной линии BALB/c – BALB/cY, которая поддерживается в коллекционном фонде мышей инбредных линий НЦБМТ РАМН. Мыши BALB/c поступили из Джексоновской лаборатории США в 1958 г. на 70-м поколении инбридинга (F70) в филиал «Столбовая». В Научный центр (ранее НИЛЭБМ РАМН) линия была передана из филиала «Столбовая» на 105-м поколении инбридинга (F105). В настоящее время инбредный возраст линии BALB/cY достиг 188 поколения (F188). Племенное ядро мышей линии BALB/cY поддерживается в лаборатории генетики Центра в конвенциональных условиях на гранулированном комбикорме ПК-120, в клетках фирмы Велаз Т-2, имеют сублинейный символ Y (Юрлово). Контроль гомозиготности, осуществленный в 2005 г., подтвердил идентичность мышей BALB/cY по генам гистосовместимости (H-генам) как в племенном ядре Центра, так и у животных, разводимых в филиале «Столбовая».

Вторая сублиния BALB/c – мыши, которых разводят в питомнике лабораторных животных филиала института Биоорганической химии им. академиком М.М.Шемакина и Ю.А.Овчинникова (ФИБХ РАН, Пущино), куда они поступили в 2006 г. из питомника Charles River Laboratory (США). Пущинскую сублинию мы условно обозначили символом P – BALB/cP. Чтобы избежать влияния H-Y-антигенов, трансплантанты от самцов на самок не пересаживают: в выборку включают либо самок, либо самцов [4, 9]. В опыт для длительного наблюдения удобнее брать самок, так как половозрелые самцы агрессивны. Поэтому для исследования были отобраны 9 самок из племенного ядра инбредной линии BALB/cY так, чтобы в опыты включить мышей от

максимального количества размножающихся пар. Из питомника лабораторных животных филиала ФИБХ РАН было получено 4 самки линии BALB/cP.

Таким образом, обмен кожными трансплантатами с хвоста на бок выполняли на мышах одного пола.

Для контроля гомозиготности генетической однородности мышей инбредных линий был использован метод изотрансплантации кожи. Ценность этого метода заключается в том, что он: 1) позволяет контролировать гомозиготность по большому числу генов, так как совместимость тканей – полигенный признак; 2) дает возможность выявить очень слабые генетические различия между животными одной линии, обусловленные остаточной гетерозиготностью или спонтанными мутациями; 3) технически достаточно прост и не требует больших материальных затрат; 4) чтение результатов однозначно – приживление или отторжение пересаженной кожи; 5) генетическое засорение выявляется в короткие сроки.

Критерием гомозиготности инбредных животных при контроле методом трансплантации кожи служит 100%-приживление трансплантатов в пределах линии [3]. Для контроля на гомозиготность племядра были отобраны 2-3-х месячные мыши. Трансплантация кожи с хвоста на бок с правой стороны в области грудной клетки осуществлялась по общепринятой методике [2] в современной модификации [1]. Наблюдение за состоянием трансплантатов проводилось ежедневно в течение 30 дней, начиная с момента снятия повязки, затем 1 раз в неделю, после 200 дней 1 раз в месяц. Общий срок наблюдения при проверке на гомозиготность племенного ядра инбредной линии составляет 250-300 дней.

Как правило, в инбредной линии у мышей неприживание трансплантатов на 7-9-й день после операции происходит по техническим причинам, таким как слабое наложение повязки, случайное приклеивание коллодием трансплантата к повязке, кровоточащее ложе, сдвиг трансплантата при наложении повязки. Иногда отрицательный результат бывает из-за того, что после снятия повязки животные чешутся и срывают трансплантаты. В наших опытах отторжений по техническим причинам не наблюдалось. На пересаженной коже шерсть начинает расти на 14-20-й день после операции.

Если животные инбредной линии действительно гомозиготны, то все трансплантаты будут в хорошем состоянии в течение всего срока наблюдения, покрытые волосками, характерными для хвоста. Если наблюдается отторжение трансплантатов в ранние сроки наблюдения, то оно протекает по типу острой реакции: трансплантат воспален, образуется струп, реакция кончается полным некрозом трансплантата. Такой тип отторжения может быть в ранние сроки наблюдения (8-14-й день) и поздние (35-40-й день). Если все или большинство трансплантатов отторгается по типу острой реакции, следует делать вывод о гистонесовместимости по причине генетического засорения линии и животных такой линии считать генетически нестандартными. Иногда наблюдаются единичные случаи отторжения, как правило, от одного или двух родственных доноров. В этом случае можно полагать, что в линии возникла мутация сильного гена гистосовместимости. Животных сублинии, несущей эту мутацию, выводят из размножения, тем самым гомозиготность племенного ядра инбредной линии

восстанавливается.

Иногда наблюдают хроническое отторжение трансплантата: медленное облысение, шелушение эпидермиса, в конце концов трансплантат превращается в лысый блестящий рубец. Такую картину можно наблюдать, начиная с 40-го дня по 100-й и после 200-го дня наблюдения. Причиной является слабая гистонесовместимость, как результат мутирования слабых H-генов. Такие сублинии также выводятся из размножения в племенном ядре.

Во всех случаях отторжения трансплантатов по техническим или иммуногенетическим причинам делают повторную трансплантацию кожи от того же донора, но не раньше, чем через 14 дней после регистрации отторжения.

Результаты исследований

Результаты проверки гомозиготности мышей двух сублиний BALB/cY и BALB/cP приведены в таблице. В первом опыте, в который были включены только мыши внутри самой сублинии BALB/cY, изотрансплантация кожи показала высокую степень гомозиготности – прижились стопроцентно все 14 трансплантатов, что свидетельствует об отсутствии каких-либо изменений в локусе H-генов.

Во втором опыте был осуществлен контроль гомозиготности мышей сублиний BALB/cY и BALB/cP, у которых провели пересадку кожных локусов как в прямой, так и в обратной комбинации. В итоге более 80% трансплантатов были отторгнуты мышами как одной, так и второй сублинии. Наблюдаемое отторжение трансплантатов происходило, начиная с 37-40-го дня и шло по хроническому типу: облысение, шелушение эпидермиса, медленное превращение

Таблица

Результаты контроля гомозиготности у мышей сублиний BALB/cY и BALB/cP

№ опыта	Вариант пересадки	Число трансплантатов			
		всего	прижилось	отторглось	% отторжения
1	Y→Y	14	14	-	-
2	Y→P	12	3	9	81,8
	P→Y	10	1	9	
3	P→P	4	2	2	50

трансплантата в лысый блестящий рубец. Возможной причиной является гистонесовместимость, как результат мутирования слабых H-генов.

Аналогичную картину можно было наблюдать и в третьем опыте, где исследовались на гистосовместимость мыши внутри самой сублинии – BALB/cP. Отторжение трансплантатов у самок шло по тому же типу, что и между сублиниями BALB/cY и BALB/cP, т.е. имело место хроническое отторжение трансплантатов. Результаты этого опыта лишь подтверждают наше предположение о том, что у мышей сублинии BALB/cP произошла мутация в локусе слабых H-генов, которая и явилась причиной слабой гистонесовместимости их как с мышами сублинии BALB/cY, так и внутри самой сублинии BALB/cP.

Повторная трансплантация кожи от того же донора через 14 дней не повлияла на результаты опыта. Отторжение трансплантатов происходило, как и в первом варианте исследования. Животные таких сублиний выводятся из размножения в племенном ядре.

Обсуждение

Проведенный контроль гомозиготности двух сублиний высоко инбредной линии BALB/c подтвердил методически верное ведение генетико-селекционной

работы с племенными ядрами инбредных линий мышей коллекционного фонда НЦБМТ РАН сотрудниками лаборатории генетики. Свидетельством тому может служить гомозиготность инбредной линии мышей BALB/cY, у которой прижились все трансплантаты. Что касается мышей сублинии BALB/cP из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, то необходимо отметить, что они оказались гистонесовместимыми не только с мышами BALB/cY, но и внутри самой сублинии BALB/cP. Приведенные факты позволяют дать объяснение полученным в настоящей работе результатам. Известно, что у животных долгое время разводимых в разных источниках, возможно проявление сублинейных различий, вызванных, как ранее было указано, мутацией слабых H-генов, возникающих под воздействием естественного фона радиации, и других вредных факторов окружающей среды.

Поскольку генетическая несовместимость мышей сублинии BALB/cP проявилась не только с мышами сублинии BALB/cY, т.е. взятой из другого источника (Юрлово), но и внутри самой сублинии BALB/cP, то животные такой сублинии не могут считаться генетически стандартными и, следовательно, подлежат выведению из размножения в племенном ядре.

Сотрудникам питомника лаборатор-

ных животных ФИБХ РАН следует регулярно (через 4 поколения) проводить генетический мониторинг, что позволит уберечь племенное ядро линии от всех форм генетических изменений.

Выводы

1. Результаты проведенного исследования выявили наличие сублинейного различия между мышами сублиний BALB/cY и BALB/cP, что было доказано отторжением трансплантатов при проведении изотрансплантации кожи между ними.

2. Выявлена гистонесовместимость мышей внутри сублинии BALB/cP из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, что является следствием произошедшей мутации в локусе слабых H-генов. Такие генетически нестандартные сублинии, как правило, выводятся из размножения племенного ядра.

3. Все трансплантаты, проведенной пересадки кожи, прижились стопроцентно; сублиния BALB/cY – гомозиготна, генетически стандартна – об этом свидетельствуют результаты контроля гомозиготности мышей из племенного ядра коллекционного фонда НЦБМТ РАМН, где поддерживается данная сублиния.

Литература

1. Бескова Т.Б. Модификация метода реципрокной трансплантации кожи у лабораторных мышей // *Биомедицина*, № 6, с.161-163, 2007.

2. Бландова З.К. Контроль гомозиготности инбредных линий мышей и крыс методом трансплантации кожи. Методические указания. – М., 1982.

3. Billingham R.E., Silvers W.K. Inbred animals and tissue transplantation

immunity // *Plast. and reconstr. surg. and transpl. bill.*, vol. 28, pp. 199-406, 1959.

4. Billingham R.E., Hodge B.A., Silvers W.K. An estimate of the number of histocompatibility loci in the rat // *Proc. nat. acad. sci. US*, vol. 48, pp. 138-147, 1962.

5. Green M.C. Mutant genes and linkages // *In Biology of the laboratory mouse* / ed. E.L.Green – N.Y.: McGraw-Hill, pp.87-151, 1966.

6. Snell G.D. The H-2 locus the mouse: Observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. – *Folia boil. (CSSR)*, v. 4, pp. 335-358, 1968.

7. Snell G.D. Note on results of Linder and Klein with coisogenic resistant of mice // *J. Nat. cancer inst.*, vol. 25, pp.1191-1193, 1960.

8. Staats J. Standardized nomenclature for inbred strains of mice: third listing // *Cancer res.*, vol. 24, pp. 147-168, 1964.

9. Ziess I.M. Demonstration of isohistogenicity in groups of rats from partionally inbred strains // *Transplantation*, vol. 4, pp. 506-509, 1966.

**THE STUDY OF HOMOZYGOSIS IN TWO SUBSTRAINS
BALB/cY AND BALB/cP OF HIGH INBREAD BALB/c STRAIN**

H.H.Semenov, N.N.Karkischenko, T.B.Beskova, E.L.Matveenko
Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow

Homozygosis of two mice substrains (BALB/cY and BALB/cP) has been studied. The BALB/cY substrains is kept in the Scientific center of biomedical technologies RAMS. The BALB/cP substrain mice are breed in Branch of Institute of Bioorganic Chemistry RAS. Method of skin isotransplantation used in these experiments. Transplants in the BALB/cP substrain mice survived in 100%. It means that BALB/cP substrain mice are homozygous and standard genetically. According to the study results between BALB/cY and BALB/cP revealed substrainical tissue incapability. Additionally, BALB/c substrain mice were heterogeneous genetically by themselves.

Key words: transplantation, homozygosis, substrain, inbred mice substrain.



Роль полиморфизма гена VDR, кодирующего рецептор витамина D, в патогенезе артериальной гипертензии

Е.В.Ших, Н.М.Милотова

ФГУ НЦ ЭСМП Росздравнадзора, Москва,

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Изучение ассоциации Fok I полиморфизма гена VDR с различиями в активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) и состоянии фосфорно-кальциевого обмена при артериальной гипертензии (АГ) проводилось на 49 больных (19 мужчин и 30 женщин) с артериальной гипертензией (АГ). Больным проводили суточное мониторирование артериального давления, анализ параметров РААС (ренина, ангиотензина I), уровней общего и ионизированного кальция, фосфора и генетическое тестирование методом ПЦР-ПДРФ. Было установлено, что Fok I полиморфизм гена VDR ассоциирован с изменением возраста возникновения АГ и с вариабельностью дневных значений САД.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, витамин D, рецептор витамина D (VDR), полиморфизм гена VDR.

Рациональное лечение артериальной гипертензии (АГ) является одной из самых актуальных проблем современной кардиологии. По данным эпидемиологических исследований, среди населения планеты АГ страдают от 450 до 900 млн. человек, в России – более 40 млн. человек [4]. В странах Запада артериальное давление (АД) должным образом контролируется менее чем у 30% населения, а в России у 17,5% женщин и 5,7% мужчин больных АГ. Коррекция факторов риска реально позволяет снизить показатели сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности. Поэтому польза от снижения АД доказана не только в целом ряде крупных многоцентровых исследований, но и реальным увеличением продолжительности жизни [2].

Особое внимание в последние десятилетия уделялось изучению функций и

механизмов действия ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС). В настоящее время, РААС занимает ведущее место в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), в том числе и АГ [2, 3, 19]. В последние десятилетия в зарубежных статьях стали появляться новые данные о возможной протективной роли витамина D и его аналогов при различных ССЗ, и в частности, о его влиянии на работу РААС [16, 19, 20].

Для более подробного изложения проблемы рассмотрим систему витамина D и его метаболизма. Витамин D был открыт Виндаусом в начале 30-х годов прошлого столетия. Известны 2 различные формы витамина D – эргокальциферол (витамин D₂, который и был открыт первым) и холекальциферол (витамин D₃). Витамин D₂ абсорбируется, преимущественно, из обогащенных пищевых продуктов. Физиоло-

гический уровень витамина D₃ зависит от его поступления с пищей, а также от процессов его биосинтеза из 7-дегидрохолестерола в глубоко расположенных и активно растущих слоях эпидермиса под влиянием УФ солнечных лучей. Витамины D₂ и D₃ имеют природные провитамины – эргостерин и 7-дегидрохолестерол, соответственно. При (облучении УФ-светом) провитамины превращаются в соответствующие витамины [1, 5].

Метаболизм холекальциферола в организме человека включает следующие этапы (рис.1): под воздействием солнечных УФ-лучей из 7-дегидрохолестерола (провитамина D₃) образуется прехолекальциферол (пре-витамин D₃), последний переходит в витамин D₃ (холекальциферол) под действием температуры тела [12]. В эпидермисе холекальциферол связывается с витамин-D-связывающим белком и в таком виде поступает в кровь и переносится в печень. Там он метаболизируется с помощью фермента 25-гидроксилазы до 25-гидроксиохолекальциферола – 25(OH)D₃. Последний является главным циркулирующим метаболитом витамина D и имеет очень низкую биологическую активность. По концентрации 25(OH)D₃ судят о содержании в орга-



Рис. 1. Схематичное изображение метаболизма витамина D

низме всех форм витамина D, что может быть использовано для определения обеспеченности им организма. Далее, 25(OH)D₃ в проксимальных почечных канальцах под действием митохондриального фермента 1α-гидроксилазы подвергается 1- или 24-гидроксилированию с образованием 1,25(OH)₂D₃ (Кальцитриола) или 24,25(OH)₂D₃ (Секакальцифедола) соответственно [1, 5, 12].

Выяснилось, что главным ферментом, осуществляющим реакцию гидроксилирования витамина D₃ в 25(OH)D₃, является CYP3A4 или по-другому 25-гидроксилаза. Гидроксилирование 25(OH)D₃ до 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃ осуществляют 2 изофермента цитохрома P-450:

Таблица 1
Классификация статуса витамина D в соответствии с концентрацией 25(OH)D₃

Статус	Концентрация 25(OH)D ₃ (нмоль/л)	Биохимические/клинические симптомы
Дефицит	0-25	Тяжелый гиперпаратиреоз, мальабсорбция кальция, рахит, остеомаляция, миопатия
Недостаточность	>25-50	Повышение уровня паратиреоидного гормона (ПТГ), снижение абсорбции кальция в кишке и минеральной плотности костной ткани, субклиническая миопатия
Гиповитаминоз	>50-70 и менее 100	Снижение содержания витамина D в организме, незначительное повышение уровня ПТГ
Норма	От 70-100 до 250	Витамин D-зависимые функции не нарушены
Токсичность	Более 250	Чрезмерная абсорбция кальция в кишке, гиперкальциемия

CYP27A1 и CYP27B1. Они локализованы в проксимальных почечных канальцах [3, 7, 11].

В зависимости от его концентрации в крови, выделяют следующие витамин D-зависимые состояния (табл. 1): дефицит, недостаточность, гиповитаминоз, норма, токсичность и их клинические проявления [31].

С учетом названных критериев было выяснено, что 1 млрд. человек во всем мире имеет дефицит витамина D или его недостаточность [12].

Многие факторы влияют на статус витамина D. Самой частой причиной недостаточности или дефицита витамина D является недостаточное его поступление в организм. К пищевым продуктам, содержащим витамин D в натуральном виде, можно отнести жирные сорта рыбы: лосось, макрель и сельдь, печень трески, и высушенные на солнце грибы Шиитаке, содержащие до 1600 МЕ витамина D на 100 г сухой массы [12].

Наша кожа и УФ-лучи – это основной источник витамина D. В коже взрослого человека на 1 см² под действием УФ-лучей синтезируется 1 нг холекальциферола [12]. Старение, повышенная пигментация кожи и ожирение сопровождаются дефицитом витамина D. Уровень 7-дегидрохолестерола в коже с возрастом снижается. У лиц 70 лет и старше продуцируется только 25% холекальциферола по сравнению с молодыми [12]. Кроме того, солнцезащитные средства эффективно поглощают солнечные УФ-лучи. Проницаемость белой кожи для УФ-лучей составляет около 20-30%, тогда как для сильно пигментированной кожи – менее 5%. Витамин D депонируется в адипоцитах подкожно-жировой клетчатки. Однако при ожирении у детей и взрослых холекальциферол депониру-

ется в более глубоких слоях подкожно-жировой клетчатки, что затрудняет его биодоступность [12].

При наличии достаточного содержания витамина D в крови может иметь место низкая продукция 1,25(OH)₂D₃. Одной из главных причин снижения синтеза – дефект почечного, окончательного этапа образования 1,25(OH)₂D₃ [3, 5]. Уменьшение продукции 1,25(OH)₂D₃ наблюдается уже при умеренном снижении азотовыделительной функции почек, а именно при значении показателя клубочковой фильтрации <60 мл/мин. Воспалительные заболевания могут также вести к снижению активности 1α-гидроксилазы в почечных канальцах [18].

Основная функция веществ группы витамина D – это, прежде всего, регуляция костного метаболизма. Только 10-15% кальция и около 60% фосфора абсорбируется без участия витамина D. 1,25(OH)₂D₃ – гормонально-активная форма витамина D, взаимодействуя с рецептором витамина D (VDR), повышает всасывание кальция и фосфора в кишечнике до 30-40% и 80%, соответственно. Вместе с тем под контролем витамина D находится и процесс мобилизации кальция из костной ткани, что также необходимо для создания оптимальных условий ее роста. Обмен кальция и фосфатов регулируется не только витамином D, но также самим уровнем ионизированного кальция, паратиреоидным гормоном (ПТГ) и кальцитонином [5, 12].

Как было отмечено выше, активные метаболиты витамина D действуют на уровне органов-мишеней, обладающих специфическими рецепторами витамина D (VDR). VDR – это член подсемейства тиреоидных гормонов (ТЗ), являющийся ядерным транскрипционным фактором

[10]. Как и рецепторы других стероидных гормонов, рецепторы витамина D после связывания с лигандом активируются, и, взаимодействуя в ядре со специфической последовательностью ДНК, контролируют транскрипцию соответствующих генов. VDR широко представлены в организме, причем не только в классических органах-мишенях, таких как кишечник, почки и кости, но и в мозге, сердце, эндотелии сосудов, гладко-мышечных клетках, поджелудочной, предстательной и паращитовидной железах, коже и других органах [12, 19]. Однако широкое распространение VDR в тканях предполагает, что данная система помимо кальциевого гомеостаза, имеет дополнительные физиологические функции. Действительно, было показано, что витамин D и его активные метаболиты играют важную роль в иммунной, сердечно-сосудистой, репродуктивной системах, в углеводном обмене, росте волос, а также тормозят пролиферацию кератиноцитов кожи и активируют их дифференцировку, предотвращают развитие различных опухолей [12, 16, 22, 32]. Кроме того, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ прямо или опосредованно контролирует работу более чем 200 генов, регулируя клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и ангиогенез. Данная регуляция заключается в уменьшении клеточной пролиферации как нормальных, так и раковых клеток, и в ускорении их конечной дифференцировки [12].

Согласно клиническим исследованиям, имеется обратная связь между низким уровнем витамина D и активностью ренина плазмы, уровнем АД, атеросклерозом коронарных артерий и различными ССЗ, в частности АГ [9, 16, 20, 31].

В 1979 г. Rostand сообщил свои наблюдения о том, что у людей, живущих в

северных широтах, выше риск развития АГ. Он предположил, что при увеличении расстояния от экватора снижается синтез витамина D и развивается его дефицит [25]. Действительно, было замечено, что с каждыми 10° удаления от экватора происходит прогрессивное снижение интенсивности УФ-излучения, обуславливающее снижение синтеза витамина D в коже и уменьшение концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ в крови (рис. 2). Проведенные экологические исследования выявили более высокую частоту развития ишемической болезни сердца (ИБС) и АГ с увеличением расстояния от экватора [25, 31]. В исследовании INTERSALT показана выраженная положительная взаимосвязь

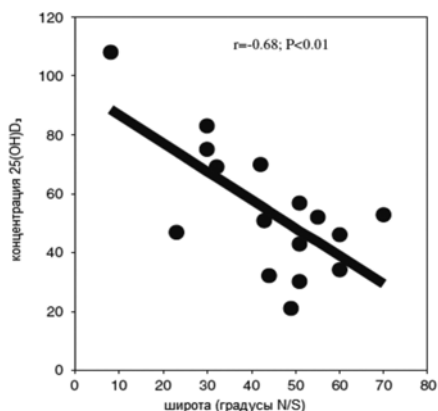


Рис. 2. Средние значения $25(\text{OH})\text{D}_3$ у детей, подростков и взрослых в соответствии с географической широтой

между средними значениями систолического и диастолического АД (САД, ДАД) по отношению к значениям широты к северу или югу от экватора. Т.е. увеличение средних значений САД и ДАД при удалении севернее или южнее от экватора [13].

Krause и соавт. подвергали УФ-излучению пациентов с АГ 3 раза в неделю в течение 6 недель. Наряду с увеличе-

нием уровня $25(\text{OH})\text{D}_3$ в плазме на 162%, происходило снижение САД и ДАД на 6 мм рт.ст. [15]. Кроме того, сообщалось, что 4-недельная терапия витамином D и кальцием уменьшала систолическое АД в группе пожилых женщин без АГ, имеющих дефицит витамина D, и что терапия витамином D в течение 18-недель у лиц с АГ уменьшала АД, активность ренина плазмы и уровень АТ II [24].

В проспективном исследовании, проведенном J.P. Forman, E. Giovannucci и соавт., оценивалась независимая взаимосвязь между измеренными и прогнозируемыми уровнями $25(\text{OH})\text{D}_3$ и риском развития АГ. Было выявлено, что риск развития АГ в группе мужчин и женщин, имеющих уровень $25(\text{OH})\text{D}_3$ в пределах дефицита или тенденцию к его снижению, достоверно выше по сравнению с группой, где уровень $25(\text{OH})\text{D}_3$ был в пределах нормы. Причем эта взаимосвязь не зависела от возраста, индекса массы тела (ИМТ), физической активности, расы и других факторов [8].

Другое проспективное исследование проводилось на основе выборки пациентов из Фрамингемского исследования. T.J. Wang и соавт. [28] изучили взаимосвязь между статусом витамина D и риском сердечно-сосудистых событий (ССС). В данном исследовании концентрация $25(\text{OH})\text{D}_3 < 37,5$ нмоль/л была определена как дефицит витамина D. В течение последующих 7,6 лет (в среднем 5,4 лет), 120 участников исследования (из них 57 женщин) пережили первый случай сердечно-сосудистого заболевания. Частота развития СССР была приблизительно вдвое выше у пациентов с недостаточностью или дефицитом витамина D, т.е. при концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3 < 37,5$ нмоль/л, чем у пациентов с концентраци-

ей $25(\text{OH})\text{D}_3 > 37,5$ нмоль/л, 8,9% и 4,4%, соответственно ($p < 0,001$). Наиболее высокая частота СССР наблюдалась у пациентов с дефицитом витамина D и АГ, по сравнению с пациентами с дефицитом витамина D, но без АГ, 14,2% и 5,1% соответственно ($p < 0,001$).

С учетом вышесказанного, было выделено несколько потенциальных механизмов действия, с помощью которых витамин D и его метаболиты оказывают протективные эффекты при различных ССЗ [18]. Они следующие: во-первых, противовоспалительный и антиатеросклеротический эффекты; во-вторых, предотвращение гипертрофии кардиомиоцитов и пролиферации гладко-мышечных клеток; в-третьих, регуляция РААС. Рассмотрим данные механизмы подробнее.

Как указывалось ранее, витамин D обладает иммунорегулирующим действием, приводя к образованию цитокинового профиля, который уменьшает воспаление [12, 21]. Одновременно с этими данными, Watson и соавт. [29] выявили обратную корреляцию между уровнем витамина D и кальцификацией коронарных сосудов, что также предполагает защитную роль витамина D в предотвращении атерогенеза. Результаты многочисленных исследований позволяют предположить, что витамин D может ингибировать различные аспекты воспалительного ответа, подавлять прогрессирование атеросклероза и предотвращать разрыв бляшки.

Weishaar и соавт. показали, что дефицит витамина D индуцировал гипертрофию миокарда, повышал соотношение массы сердца/массы тела и продукцию внеклеточного матрикса в ткани миокарда у крыс [30]. В другом исследовании было показано, что внутривенное введение кальцитриола в течение 15 недель у

пациентов с хронической почечной недостаточностью (ХПН) способствовало уменьшению гипертрофии левого желудочка [23]. Т.о. витамин D может играть протективную роль для миокардиальной структуры и функции.

Клинические и эпидемиологические исследования в прошлые десятилетия выявили обратные взаимоотношения между уровнем сывороточного $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и АД и/или активностью ренина плазмы у лиц с нормальным АД и у пациентов с АГ [16, 20].

Li и соавт. исследовали механизм, лежащий в основе отношений между витамином D и РААС, используя генетические модели животных. Авторы выдвинули гипотезу, что витамин D – ингибитор экспрессии ренина *in vivo*. Эта гипотеза была проверена на обычных или нормальных мышах, т.е. содержащих рецепторы витамина D и так называемых VDR-0 мышах (мутантных), т.е. имеющие дефектные рецепторы, либо не имеющих их вовсе. Было доказано, что уровень мРНК ренина в почках VDR-0 мышей был в 3 раза выше, чем таковой у обычных мышей. Соответственно уровень АТ II в плазме у таких мышей был в 2,5 раза выше. Значения САД и ДАД были гораздо выше (более 20 мм рт.ст) у VDR-0 мышей по сравнению с таковыми у обычных мышей. Терапия лозартаном и каптоприлом приводила к нормализации АД. В этой работе для воспроизведения дефицита витамина D использовался диетический стронций, как блокатор биосинтеза $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Через 4 недели такой терапии у обычных мышей развилась гипокальциемия, косвенно указывающая на снижение уровня $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Как и ожидалось, у мышей значительно была повышена экспрессия мРНК ренина. В связи с вышесказанным,

этим мышам была проведена терапия $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. После использования 2 доз препарата экспрессия ренина снизилась на 35%, а после 5 доз – на 50%. Кроме того, в экспериментах на культурах клеток установлено, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ непосредственно подавляет транскрипцию гена ренина по VDR-зависимому механизму [14, 19]. Таким образом, в этом исследовании авторы предоставили *in vivo* и *in vitro* данные о том, что витамин D действительно является потенциально негативным регулятором РААС у животных.

Рецепторы витамина D кодируются геном VDR. Для гена VDR характерен генетический полиморфизм, т.е. выявлено существование различных аллельных вариантов этого гена в популяции. Наиболее значимыми полиморфизмами гена VDR, участвующими в развитии указанных заболеваний, были: Bsm I, Fok I, Taq I [3, 27]. С того момента как выделили ген VDR [6], в нескольких генетических исследованиях была установлена связь полиморфизма гена VDR с такими заболеваниями, как остеопороз, уролитиаз, гиперпаратиреоз, псориаз, синдром раздраженной толстой кишки, туберкулез, ХПН, почечной остеодистрофией, опухолевыми заболеваниями, заболеваниями пародонта, а также различными ССЗ [20, 21, 26, 27].

Распространенность полиморфизма гена VDR имеет расово-этнические различия. Например, ВВ генотип полиморфного маркера Bsm I гена VDR имеют 15-25% американцев, европейцев и австралийцев; в отличие от негров – 0-13% и азиатов – 1-3% [17, 32].

В исследовании Lee и соавт. изучалась ассоциация между уровнем АД, распространенностью АГ и полиморфизмом гена VDR у корейских рабочих [17]. Ав-

торы выявили, что у рабочих с генотипами полиморфного маркера Bsm I BB и Bb – значения систолического и диастолического АД и распространенность АГ были выше, по сравнению с рабочими с bb генотипом ($p < 0,05$). Кроме того, у рабочих с этими генотипами отмечалось более раннее начало АГ и рост значений АД с увеличением возраста, по сравнению с рабочими с bb генотипом ($p < 0,05$).

Данные исследований зарубежных коллег послужили поводом для рассмотрения и дальнейшей разработки этой проблемы в России.

Целью нашего исследования стал поиск ассоциации полиморфизма Fok I в гене VDR, кодирующем рецептор витамина D, с различиями в активности РААС и состоянии фосфорно-кальциевого обмена при АГ.

Материалы и методы

В ходе исследования была сформирована группа, включившая 49 больных в возрасте от 30 до 70 лет с диагнозом АГ I-II стадии, 1-2 степени, среднего и высокого риска сердечно-сосудистых осложнений. В группу вошли 19 мужчин и 30 женщин. Пациентов отбирали в случайном порядке. Критериями исключения были: пороки сердца, хроническая сердечная недостаточность (ХСН), заболевания почек (ХПН, мочекаменная болезнь), печени (цирроз печени и другие заболевания, сопровождающиеся изменением citoархитектоники), сахарный диабет II типа, терапия глюкокортикостероидами и диуретиками. Пациенты не должны были получать в течение последних трех дней ингибиторы АПФ, антагонисты рецепторов АГ II, β -адреноблокаторы.

Диагноз АГ устанавливался на осно-

вании классификаций и рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК), данных анамнеза, клинического обследования (ежедневное измерение артериального давления, суточное мониторирование АД) и динамического наблюдения в стационаре.

У всех пациентов были забраны образцы крови для определения уровней ренина, ангиотензина I, общего и ионизированного кальция (Ca), фосфора неорганического (P), а так же образцы крови для проведения генетического тестирования пациентов на полиморфизм гена VDR для изучения частоты аллелей и генотипа полиморфного маркера гена VDR: Fok I. Забор образцов крови для определения активности ренина и ангиотензина I производился натощак рано утром - в горизонтальном положении больного; для забора крови были взяты специальные охлажденные пробирки с реактивом – ЭДТА. Параметры РААС определялись методом РИА (радиоиммунный анализ). Референсные значения активности ренина плазмы: в горизонтальном положении – 0,2-1,9 нг/мл/час; ангиотензина I: в горизонтальном положении – 0,4-4,1 нг/мл.

Забор венозной крови для определения содержания общего и ионизированного Ca, P производился натощак в обычную пробирку. Ca общий определялся методом колориметрии с О-крезолфталеином; Ca ионизированный определялся методом ионселективных электродов; P – методом колориметрии с молибдатом аммония. Референсные значения концентрации Ca общего: 2,1-2,55 ммоль/л; Ca ионизированного: 1,05-1,3 ммоль/л; P: 0,87-1,45 ммоль/л.

При проведении генетического тестирования из образцов крови стандартным фенольным методом, с использованием

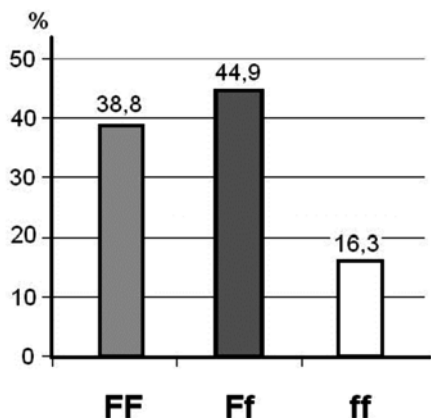


Рис. 3. Частоты генотипов Fok I полиморфизма гена VDR в изученной группе

протеиназы К, выделяли общую ДНК. Последняя подвергалась амплификации методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Затем проводился анализ качества и количества продуктов ПЦР путем гель-электрофореза. В случае удовлетворительного качества и достаточного количества, продукты ПЦР подвергались ферментативному гидролизу с помощью рестриктазы Fok I. Продукты ферментативного гидролиза также анализировались методом гель-электрофореза. На основе данного анализа делался вывод о генотипе данного образца (пациента).

Всем пациентам проводилось точное мониторирование артериального давления (СМАД) с помощью аппарата системы SCHILLER Ваar/СН. Анализировались следующие параметры: среднесуточные значения систолического (САД) и диастолического АД (ДАД), средние значения систолического и диастолического АД днем, средние значения систолического и диастолического АД ночью, максимальные значения систолического и диастолического АД.

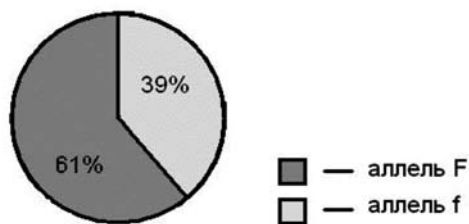


Рис. 4. Частоты аллелей Fok I полиморфизма гена VDR в изученной группе

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Biostat. Данные представлены в виде $M \pm m$. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

По результатам генетического тестирования пациенты были распределены на 3 группы. Выявлено следующее распределение генотипов полиморфного маркера Fok I: 1 группа – носители FF-генотипа – 19 человек (38,77%), 2 группа – носители Ff-генотипа – 22 человека (44,90%), 3 группа – носители ff-генотипа – 8 человек (16,33%) (рис. 3). Соответственно, частота аллеля F в нашей группе обследованных лиц составляет 61,22%, а частота аллеля f – 38,78% (рис. 4).

Средний возраст пациентов 1, 2 и 3-й групп составил $48,89 \pm 10,08$, $47,32 \pm 9,70$, $58,38 \pm 12,21$ соответственно (табл. 3). Таким образом, можно сделать вывод о том, что у пациентов с FF- и Ff-генотипами начало заболевания регистрируется в более раннем возрасте, по сравнению с носителями ff-генотипа ($p = 0,02$).

Параметры РААС были следующими (табл. 3). Средняя концентрация ренина у пациентов 1, 2 и 3-й групп составила $0,42 \pm 0,30$, $0,46 \pm 0,47$, $0,44 \pm 0,40$ соответ-

Таблица 2

Показатели возраста, параметров РААС, фосфорно-кальциевого обмена у больных с генотипами Fok I (M±m)

Показатель	Группа больных по генотипам		
	1 группа – FF	2 группа – Ff	3 группа – ff
Возраст (полных лет)	48,89±10,08	47,32±9,70	58,38±12,21
Ренин, нг/мл/ч	0,42±0,30	0,46±0,47	0,44±0,40
Ангио-тензин, нг/мл	0,30±0,17	0,30±0,18	0,25±0,17
Са общий, ммоль/л	2,39±0,12	2,40±0,13	2,31±0,12
Са +2, ммоль/л	1,14±0,04	1,14±0,08	1,14±0,02
Р неорганический, ммоль/л	1,11±0,19	1,11±0,17	0,96±0,13

ственно. Средняя концентрация ангиотензина I у пациентов 1, 2 и 3-й групп составила 0,30±0,17, 0,30±0,18, 0,25±0,17 соответственно. По параметрам РААС изученные группы не имели значимых различий ($p>0,05$).

Параметры фосфорно-кальциевого обмена (табл. 2). Средняя концентрация общего Са у пациентов 1, 2 и 3-й групп составила 2,39±0,12, 2,40±0,13, 2,31±0,12 соответственно. Средняя концентрация ионизированного Са у пациентов 1, 2 и 3-й групп составила 1,14±0,04, 1,14±0,08, 1,14±0,02 соответственно. Средняя концентрация Р неорганического у пациентов 1, 2 и 3-й групп составила 1,11±0,19, 1,11±0,17, 0,96±0,13 соответственно. Различия между группами 1, 2 и 3 по данным

параметрам оказались статистически не достоверными ($p>0,05$).

Показатели СМАД у пациентов с генотипами Fok I представлены в табл.3. Средние значения ДАД в течение дня составили: в 1-й группе – 88,95±9,76, во 2-й группе – 90,27±7,39, в 3-й группе – 84,00±7,17. Таким образом, межгрупповые различия по данному показателю статистически незначимы ($p>0,05$).

Средние значения ДАД в течение ночи составили: в 1-й группе – 74,58±9,59, во 2-й группе – 72,00±8,04, в 3-й группе – 73,38±8,28. Таким образом, межгрупповые различия по данному показателю статистически незначимы ($p>0,05$).

Среднесуточные значения ДАД составили в 1-й группе – 85,42±8,82, во

Таблица 3

Показатели СМАД у больных с генотипами Fok I (M±m)

Показатель СМАД	Группа больных по генотипам		
	1 группа – FF	2 группа – Ff	3 группа – ff
Ср. сут. АД сист.	136,47±16,98	134,14±9,19	124,75±9,50
Ср. сут. АД диаст.	85,42±8,82	85,05±7,47	81,25±7,15
Ср. АД сист. днем	141,16±16,86	139,82±9,28	128,38±8,99
Ср. АД диаст. днем	88,95±9,76	90,27±7,39	84,00±7,17
Ср. АД сист. ночью	121,37±18,43	117,95±10,05	115,75±11,57
Ср. АД диаст. ночью	74,58±9,59	72,00±8,04	73,38±8,28
Макс. АД сист.	170,37±21,14	174,41±17,30	163,50±10,06
Макс. АД диаст.	107,89±12,71	111,73±15,17	108,63±8,85

2-й группе – $85,05 \pm 7,47$, в 3-й группе – $81,25 \pm 7,15$. Таким образом, межгрупповые различия по данному показателю статистически незначимы ($p > 0,05$).

Средние значения САД в течение дня составили: в 1-й группе – $141,16 \pm 16,86$, во 2-й группе – $139,82 \pm 9,28$, в 3-й группе – $128,38 \pm 8,99$. Различия между группами 1, 2 и 3 оказались статистически достоверными ($p = 0,03$).

Средние значения САД в течение ночи составили: в 1-й группе – $121,37 \pm 18,43$, во 2-й группе – $117,95 \pm 10,05$, в 3-й группе – $115,75 \pm 11,57$. По данному параметру изученные группы не имели значимых различий ($p > 0,05$).

Среднесуточные значения САД составили: в 1-й группе – $136,47 \pm 16,98$, во 2-й группе – $134,14 \pm 9,19$, в 3-й группе – $124,75 \pm 9,50$. Поскольку среднесуточный показатель является суммарным, объединяя дневные и ночные измерения АД, мы наблюдали тенденцию к наличию статистической достоверности различий по данному параметру между группами 1, 2 и 3 ($p = 0,06$). Мы полагаем, что полученные значения р объясняются относительно небольшим размером нашей группы, и при увеличении числа обследованных больных будет происходить переход от тенденции к истинной достоверности различий.

Заключение

Учитывая данные исследований зарубежных коллег, в нашей работе впервые было проведено изучение ассоциативной зависимости между значимым полиморфизмом Fok I в гене VDR и различиями в активности РААС и состоянии фосфорно-кальциевого обмена при АГ. Полученные нами результаты согласуются с данными

работ зарубежных авторов. У лиц с определенными генотипами полиморфного маркера гена VDR АГ развивается в более раннем возрасте и имеет большую распространенность; значения САД и ДАД выше, по сравнению с другим генотипом. Более высокие значения САД и ДАД у пациентов могут повлиять на характер течения заболевания и частоту развития осложнений.

Кроме того, результаты проведенных исследований предполагают, что дефицит витамина D является дополнительным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Этот факт может в будущем найти широкое применение в области здравоохранения, учитывая высокую распространенность дефицита витамина D в развитых странах, влияние образа жизни и географической широты на статус витамина D. Кроме того, лечения дефицита витамина D безопасно, просто и экономически выгодно. Для подтверждения этих данных нужно провести дальнейшие клинические и экспериментальные исследования.

Таким образом, многочисленные экспериментальные исследования доказали важную роль системы витамина D в регуляции АД и водно-электролитного гомеостаза, и предоставили основу для изучения потенциального использования витамина D и его аналогов в профилактике и терапии АГ. Полученные нами данные позволяют по-новому взглянуть на фундаментальные механизмы регуляции РААС и соответственно уровня АД, в сопоставлении с результатами генетического тестирования. Это даст возможность оптимизации фармакотерапии АГ и проведения профилактических мероприятий по предупреждению АГ.

Выводы

1. Пациенты с АГ по результатам генетического тестирования имеют следующее распределение генотипов полиморфного маркера Fok I: носители FF-, Ff- и ff-генотипов. Частота аллеля F в нашей группе обследованных лиц составляет 61,22%, а частота аллеля f – 38,78%.

2. У пациентов с АГ, имеющих FF- и Ff-генотипы, начало заболевания регистрируется в более раннем возрасте.

3. Показатели СМАД свидетельствуют о более высоких средних значениях САД в дневное время у пациентов с FF- и Ff-генотипами, что оказывает влияние на характер течения заболевания и частоту развития осложнений.

4. Таким образом, полиморфизм Fok I в гене VDR ассоциирован с более ранним возникновением АГ и, возможно, с более осложненным течением заболевания.

Литература

1. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М.: Реафарм, 2004.

2. Профилактика, диагностика и лечение артериальной гипертензии // ВНОК, Российские рекомендации (второй пересмотр) – М.: 2004.

3. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие/ Под ред. академика РАМН В.Г. Кукеса и академика РАМН Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.

4. Шальнова С.А., Деев А.Д., Вихирева О.В. и др. Распространенность артериальной гипертензии в России: информированность, лечение, контроль // Профилактика заболеваний и укрепление

здоровья, 2: 3-7, 2001.

5. Шух Е.В. Витаминный статус и его восстановление с помощью фармакологической коррекции витаминными препаратами. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. РАМН. – М., 2002.

6. Baker A.R., McDonnell D.P., Hughes M., Crisp T.M. et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3294-3298, 1988.

7. Drocourt L., Ourlin J.C., Pascussi J.M., Maurel P., Vilarem M.J. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes // J. Biol. Chem. 2002 Jul 2; 277(28):25125-32. Epub 2002 May 3, 2002.

8. Forman J.P., Giovannucci E., Holmes M.D., Bischoff-Ferrari H.A., Tworoger S.S., Willett W.C. and Curhan G.C. Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Incident Hypertension // Hypertension 49; 1063-1069, 2007.

9. Giovannucci E., Liu Y., Hollis B.W., Rimm E.B. 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Myocardial Infarction in men // Arch. Intern. Med., 168 (11): 1174-1180, 2008.

10. Glass C.K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimmers, and heterodimers // Endocr Rev., 15: 391-407, 1994.

11. Gupta R.P., Hollis B.W., Patel S.B., Patrick K.S., Bell N.H. CYP3A4 is a human microsomal vitamin D 25-hydroxylase // J. Bone Miner Res., Apr; 19(4):680-8.3, 2004.

12. Holick M.F. Vitamin D deficiency // N. Engl. J. Med., 357: 266-81, 2007.

13. INTERSALT Cooperative Research Group. INTERSALT: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results of 24-hour urinary sodium and

potassium // *Br Med J*, 297:319-328, 1988.

14. Kong J., Li Y.C. Effect of ANG II type I receptor antagonist and ACE inhibitor on vitamin D receptor-null mice // *Am. J. Physiol. Regul. Inter. Comp. Physiol.*, Jul; 285(1): 61-255, 2003.

15. Krause R. et al., Ultraviolet B and blood pressure // *Lancet*, 352:709-710, 1998.

16. Kristal-Boneh E. et al. Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men // *Hypertension*, 30: 1289-1294, 1997.

17. Lee B.K., Lee G.S., Walter F.S. et al. Associations of Blood Pressure and Hypertension with Lead Dose Measures and Polymorphisms in the Vitamin D Receptor and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genes // *Environ. Health Perspec.*, vol. 109, No 4, April 2001.

18. Levin A., Li Y.C. Vitamin D and its analogues: Do they protect against cardiovascular disease in patients with kidney disease? // *Kidney International*, vol. 68, pp. 1973-1981, 2005.

19. Li C.Y., Kong J. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system // *J. Clin. Invest.*, July, 110(2): 229-238, 2002.

20. Lind L. et al. Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-aged men // *Am. J. Hypertens.*, 8: 894-901, 1995.

21. Mathieu C., Adorini L. The coming of age of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents // *Trends Mol. Med.*, 8: 174-179, 2002.

22. Nagpal S., Na S., Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands // *Endocr. Rev.*, 26:662-87, 2005.

23. Park C.W. et al. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary

hyperparathyroidism // *Am. J. Kidney Dis.*, 33:73-81, 1999.

24. Pfeifer M., Begerow B. et al. Effect of short-term vitamin D3 and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 1633-1637, 2001.

25. Rostand S.G. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences // *Hypertension.*, 30:150-6, 1979.

26. Thakkinstian A., D'Este C., Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis // *Osteoporos Int.*, Sep; 15(9): 729-34, 2004.

27. Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B., Pols H.A., Van Leeuwen J.P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms // *Gene*, Sep 1; 338(2):143-56, 2004.

28. Wang T.J., Pencina M.J., Booth S.L., Jacques P.F. et al. Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease // *Circulation*, 117; 503-511, 2008.

29. Watson K.E., Abrolat M.L., Malone L.L. et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification // *Circulation*, 96:1755-1760, 1997.

30. Weishaar R.E., Simpson R.U. The involvement of the endocrine system in regulating cardiovascular function: emphasis on vitamin D3 // *Endocr. Rev.*, 10: 351-365, 1989.

31. Zittermann A., Schleithoff S.S., Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective // *Br. J. Nutr.* 94, 483-492, 2005.

32. Zmuda J.M., Cauley J.A., Ferrell R.E. Recent progress in understanding the genetic susceptibility to osteoporosis // *Genet. Epidemiol.*, 16: 356-367, 1999.

**THE ROLE OF CODING VITAMIN D RECEPTOR VDR GENE
POLYMORPHISM IN PATHOGENESIS OF HYPERTENSION**

E.V.Chih, N.M.Milotova

*Science Centre of Roszdravnadzor, Moscow,
Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow*

Evaluation the VDR gene Fok I polymorphism association with renin-angiotensin-aldosteron system (RAAS) activity differences and phosphoric-calcium metabolism level in hypertension was done on 49 patients with hypertension (19 male, 30 female). There were undertaken the arterial pressure day and night monitoring, RAAS parameters analysis (renin, angiotensin I), common and ionized calcium levels, phosphorus level and PCR-RFLP genetic testing. It was established that the VDR gene Fok I polymorphism is associated with the hypertension beginning age and the systolic arterial pressure daily meanings variability.

Key words: hypertension, vitamin D, vitamin D receptor (VDR), VDR gene polymorphism.



РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Морфологическая характеристика течения раневого процесса при экспериментальном моделировании резаных и рвано-ушибленных кожных ран

Т.В. Брайловская, Т.А. Федорина

Самарский государственный медицинский университет, Самара

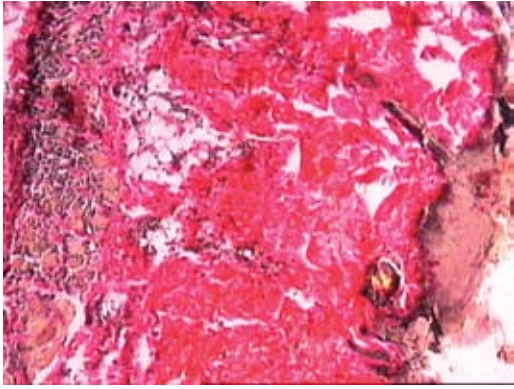
В статье приводятся результаты заживления моделированных в эксперименте на белых лабораторных крысах резаных и рвано-ушибленных ран в различные сроки течения воспалительно-репаративного процесса. Дана характеристика морфологического состояния тканей краев ран в динамике с момента получения травмы до наступления репарации. Отмечено, что при самопроизвольном заживлении резаных ран развивается более адаптивная регенерация с образованием нежного рубчика, тогда как при заживлении рвано-ушибленных ран развивается неполная регенерация с образованием неправильной формы рубца. Результат хирургического лечения зависит от фазы воспалительно-репаративного процесса в момент проведения операции. Хирургическое лечение с наилучшим результатом заживления может быть достигнуто при проведении в ранние сроки после травмы, когда степень альтерации и экссудативных реакций менее выражена, или в поздние сроки, когда четко макроскопически в краях раны определяется зона некроза, требующая иссечения. Получены гистометрические параметры, достоверно отражающие характер течения раневого процесса и вероятность последующего заживления при резаных и рвано-ушибленных ранах. Сделано заключение, что эти параметры, наряду с клиническими, могут быть положены в основу разработки программы моделирования течения раневого процесса и прогнозирования возможного развития осложнений.

Ключевые слова: воспалительно-репаративного процесс, резаная рана, рвано-ушибленная кожная рана, рубец, экспериментальное моделирование.

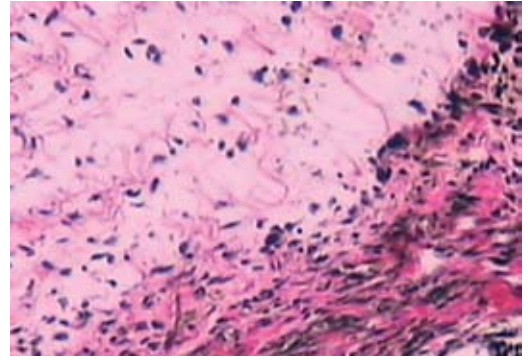
Современные запросы хирургии кроме анатомического восстановления кожного покрова включают в себя и эстетическую составляющую получения как можно более незаметных рубцов после травм и оперативных вмешательств. Особенно это касается хирургии открытых частей тела, в частности, челюстно-лицевой хирургии [1, 3]. С позиций патолога, наиболее благоприятный результат операции может быть достигнут максимально возможным приближением репаративной регенерации кожи к адаптивной полной ре-

генерации, что возможно, когда стенками раневого канала являются живые, хорошо васкуляризированные ткани, обладающие способностью подавить оставшихся в ране микробов и могущие привести к быстрому развитию репаративных процессов [2, 6].

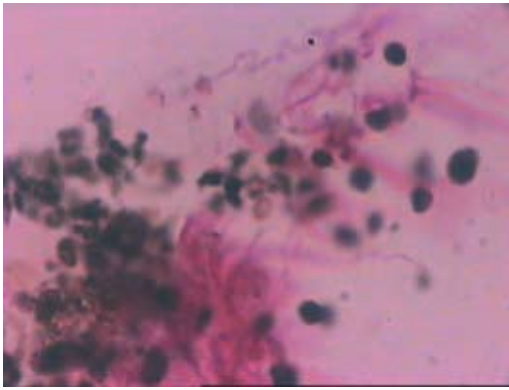
Однако на практике течение воспалительно-репаративного процесса и адекватная смена его фаз определяют многими условиями объективного и субъективного характера. Например, на результате хирургического лечения ран



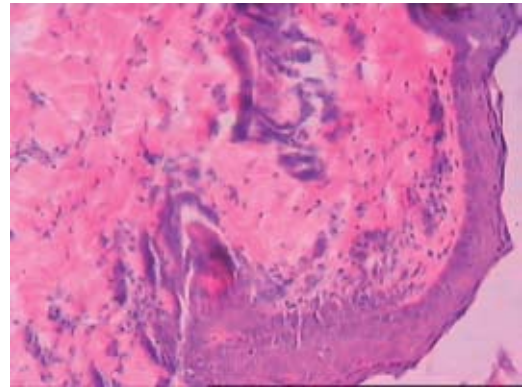
а



б



в



г

Рис.1. Морфологические изменения в краях экспериментальных резаных ран в разные сроки после нанесения повреждения: а) слабо выраженная альтерация эпидермиса и полнокровие в подлежащей соединительной ткани, 1 час после травмы; б) отек, полнокровие капилляров на фоне слабой лейкоцитарной инфильтрации, 3 часа после травмы, резаная рана; в) лейкоциты в мазке отпечатке с поверхности раны, 4 часа после травмы; г) эпителизация и развитие соединительной ткани в месте повреждения, 3 суток после травмы. Окраска: а, – пикрофуксин; б, г – гематоксилин и эозин; х 300; в – цитологический препарат; х 900

кожи и мягких тканей сказываются характер и механизм нанесения раны, степень ее инфицированности, сроки оказания первой медицинской и хирургической помощи, а также степень иссечения некротизированных тканей при первичной хирургической обработке, выбранный способ наложения швов, используемый инструментарий, шовный материал и другие факторы [4, 5]. Часть отмеченных

факторов полностью зависят от хирургической тактики, другие же не зависят от хирурга, поскольку пациент изначально имеет рану определенного механизма повреждения на разных сроках после получения травмы, и, следовательно, находящуюся в конкретной фазе развития раневого процесса. Таким образом, клинически важно прогнозировать ход течения воспалительно-репаративного про-

цесса, характер заживления и возможное развитие осложнений у пациентов, ориентируясь не только на клинические, но и на морфологические данные.

Цель исследования — сопоставить результаты заживления моделированных в эксперименте резаных и рвано-ушибленных кожных ран и установить морфологические и гистометрические параметры, наиболее достоверно отражающие течение раневого процесса.

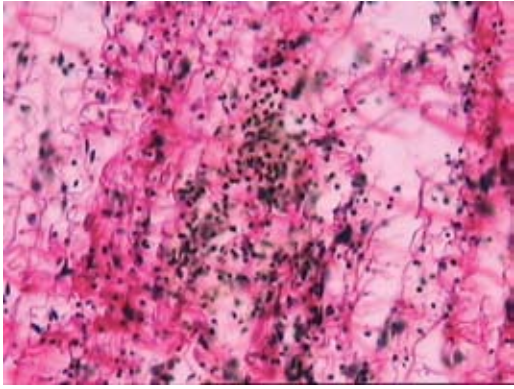
Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 64 взрослых белых лабораторных крысах обоего пола со средним весом 300 г, содержащихся в условиях вивария в изолированных послеоперационных клетках на обычном пищевом рационе. Эксперимент проведен на базе вивария НИИ гигиены и экологии человека СамГМУ (директор НИИ профессор Л.Н. Самыкина).

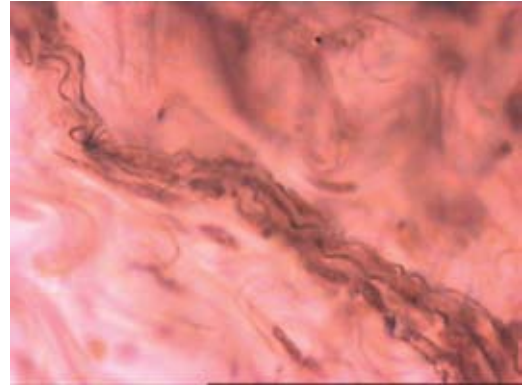
Все животные были разделены на две группы в зависимости от механизма нанесения раны. Под эфирным наркозом в межлопаточной области наносились с помощью скальпеля резаные линейные (32 крысы) и с помощью скальпеля и пинцета рвано-ушибленные неправильной формы раны спины глубиной до подкожной фасции (32 крысы). У 8 контрольных животных по 4 из каждой группы раны заживали самостоятельно, животных выводили из эксперимента передозировкой эфира на 1, 3, 5 и 7 сутки. Кроме того, в других сериях по 8 крыс в каждой (по 4 из каждой группы) под эфирным наркозом проводили первичную хирургическую обработку раны и наложение восстанавливающего непрерывного внутрикожного шва (монолитная капроновая нить, 2/0) через 15 минут, 1, 2, 3, 4 часа, на 1

и 2 сутки после травмы. Срок выведения животных из опыта после наложения шва также определялся на 1, 3, 5 и 7 сутки. С поверхности раневого дефекта брали мазки-отпечатки для цитологического исследования, фрагменты ткани краев раны забирали для гистологического исследования, как в момент проведения первичной хирургической обработки, так и при выведении каждого животного из опыта. Тем самым, учитывая контрольную и опытные группы, морфологическое состояние мягких тканей краев резаной и рвано-ушибленной ран прослежено в динамике на сроках 15 мин., 1, 2, 3, 4 часа, 1, 2, 3, 5, 7 сутки.

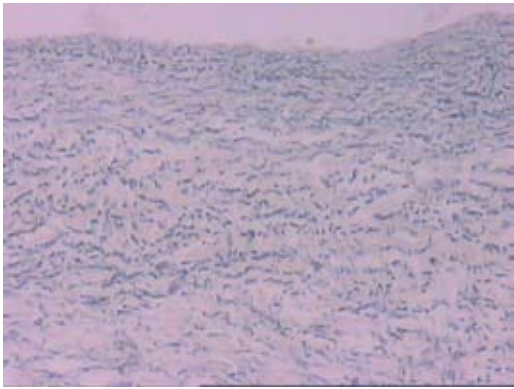
Морфологическое исследование мазков-отпечатков и иссеченных фрагментов раневых дефектов проведено на базе патологоанатомического отделения клиник и кафедры патологической анатомии СамГМУ. Фрагменты тканей объемом до 0,5 см³ фиксировали в 10% забуференном растворе формалина с последующей заливкой в парафин по стандартной методике. Гистологические срезы для дальнейших исследований готовили на роторном микротоме с толщиной срезов 8 мкм, срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином, фукселином, импрегнировали азотнокислым серебром по Бильшовскому-Гросс. Гистометрическое исследование с получением показателей глубины некроза, диаметра венозных сосудов и капилляров, объемной плотности отечной межклеточной жидкости, гиперемизированного сосудисто-капиллярного русла, лейкоцитарной инфильтрации, соединительной и эпителиальной ткани проводили с помощью компьютерной системы анализа изображений «Видео-тест Морфо» (программа под управлением операционной системы MS Windows 98).



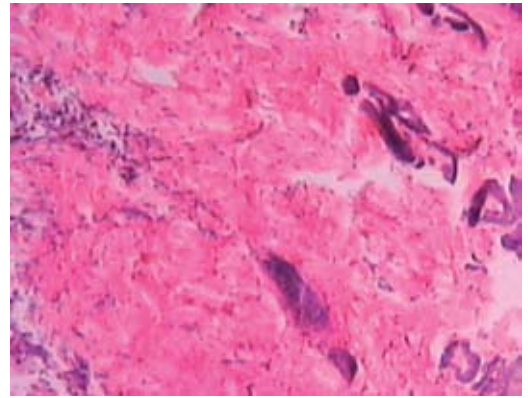
а



б



в



г

Рис.2. Морфологические изменения в краях экспериментальных рвано-ушибленных ран в разные сроки после нанесения повреждения: а) отек, выраженная лейкоцитарная инфильтрация, 2 часа после травмы; б) повреждения нервных волокон, 4 часа после травмы; в) разрушение эластического каркаса дермы, 2 сутки после травмы; г) заживление с образованием рубцовой соединительной ткани в месте повреждения, 5 сутки после травмы.

Окраска: а – пикрофуксин; в – фукселин; г – гематоксилин и эозин; х 300; б – импрегнация по Бильшовскому-Гросс; х 900

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета программ «Statistica» в операционной среде Windows.

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента при заборе материала в момент проведения первич-

ной хирургической обработки во всех сериях и в контрольной группе животных показали, что в первые сутки в ранах имеет место острая фаза экссудативного воспаления.

При резаных ранах через 15 мин. после нанесения повреждения в краях раны отмечены микроскопические изменения в виде скопления межклеточной жидкости и незначительно выраженного полнокровия

капилляров, в краях рвано-ушибленных ран наблюдались более ярко выраженные альтеративно-экссудативные изменения в виде дистрофии эпидермиса, отека, полнокровия и стаза в капиллярном русле, полнокровия более крупных сосудов. В мазках-отпечатках обнаружены только эритроциты. Через 1 час подобные изменения были более выраженными в краях, как резаных ран, так и рвано-ушибленных ран (рис. 1а).

Выраженность изменений нарастала с каждым часом наблюдений. При резаных ранах макроскопически края были несколько набухшими, приподнятыми над поверхностью, гиперемизированными. Микроскопически через 2-4 часа после нанесения повреждения появлялась венозная гиперемия, единичные лейкоциты в мазках-отпечатках с поверхности ран, в гистологических препаратах лейкоцитарная инфильтрация умеренная, в 1 наблюдении обнаружена тонкая полоса поверхностного некроза (рис. 1б, в). При рвано-ушибленных ранах через 2-4 часа после нанесения повреждения макроскопически края раны были ярко гиперемизированными, выступающими над поверхностью ран, местами пропитанными кровью. В мазках-отпечатках уверенно обнаруживались лейкоциты, фибрин, в гистологических препаратах – выраженная лейкоцитарная инфильтрация на фоне гиперемизированного сосудисто-капиллярного русла и скопления межтканевой жидкости, участки некроза различной ширины, со стороны нервных окончаний и волокон было отмечено набухание, нечеткость контуров (рис. 2а, б).

В первые сутки экспериментальной резаной раны макроскопически края ее слипались, в микропрепаратах была видна тонкая поверхностная зона альтерации

и фибрин, сосуды оставались полнокровными, вокруг них отмечали наличие лейкоцитов и круглоклеточных инфильтратов. При рвано-ушибленных ранах более обширная полоса некротически измененных тканей, отчетливая зона демаркации отмечались не только в препаратах, но и были заметны макроскопически, в мазках-отпечатках – полиморфный состав клеток воспаления.

На вторые сутки течения воспалительно-репаративного процесса при резаных ранах наблюдалась регенерация эпидермиса с сохранением признаков экссудативно-пролиферативных реакций в более глубоких слоях кожи, в 2 наблюдениях – образование тонких коллагеновых волокон на фоне очаговых утолщений и пролиферации эпидермиса. В экспериментальной модели рвано-ушибленных ран морфологическая картина на вторые сутки острого воспаления была наиболее ярко выражена, макроскопически поверхность раны имела серозно-сукровичный экссудат, фибрин, у трех крыс в ране отмечено нагноение. В микроскопических препаратах некротические поля, сосудистая гиперемия и лейкоцитарная инфильтрация захватывали большую площадь, в мазках определялся микробизм, при потере большей части эпителиальной выстилки, в участках сохраненного эпидермиса отмечался акантоз, в сосочковом слое дермы – образование коллагеновых волокон при разрушении эластического каркаса (рис. 2в).

На третьи сутки после нанесения повреждения при резаных ранах наблюдалось заживление с образованием нежного рубчика макроскопически, в гистологических препаратах при этом также отмечено формирование тонкого рубца (рис. 1г). В дерме сохранялись небольшие полиморф-

ноклеточные инфильтраты периваскулярно. На модели рвано-ушибленных ран третьей сутки течения характеризовались некоторым уменьшением выраженности экссудативных проявлений и преобладанием на поле воспаления пролиферативных процессов, что макроскопически выразалось очищением поверхности раны, появлением грануляций, а микроскопически – образованием молодой соединительной ткани, коллагеновых волокон на фоне разрушенного каркаса эластических волокон, отмечены булавовидные утолщения нервных волокон.

Пятые и седьмые сутки для резаной раны являются уже периодом заживления, микроскопически гиперемии и инфильтрации не отмечено. При рвано-ушибленной ране на пятые сутки было достигнуто заживление с образованием хорошо заметного неправильной формы рубца, хотя в препаратах сохранялись признаки инфильтративно-пролиферативных реакций в глубоких слоях тканей, в одном наблюдении при репарации через нагноение образование рубца произошло на седьмые сутки (рис. 2г).

Результаты проведенного эксперимента, отражающие общую закономерность смены фаз воспалительно-репаративного процесса после нанесения повреждения от экссудации и пролиферации к репаративной регенерации, а также зависимость степени выраженности последующих за повреждением фаз от характера повреждения, в нашем примере - резаных и рвано-ушибленных ран, подтверждены результатами гистометрических исследований (табл. 1, 2). Из таблиц видно, что наиболее достоверными параметрами, отражающими характер последующего заживления и связанными с механизмом нанесения травмы, является мерный при-

знак глубины зоны некроза и динамика соотношения объемной плотности отека, лейкоцитарной инфильтрации, эпителиальной и соединительной ткани в ране. Параметры, отражающие степень выраженности сосудистых реакций не отличаются статистической достоверностью.

Тем самым, выделенные достоверные метрические параметры могут быть включены в качестве морфологических критериев моделирования течения раневого процесса и прогнозирования возможного развития осложнений.

Выводы

Проведенные исследования показывают, что наиболее благоприятный с клинических и эстетических позиций исход заживления отмечен при резаных ранах. При рвано-ушибленной ране, даже если нет макроскопических признаков необратимой альтерации, выраженность экссудативно-пролиферативных реакций, повреждение нервного аппарата, способствуют неполной регенерации с образованием рубца.

Хирургическое лечение с наилучшим результатом заживления может быть достигнуто при проведении в ранние сроки после травмы, когда степень альтерации и экссудативных реакций менее выражена, или в поздние сроки, когда четко макроскопически в краях раны определяется зона некроза, требующая иссечения.

Следовательно, результат хирургического лечения зависит от фазы воспалительно-репаративного процесса в момент проведения операции, и может быть прогнозируем по клиническим данным, а также по результатам морфологического и гистометрического исследования краев раны.

Литература

1. Белоусов А.Е. Пластическая реконструктивная и эстетическая хирургия. –СПб: Академия, 1998.

2. Лаврищева Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. – М.: Медицина, 1996.

3. Неробеев А.И. Восстановительная хирургия мягких тканей челюстно-лицевой области. – М.: Медицина, 1997.

4. Оганесян А.Э. Систематизация

ошибок в практике реконструктивной хирургии // *Анналы пласт., реконстр. и эстет. хирургии*, № 4, с.123-125, 2004.

5. Aitasalo K. The success rate of free tissue transfer after preoperative irradiation in head and neck reconstruction // *Ann. Chir. Gynaecol.*, vol.86, pp. 311-317, 1997.

6. Biglioli F., Hutelitano L., Rabbiosi D. The forearm fascio-subcutaneous free flap in oral reconstruction // *J. Craniomaxillofac. Surg.*, vol. 32, pp.37-42, 2004.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF WOUND PROCESS UNDER EXPERIMENTAL MODELING OF INCISED AND TEAR-CONTUSED SKIN WOUNDS

T.V.Brailovskaya, T.A.Fedorina

Samara state medical university, Samara

The results of modeling in experiment on white laboratory rats of incised and tear-contused skin healing in different periods of inflammatory and reparative process are represented in this work. There is characteristic of morphological conditions of wound disruption in dynamics from the moment of wounding to reparations begin. Observed that under self-healing of inflammatory wounds more adaptive regeneration with soft ribs generated, at the same time not full regeneration of tear-contused wounds generated with irregular shape rib. The result of surgical treatment depends on phase of inflammatory and reparative processes during operation. Surgical treatment with the best results may be achieved when it done in early time after trauma when degree of alteration and exudative reactions not so expressed or in the late time when necrosis zone determine sharp. Histometrical parameters which reliably reflect the character of wounding process and probability of wounding of incised and tear-contused wounds were obtained. These parameters with the clinical ones may be base to modeling program of wounding process and prognosis of possible complications.

Key words: inflammatory and reparative processes, incised and tear-contused skin wounds, rib, experimental modeling.



ЭЭГ мониторинг с применением метода многомерного шкалирования при антидепрессивной монотерапии моклобемидом

В.Н. Каркищенко, М.В. Рудковский

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

С помощью метода многомерного шкалирования подбиралась индивидуальная фармакотерапия депрессивных больных. Доказано, что метод эффективен для дискретного ЭЭГ мониторинга эффективности применения психотропных средств на ранних этапах лечения психоневрологических больных и может быть использован для прогнозирования конечного эффекта лечения.

Ключевые слова: компьютерная фарм-электроэнцефалография, многомерное шкалирование, мониторинг, психофармакотерапия, моклобемид.

Для диагностики функционального состояния головного мозга в современном психофармакологическом анализе все шире используются комплексные исследования, включающие в себя не только спектральные методы обработки ЭЭГ сигналов [1, 2, 3, 4], но и методы классической и многомерной статистики [5, 6].

В представляемой работе предлагается новый подход к поиску информативных показателей биоэлектрической активности мозга больных с депрессивными состояниями и дисциркуляторной энцефалопатией, с помощью метода многомерного шкалирования [5, 7].

Используемый метод многомерного шкалирования (МШ), имеет ряд преимуществ перед традиционными методами анализа ЭЭГ (факторным, кластерным и другими) [7, 8, 9, 10].

Таким образом, по мере совершенствования программного обеспечения

компьютерной диагностики, появилась возможность применения в психофармакологии новых эффективных методов прикладной статистики, предназначенных для организации сбора, записи, систематизации и обработки данных анализа фарм-ЭЭГ.

Материал и методы

В настоящей работе представлены результаты ЭЭГ исследования 52 здоровых (контрольная группа) и 27 больных мужчин (20-45 лет) с депрессивными состояниями в динамике разовой (в течение суток) и курсовой монофармакотерапии.

Все больные получали моклобемид (аурорикс – антидепрессант, обратимый ингибитор моноаминоксидазы, разовая доза препарата 300 мг). ЭЭГ мониторинг больных проводился дискретно до (фон), через 3, 6 и 24 часа после приема

разовой дозы препарата, а также перед их выпиской, если исследуемый препарат приводил к улучшению клинического состояния и назначался в качестве основного для курсовой (6-8 недель) терапии. Регистрация ЭЭГ проводилась по восьми симметричным (лобные, височные, теменные и затылочные) отведениям с обоих полушарий мозга на электроэнцефалографе «Энцефалан-131-1» фирмы «Медиком» (Таганрог). Статистическая обработка ЭЭГ (суммированные данные по всем отведениям в диапазоне 1-30 Гц) осуществлялась с помощью пакета программ PARSUN [9]. В соответствии с алгоритмом метода МШ, после спектрального анализа ЭЭГ многомерные вектора, включающие 240 признаков, преобразовывались в двухмерные векторы, характеризующие функциональное состояние головного мозга в новой двухмерной системе координат. В качестве критериев дискретного мониторинга эффективности монофармакотерапии были приняты изменения координат двухмерных векторов и их расстояний до ЭЭГ нормы, предварительно вычисленной по данным ЭЭГ контрольной группы.

Результаты и обсуждение

По результатам клинических оценок курсовой терапии моклобемидом, из 27 больных у 18 больных (группа 1 – 66,7%) отмечалось улучшение самочувствия, а у 9 (группа 2 – 33,3%) – клинический эффект отсутствовал. В связи с этим, обработка ЭЭГ данных методом МШ в этих группах проводилась раздельно.

Результаты исследования показали, что вектора фоновых ЭЭГ больных I и II групп располагались практически равноудалено от усредненного вектора-

расстояния до ЭЭГ нормы и достоверно не отличались между собой. В то же время, при суточном и курсовом ЭЭГ мониторинге в группах с различным клиническим эффектом отмечалась почти противоположная динамика. В группе I после введения разовой дозы моклобемидом улучшение самочувствия больных сопровождалось незначительным и статистически незначимым (через 3 ч) и достоверно существенным (через 6 ч) приближением соответствующих векторов к ЭЭГ норме. Через 24 ч координаты этих векторов вновь возвращались к фоновым значениям, что, вероятно, связано с особенностями фармакокинетики препарата и снижением его концентрации в организме. Продолжение приема моклобемидом в течение 6-8 недель, наряду с положительной клинической динамикой, манифестировалось перед выпиской стойкой близостью векторов ЭЭГ этих больных к вектору ЭЭГ нормы.

Результаты компьютерного ЭЭГ мониторинга, которые были получены во второй группе больных с отсутствием клинического эффекта существенно отличались. Так, дискретный суточный ЭЭГ мониторинг этих больных показал, что введение разовой дозы препарата не приводило к значимым изменениям вектора состояния ни через 3 часа, ни через 6 и 24 часа в сравнении с усредненным фоновым вектором данной группы. Продолжение курса лечения моклобемидом также не давало ни клинического улучшения самочувствия больных, ни приближения соответствующих векторов к вектору ЭЭГ нормы. Поэтому больные II группы через 3-5 дней после начала лечения переводились на другие схемы фармакотерапии.

Выводы

Проанализировав полученные результаты, можно заключить, что использование метода МШ при суточном и курсовом мониторинге суммарных ЭЭГ эффектов моклобемида обеспечивает возможность выбора индивидуальной фармакотерапии депрессивных больных на основании количественных характеристик векторов в пространстве многомерного шкалирования. Таким образом, метод МШ перспективен в плане создания программных средств по осуществлению дискретного ЭЭГ мониторинга эффективности применения психотропных средств на ранних этапах лечения психоневрологических больных и может быть использован для прогнозирования динамики и конечного эффекта лечения.

Литература

1. *Верхлютов В.М., Щучкин Ю.В., Ушаков В.Л.* Статистическая оценка различий источников альфа- и тета-ритмов ЭЭГ с использованием кластерного анализа в норме и у больных шизофренией // library.mephi.ru/data/scientific-sessions/2005/t5/0-1-11.doc.
2. *Дейвисон М.* Многомерное шкалирование: Методы наглядного представления данных. – М: Финансы и статистика, 254 с., 1988.
3. *Думенко В.Н., Козлов М.К.* Электрографические корреляты «внутренних состояний», вызываемых условными раздражителями при инструментальном обучении у собак // *Материалы Международных чтений, посвящ. 100-летию со дня рожд. чл.-корр. АН СССР, акад. АН АрмССР Э.А.Асратяна. 30 мая 2003* // mosmedclinic.ru/conf_library/2003/5/481.
4. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы

биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М: Изд-во ВПК, 448 с., 2007.

5. *Матуа С.П., Рудковский М.В.* Перспективы применения метода многомерного шкалирования при осуществлении электроэнцефалографического мониторинга психофармакотерапии // *Биомедицина, № 4, с.95-96, 2006.*

6. *Омельченко В.П., Матуа С.П., Гришин А.Д.* Компьютерный анализ электрограмм мозга при действии некоторых психотропных средств // *Фармакол. и токсикол., т. 52, № 3, с. 18-22, 1989.*

7. *Рудковский М.В., Омельченко В.П., Матуа С.П.* Дискретный ЭЭГ мониторинг фармакотерапии психоневрологических больных с использованием метода многомерного шкалирования // *Изв. кузов. Сев.-Кав. регион. Естеств.науки. Приложение, № 8, с.59-67, 2003.*

8. *Электронный учебник по статистике: Многомерное шкалирование.* // <http://www.StatSoft.com.>, 2001.

9. *Itil T.M., Menon G.N., Dreyfus J.-F. et al.* Central effects and effective dose determination of suriclone (double-blind, controlled, phase I safety and quantitative pharmacology-EEG study) // *Drug Development Research, vol. 4, iss. 2, pp. 155-165. Published Online: 5 Oct 2004.*

10. *Young R., De Lee U.W., Takane Y.* Multidimensional scaling: Theory and method. – *Erlbaum, 240 p., 1986.*

**EEG MONITORING WITH METHOD OF MULTIDIMENSIONAL SCALING
UNDER ANTIDEPRESSED MONOTHERAPY BY MOCLOBEMID**

V.N.Karkischenko, M.V.Rudkovsky

*Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow
Rostov State Medical University, Rostov-on-Don*

Individual pharmacotherapy of depression patients was chosen by multidimensional scaling method. It has been proved that this method is effective for discrete EEG-monitoring of psychotropic drugs effectiveness on the early stages of treatment and for assumption of the end point of treatment.

Key words: computer pharmaco-electroencephelographia, multidimensional scaling, monitoring, psychopharmacotherapy, moclobemid.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвященные 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.

Рубрикация журнала

1. Обзоры
2. Оригинальные статьи
3. Краткие сообщения
4. Практикум
5. Нормативные документы

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

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

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

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

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

Общие требования к оформлению

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

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, 4) учреждения, в которых была проведена работа, город или населенный пункт. На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов). В конце статьи приводится список цитированной литературы (см. «**Литература**») и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи. Нумерация страниц – сверху по центру (на первой странице ее номер не проставляется).

На отдельных листах печатаются таблицы, иллюстративный материал, подписи к рисункам, а также – реферат и ключевые слова на английском языке. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу и на отдельном листе – фамилию, имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Литература». 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.

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: 1 – **биологический вид**; 2 – **пол**; 3 – **возраст**, **массу** животного; 4 – **генетический статус**: инбредные линии, популяции нелинейных животных гибриды, генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные); 5 – **источник**, откуда получены животные; 6 – **микробиологический статус**: гнотобиоты; SPF; конвенциональные; 7 – **условия содержания**: виварий, изолятор, барьерная система, тип клеток, плотность посадки животных, корм.

Статистическая обработка результатов и таблицы

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

Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке их упоминания в тексте. На обороте каждого рисунка или фотографии должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов, название статьи, номер рисунка, «верх». Подписи к рисункам даются общим списком на отдельной странице. Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение. На полях рукописи следует проставить (карандашом) номера таблиц и рисунков напротив тех мест в тексте, где желательно их поместить. Требования к иллюстрациям на дисках или компакт-дисках: а) черно-белая графика – разрешение: не менее 600 точек на дюйм, формат: EPS или TIFF, б) полутоновые и цветные изображения – разрешение не менее 300 точек на дюйм, формат EPS или TIFF, в) 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.

Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более 3 сокращений терминов, с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

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, заключенным в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов указываются (если это необходимо) в тексте на русском языке, при первом упоминании приводится их написание на языке оригинала в круглых скобках.

В списки 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, с.232, 2004.

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, с. 106-116, 1976.

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, № 1, с. 5-17. 2005.

для сайта: ссылка на страницу в Интернете.

Пример:

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

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 другую рубрику или номер журнала. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование. За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается.

После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

Рукописи направлять по адресу:

143332 Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые Горы, НЦБМТ РАМН, редакция журнала «Биомедицина».

Электронный адрес НЦБМТ РАМН: matveyenkoel@mail.ru

Телефон редакции: 561-52-64.

