

- в биомедицинских технологиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. 358 с.
11. **Слоним А.Ф.** Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. – М.-Л.: Изд. АН СССР. 1952. 325 с.
 12. **Шмидт-Нюельсен К.** Физиология животных. Приспособление и среда. В 2 томах (т.1). М.: Мир. 1982. 412 с.
 13. **Шмидт-Нюельсен К.** Размеры животных: почему они так важны? М.: Мир. 1987. 259 с.
 14. **Daly T.J.M., Buffenstein R.** Skin morphology and its role in thermoregulation in mole-rats, *Heterocephalus glaber* and *Cryptomys hottentotus* // J. Anat. 1998. No. 193. P. 495-502.
 15. **Donnelly H.T.** Oxygen consumption, activity and body fat in normal and hairless mice // Laboratory Animals. 1982. No.16. P.167-171.
 16. **Gordon C. J.** Temperature regulation in laboratory rodents. N-Y.: Cambridge University Press. 1993. 276 p.
 17. **Pass D., Freeth G.** The Rat // ANZCCART News. 1993 Vol. 6 No 4. P. 1-4.
 18. **Satinoff E.** Thermoregulation // I.Q. Whishalow, B. Kolb (Eds.) The behavior of the laboratory rat. A handbook with tests. NY.: Oxford University Press. 2005. P. 226-236.

The analysis of some physiological and ethological characteristics of hairless rats as new model of biomedical researches

D.A. Belyaev, M.M. Pekelis, Yu.V. Fokin, L.Kh. Kazakova

In article the possible reasons of the lowered body temperature and rather low level metabolism of hairless rats in comparison with rats with a normal hair coat and hybrid rats are analyzed. Possibly, at the given animals deprived of a hair coat, it is connected with necessity of decrease of heat losses that forces them to move less and more often to wash to be warmed. The specified facts do these animals attractive as models for any biomedical researches.

Key words: hairless rats, thermoregulation, body temperature, rate of passage of food through the digestive tract, impellent activity, ultrasonic vocalization, biomedical and non-clinical researches.

Радиационно-индуцированные повреждения коллагена в сухожилиях *in vitro*

Н.Ю. Игнатьева¹, О.Л. Захаркина², М.В. Кочуева³, А.В. Масленникова^{3,4}, В.А. Каменский⁴, В.Н. Баграташвили²

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

² – Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк

³ – Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

⁴ – Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Контактная информация: профессор Виктор Николаевич Баграташвили bagrat@laser.ru

В работе изучен эффект ионизирующего излучения аппарата для дистанционной лучевой терапии «Луч-1» (энергия пучка 1,25 МэВ, однократная доза 10 Гр) на коллаген сухожилий хвостов крыс. Уменьшение энтальпии денатурации коллагена и устойчивости к действию протеолитического фермента (трипсина) указывает на частичную деградацию макромолекул коллагена (19±7%). Появление после облучения дестабилизированной фракции макромолекул коллагена и изменение их взаимодействия с водой обнаружено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, сухожилие хвоста крысы, коллаген, многофотонная микроскопия.

Одним из первых этапов изучения динамики радиационно-индуцированной деградации тканей является определение модификации коллагенового каркаса при воздействии ионизирующего излучения. В литературных данных описываются, главным образом, изменения коллагена при облучениях дозами ≥ 10 кГр, которые проводятся для стерилизации коллагенсодержащих материалов. Они на несколько порядков превышают дозы, используемые в клинике при проведении лучевой терапии, и вызывают глубокие повреждения на всех уровнях структурной иерархии коллагена – от молекул до общей архитектоники материала [8, 12, 13, 16]. Целью настоящей работы явилось выявление первичных радиационно-индуцированных изменений в коллагеновой сетке *in vitro* при воздействии ионизирующего излучения в дозе, вызывающей начальные визуально определяемые изменения

тканей. В качестве объекта исследования использовали сухожилия хвостов крыс с квазикристаллической одноосной укладкой молекул в фибриллы, фибрилл — в волокна, а волокон — в пучки [3, 4].

Материалы и методы

Отсеченные хвосты (n=3) белых беспородных крыс подвергали облучению с помощью аппарата для дистанционной лучевой терапии «Луч-1» (энергия пучка 1,25 МэВ) однократно в дозе 10 Гр, что соответствует 30 Гр в режиме стандартного фракционирования. Далее сухожилие препарировали и исследовали методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КП ОКТ) по всей длине. Затем сухожилие освобождали от мышечной ткани, отмывали в 0,15 М растворе NaCl и выделяли пучки коллагена. Образцы сухожилия для изучения методом многофотонной микроскопии фиксировали.

сировали в 4% растворе формальдегида. Образцы для термического анализа хранили при -20°C , непосредственно перед анализом изымали и выдерживали в 0,15 М растворе NaCl в течение 1 ч при комнатной температуре. Образцы для определения протеолитической устойчивости к трипсину высушивали на воздухе в течение 24 ч, а для определения сорбционной емкости воды высушивали в вакууме при 50°C в течение 24 ч.

Термическое поведение коллагена в образцах изучали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (DSC TA 4000, ячейка DSC30, METTLER, Швейцария). Образцы массой 10–20 мг герметично закрывали в стандартных алюминиевых чашках и нагревали от 5 до 100°C со скоростью 10 К/мин. После проведения термического анализа образцы лиофильно высушивали и взвешивали. О степени деградации макромолекул судили по уменьшению теплового эффекта денатурации ΔH в облученных образцах по сравнению с энтальпией денатурации коллагена в intactных образцах сухожилий ΔH_d .

В качестве количественной характеристики протеолитической устойчивости использовали снижение массы образца после его инкубации в растворе трипсина (1 мг/мл, отношение фермент: субстрат 1:10) с добавлением азида натрия (0,02%) и ЭДТА (0,025 М) в течение 24–х ч при 37°C .

Сорбционные свойства образцов определяли гравиметрически после набухания высушенных препаратов в 0,15 М растворе NaCl с добавлением азида натрия (0,02%) в течение 6 ч при 37°C . Образцы промокали фильтровальной бумагой и взвешивали с точностью до 0,00001 г. Содержание воды выражали в процентах по отношению к массе высушенного препарата ткани.

Для получения микрофотографий с визуализацией волокон и пучков коллагена была использована многофотонная микроскопия с регистрацией сигнала второй гармоники. Нелинейный сигнал генерации второй гармоники (ГВГ), возникающий от макромолекул коллагена с отличной от нуля нелинейной поляризуемостью [11], имел высокую интенсивность, что обусловлено плотной параллельной упаковкой хромофоров [6]. Исследования проводились на микроскопе LSM Meta (Karl Zeiss, Germany). Возбуждение осуществлялось импульсным (100 фс) излучением лазера (MaiTai HP, Spectra Physics, США) на длине волны 800 нм с частотой повторения импульсов 80 МГц. Изображение среза, содержащее 1024×1024 пикселя, получали с увеличениями $\times 10$, $\times 20$ и $\times 40$. Пучки коллагена диаметром ~ 400 мкм перед съемкой выделялись из препаратов ткани и помещались между покровными стеклами для предотвращения высыхания. Основы метода и особенности его применения для получения ГВГ изображений коллагенсодержащих тканей подробно описаны в работах [7, 11].

Для проведения исследований методом КП ОКТ был использован компактный волоконно-оптический поляризационно-чувствительный томограф, разработанный в Институте Прикладной Физики РАН (Н. Новгород, Россия). Прибор оснащен гибким волоконно-оптическим зондом, источником излучения является суперлюминесцентный диод ($\lambda=980$ нм). Разрешение системы в аксиальном направлении составляет 10 мкм, в латеральном – 25 мкм. Количественную характеристику анизотропной среды – двулучепреломление (Δn) — рассчитывали по периоду модуляции интенсивности интерференционного обратно рассеянного сигнала (z_b): $\Delta n = \lambda / (2z_b)$. Основы ме-

тода и особенности его применения для получения КП ОКТ-изображений (томограмм) коллагенсодержащих тканей подробно описаны в работах [1, 2].

Результаты и их обсуждение

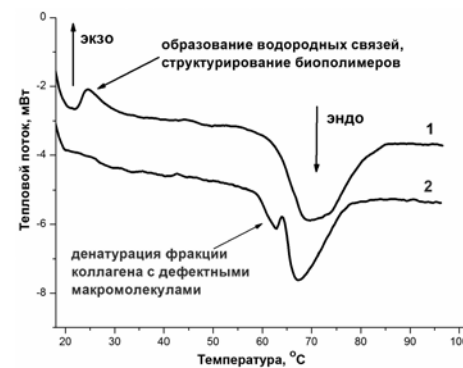


Рис. 1. Типичные термограммы intactных (1) и облученных (2) секвестрированных образцов сухожилий хвостов крысы.

При нагревании образцов intactных сухожилий в ДСК калориметре от 5 до 100°C на термограммах проявляются два пика (рис. 1, кривая 1). Первый пик с максимумом 25°C ($29,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) соответствует экзотермическому процессу с $\Delta H = -(5 \pm 1)$ Дж/г сухого препарата ткани, а второй пик с максимумом $66,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ – эндотермическому процессу с $\Delta H = 42,2 \pm 0,9$ Дж/г, сухого препарата ткани ($n=7$). Характеристики эндотермического перехода соответствуют денатурации коллагена (ΔH_d и T_d [11, 12]). Дополнительным доказательством того, что на ДСК термограммах при $66,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ регистрируется именно переход спираль-клубок, является растворимость в трипсине (ферменте, который является катализатором протеолиза поврежденных макромолекул коллагена, в то время как intactные трехспиральные молекулы устойчивы к воздействию сериновых протеаз [14]) образцов, изъятых

из калориметра после прогрева до 80°C . Прогрев до 63°C не приводил к потере массы препаратов в растворе трипсина. Наличие экзотермического перехода при 25°C при нагреве коллагенсодержащих тканей отмечалось в работе [10]. Там же было высказано предположение, что эффект связан с образованием водородных связей между полярными группами коллагена и молекулами воды или через водно-мостиковые связи и приводит к упорядочиванию системы биополимер-вода.

После ионизирующего воздействия ДСК кривые препаратов сухожилий значительно изменялись. На эндотерме денатурации проявлялся низкотемпературный пик, энтальпия денатурации снижалась до $33,5 \pm 5,5$ Дж/г ($n=5$), а экзотермический эффект на термограммах исчезал (рис. 1, кривая 2).

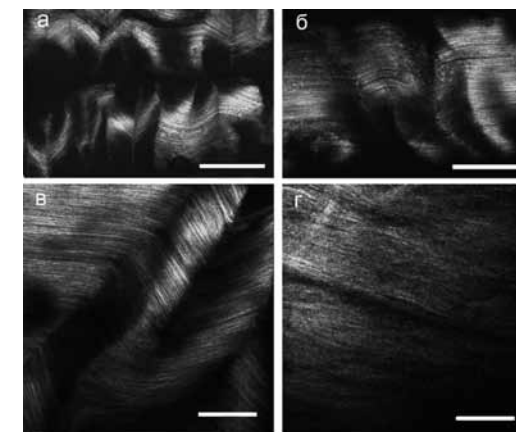


Рис. 2. ГВГ изображения ткани сухожилий до (а, в) и после (б, г) ионизирующего воздействия. Бар 200 мкм (а, б) и 50 мкм (в, г).

На облученных препаратах регистрировалось снижение массы в растворе трипсина на $19 \pm 7\%$ ($n=9$) по сравнению с intactными образцами, уменьшение массы которых за счет протеолиза неколлагеновых белков составляло $6 \pm 2\%$ ($n=9$). Способность набухать в воде так-

же возрастала у высушенных облученных препаратов ($264 \pm 27\%$, $n=6$ против $223 \pm 21\%$, $n=9$, отличие статистически значимо, $p < 0,5$).

Ионизирующее воздействие приводило лишь к незначительным изменениям в упаковке коллагеновых волокон матрикса ткани (рис. 2), причем оно наблюдалось лишь при увеличении $\times 20$ и выше. На ГВГ изображениях интактных образцов ярко проявлялись морфологические особенности сухожильной ткани, где волокна параллельно уложены во вторичные, а затем и третичные пучки, причем последние демонстрируют характерные для сухожильной ткани складчатости (кримпы). В облученных препаратах волокнистая структура в целом сохранялась, хотя границы между вторичными и третичными пучками становились несколько смазанными и отмечались локальные разрыхления волокон (рис. 2 г).

Интерференционная картина на КПОКТ томограммах (рис. 3), обусловленная параллельной укладкой макромолекул, фибрилл и волокон в сухожилии, практически не изменялась после ионизирующего облучения. Анизотропные свойства сохранялись, и двулучепреломление в облученной и контрольной ткани составляло $\Delta n \approx 7 \times 10^{-3}$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в коллагеновой сети первичным откликом на ионизированное излучение явилось повреждение макромолекул коллагена. У части макромолекул нативная трехспиральная конформация претерпела деградацию. Термический анализ показал, что доля таких молекул составляла $\sim 19\%$ (именно на столько уменьшается ΔH_d в облученных образцах), что хорошо согласуется с данным по протеолитической устойчивости.

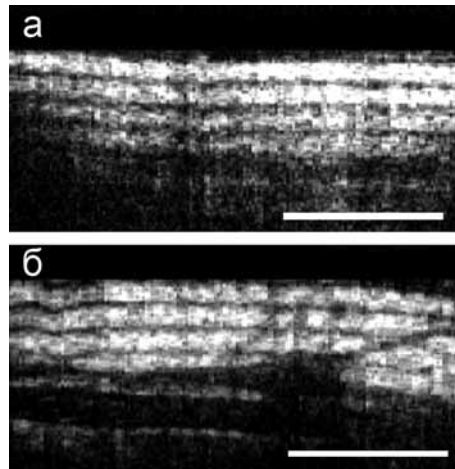


Рис. 3. КПОКТ томограммы интактной (а) и облученной (б) ткани сухожилия. Бар 500 мкм.

Обращает на себя внимание появление фракции коллагена с более низкой температурой денатурации, чем T_d коллагена в интактных сухожилиях. При высоких дозах радиации (от 1,9 кГр и выше) в облученных материалах происходит общее снижение T_d на 15°C и более [16]. В работах [13, 16] показано, что ионизирующее облучение при высоких дозах инициирует разрывы полипептидных цепей коллагена с последующей фрагментацией волокнистой структуры материала. В результате увеличивается свободный объем для денатурирующих цепей и ΔS денатурации, вследствие этого T_d уменьшается. Изменение волокнистой структуры, которое можно характеризовать как разрыхление, носило локальный характер (рис. 2б). Возможно, именно в областях разрыхления денатурация коллагена начинается при более низкой температуре, и само наличие таких областей обуславливает повышенную набухаемость облученных образцов.

Мы полагаем, что при относительно низких дозах воздействия (< 30 Гр) частичная дестабилизация коллагена связана с редкими разрывами отдельных пептидных связей в макромолекулах, при

этом полипептидные цепи не расходятся из-за наличия поперечных сшивок. Такое явление отмечалось, в частности, после кратковременного (30-900 с) УФ облучения раствора коллагена I ($\lambda = 253,7$ нм) [9], а также в суставной капсуле после электротермического воздействия [5]. Доказано, что фракция коллагена с пониженной T_d характеризуется трехспиральной конформацией, хотя и менее стабильной, чем интактные молекулы [9]. Лишь при длительном (1 ч и более) УФ облучении ($\lambda = 302$ нм) соединительных тканей [14, 15] отмечалось устойчивое снижение максимума пика эндотермы денатурации на $10-20^\circ\text{C}$ при одновременном уменьшении ΔH_d . Таким образом, пролонгированное воздействие приводит к серьезным повреждениям первичной структуры белка, и, как следствие, к деструкции ее трехспиральной конформации. По-видимому, механизмы воздействия на коллаген УФ и более жесткого гамма-излучения схожи, и на начальной стадии лишь часть макромолекул оказывается деградированной. Нарушения первичной и третичной структуры белка приводили к изменению взаимодействия биополимера с растворителем – водой, что проявлялось в исчезновении экзотермического эффекта образования структурирующих водородных связей при 25°C .

Выводы

При действии ионизирующего излучения в относительно низких дозах первичным откликом в коллагеновой сети *in vitro* является частичная потеря и дестабилизация нативной трехспиральной конформации. Изменение же волокнистых структур является, по-видимому, вторичным по отношению к изменению белка на молекулярном уровне. Модификация матрикса соединительной тка-

ни *in vivo* протекает по более сложному механизму и включает стадии изменения коллагена с участием активных форм кислорода. Тем не менее, определенный в нашей работе первичный отклик каркаса матрикса важен для анализа последующих деградации и репарации ткани.

Список литературы

1. **Гладкова Н.Д., Шахова Н.М., Сергеев А.М.** Руководство по оптической когерентной томографии. М.: ФИЗМАТЛИТ. 2007. 296 с.
2. **Логунова М.А., Шахова М.А., Андреева И.В., Игнатьева Н.Ю., Каменский В.А., Баграташвили В.Н.** Эффект уменьшения термостабильности коллагена при нарушении целостности ткани щитовидного хряща гортани // Биофизика. 2008. т. 53. № 5. С. 202-210.
3. **Николаева Т.И., Тиктопуло Е.Е., Ильясова Е.Н., Кузнецова С.М.** Структурно-термодинамические аспекты упаковки коллагеновых фибрилл // Биофизика. 2007. т. 52. № 5. С. 899-911.
4. **Церетели Г.И.** Тепловая денатурация коллагена в растворе и фибриллах // Биофизика. 1982. т. 27. № 5. С. 780-784.
5. **Bognar G., Szabo I., Balint L., Hepp B., Kereskai L., Lorinczy D.** Thermal effects of shoulder electrothermal arthroscopic capsulorrhaphy monitored by differential scanning calorimetry - A preliminary study // Thermochimica Acta. 2007. v. 464. № 1-2. P. 78-82.
6. **Deniset-Besseau A., Duboisset J., Benichou E., Hache F., Brevet P.F., Schanne-Klein M.-C.** Measurement of the second-order hyperpolarizability of the collagen triple helix and determination of its physical origin //

- J. Phys. Chem. B. 2009. v. 113. № 40. P. 13437-13445.
7. **Friedl P., Wolf K., von Andrian U.H., Harms G.** Biological second and third harmonic generation microscopy // *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Chapter 4, unit 4.15. 2007.
 8. **Gouk S.S., Lim T.M., Teoh S.H., Sun W.Q.** Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling // *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2008. v. 84B. P. 205–217.
 9. **Miles C.A., Siokowska A., Hullin S.L., Sims T. J., Avery N.C., Bailey A.J.** Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light // *J. Biol. Chem.* 2000. v. 275. № 42. P. 33014-33020.
 10. **Miles C.A., Wardale R.J., Birch H.L., Bailey A.J.** Differential scanning calorimetric studies of superficial digital flexor tendon degeneration in the horse // *Equine Vet. J.* 1994. v. 26. № 4. P. 291-296.
 11. **Roth S., Freund I.** Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon // *Biopolymers.* 1981. v. 20. № 6. 1271 p.
 12. **Seto A., Gatt Jr C.J., Dunn M.G.** Radioprotection of tendon tissue via crosslinking and free radical scavenging // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008. v. 466. P. 1788–1795.
 13. **Shah N.B., Wolters W.F., Morrissey M., Sun W.Q., Bischof J.C.** Fourier transform infrared spectroscopy investigation of native tissue matrix modifications using a gamma irradiation process // *Tissue Engineering Part C: Methods.* 2009. v. 15. № 1. P. 33-40.
 14. **Sionkowska A.** Thermal stability of UV-irradiated collagen in bovine lens capsules and in bovine cornea. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005. v. 80. № 2. P. 87-92.
 15. **Sionkowska A.** Thermal denaturation of UV-irradiated wet rat tail tendon collagen // *Int. J. Biol. Macromol.* 2005. v. 35. P. 145–149.
 16. **Sun W.Q., Leung P.** Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation // *Acta Biomaterialia*, 2008. v. 4. № 4. P. 817-826.

The effects of gamma irradiation on the collagen in rat tail tendon *in vitro*

N.Yu. Ignatieva, O.L. Zakharkina, M.V. Kochueva, A.V. Maslennikova,
V.A. Kamensky, V.N. Bagratashvili

The effect of gamma irradiation therapy on the collagen structure of rat tail tendon has been studied. The decrease in the denaturation enthalpy and increase in trypsin susceptibility was related with a damage of triple helical macromolecules ($19 \pm 7\%$). Destabilized collagen fraction and the alteration in biopolymers-water interaction were observed by differential scanning calorimetry. The loosening of secondary and tertiary fiber bundles was revealed by second harmonic generation microscopy. No significant degradation of anisotropic properties and tissue architectonics was revealed by cross-polarization optical coherent tomography technique. The instant response of collagen matrix on ionized radiation is related to degradation of collagen at the molecular level of organization.

Key words: ionized radiation, rat tail tendon, collagen, second harmonic generation microscopy.

Исследование антибиотикорезистентности микроорганизмов электрохимическими методами

Я.М. Чаленко¹, В.В. Шумянцева¹, С.А. Ермолаева², А.И. Арчаков¹

¹ – НИИ биомедицинской химии В.Н. Ореховича РАМН, Москва

² – НИИ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва

Контактная информация: yaroslavazaka@yandex.ru

Разработан электрохимический метод анализа клеток *E.coli JM109* с помощью циклической вольтамперометрии и квадратно-волновой вольтамперометрии. На основе электроактивности бактериальных клеток предложена система для определения чувствительности микробиологического материала к антибиотикам. Электрохимический метод позволяет получать данные по антибиотикорезистентности клеток *E.coli JM109* в течение 2-5 часов.

Ключевые слова: *E.coli JM109*, электрохимия, антибиотикорезистентность.

Инфекционные заболевания являются серьезной проблемой здравоохранения [1]. По данным федеральной службы государственной статистики в России за 2010 г. на 1000 человек приходится 34,6 случаев инфекционных (бактериальных и некоторых паразитарных) заболеваний [2]. Пищевые отравления и загрязнение воды, внутрибольничные инфекции и пандемии, инфекционные агенты вызывают заболевания по всему миру. Своевременное выявление возбудителя и его чувствительности к лекарственным препаратам позволяют снизить количество осложнений, уменьшить риск летальных исходов, подобрать адекватную и эффективную терапию. Заблаговременное определение чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам является важной диагностической целью в практической медицине, санитарно-гигиенической службе, экологической и пищевой промышленности. С появлением в медицинской практике антибиотиков и последующим формированием устойчивости к ним микроорга-

низмов возникала необходимость оценки чувствительности возбудителей к данным препаратам как ориентира для выбора лекарственной терапии. Таким образом, в современных условиях широкого распространения антибиотикоустойчивых, в том числе и полирезистентных, штаммов микроорганизмов рациональная химиотерапия и химиопрофилактика вызываемых ими инфекционных болезней, а также оценка эффективности новых лекарственных препаратов возможны только при условии определения степени чувствительности к ним микроба-возбудителя. Существующие современные методы определения чувствительности, несмотря на свои несомненные достоинства, не позволяют быстро и качественно проводить исследования на антибиотикочувствительность микроорганизмов в силу некоторых недостатков, основными из которых является, во-первых, потребность в выделении чистой культуры. Эта процедура занимает от 3 до 10 дней, что не позволяет своевременно начать и проводить адекватную индивидуальную