

2018

БИОМЕДИЦИНА

MEDICINE  
ISSN 2074-5982

2018

1

# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
ФМБА РОССИИ

# РУКОВОДСТВО «ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТЕРАПИИ. ТЕЗАУРУС. ИЗДАНИЕ ТРЕТЬЕ»

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ



***КАРКИЩЕНКО ВЛАДИСЛАВ НИКОЛАЕВИЧ***, доктор медицинских наук, профессор, директор Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Автор 200 научных трудов, включая монографии, учебники, патенты в области биомедицины, фармакологии, клинической фармакологии. За работы в организации медико-биологического обеспечения членов команд в спорте высших достижений Российской Федерации, включая Чемпионаты мира и Олимпиады, был отмечен медалью ордена «За заслуги перед Отечеством II степени», медалью ФМБА «За отличие в медицинском обеспечении спортсменов сборных команд России».



***КАРКИЩЕНКО НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ***, доктор медицинских наук, профессор, академик РАРАН, член-корреспондент РАН, научный руководитель Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Автор более 500 научных трудов. Работы по созданию препаратов специального назначения, повышающих работоспособность и выносливость, были отмечены Премией Ленинского комсомола, Государственными премиями СССР, премией Правительства Российской Федерации, премией Президиума РАМН, орденами и медалями СССР и РФ, а также зарубежными наградами.



***ШУСТОВ ЕВГЕНИЙ БОРИСОВИЧ***, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, главный научный сотрудник Института токсикологии ФМБА России, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии МЗ РФ. Автор более 350 научных трудов в области военной и экстремальной медицины, авиационной, космической, спортивной фармакологии. Лауреат Государственной премии СССР.

В середине 1990-х годов Н.Н. Каркищенко были изданы два руководства – «Фармакологические основы терапии» и «Тезаурус. Клиническая и экологическая фармакология в терминах и понятиях». На фоне очевидного «голода» на учебно-методическую литературу в том периоде времени эти книги были изданы большими тиражами (15 и 20 тыс. экземпляров). Руководства были переизданы, быстро разошлись, стали библиографической редкостью. Авторы подготовили третье издание в новой редакции.

**Третье издание объединяет в себе терминологию нормативных документов в сфере обращения лекарственных средств и охраны здоровья граждан, общебиологических и общемедицинских знаний, клинических терминов относительно широкого круга нозологий, термины и понятия фармакологии, фармацевтики и рецептуры.**



**ПЕРВЫЙ РАЗДЕЛ РУКОВОДСТВА** – «Общая и клиническая фармакология и фармакотерапия в терминах и понятиях» – охватывает свойства лекарственных форм и общую рецептуру, молекулярные основы фармакологии (свойства молекул, рецептор-лигандные взаимоотношения, синаптические процессы, особенности внутриклеточных структур и процессов, основные понятия радиофармакологии), характеристику иммунитета, аллергии ►

и иммунофармакологии. Приведена терминология специальных и прикладных вопросов военной, космической, спортивной, экологической, радиационной и иных видов фармакологии и фармакотерапии.

**ВТОРОЙ РАЗДЕЛ ИЗДАНИЯ** – тезаурус базисной фармакологии, который содержит определения, описания и характеристики основных групп лекарственных средств, объединенных по клинико-функциональному фармакологическому принципу. При описании групп указаны международные непатентованные наименования лекарственных средств, так как именно они являются основой назначения препаратов и выписки рецептов на них. Для комбинированных лекарственных средств и препаратов, которым МНН не присвоены, использовались их наиболее распространенные торговые наименования.

**ТРЕТИЙ РАЗДЕЛ ТЕЗАУРУСА** – нозологическая фармакология, в котором сделан акцент на применение для профилактики и лечения заболеваний основных групп базисной фармакологии средств и отдельных препаратов. При описании подходов к фармакотерапии приведены группы препаратов, направленных на лечение осложненных вариантов течения заболеваний при нетипичных клинических формах.

Завершает терминологический блок алфавитный список, который для удобства читателей мы разделили на два: список **около 1500 терминов и понятий** общих разделов фармакологии и описанных нозологических форм, симптомов и синдромов заболеваний, и второй список – **более 2000 упомянутых фармакологических групп и препаратов**.

Надеемся, что представленное Вам издание будет полезным для широкого круга медицинских и фармацевтических работников. Авторы с благодарностью примут пожелания и критические замечания к своему труду.

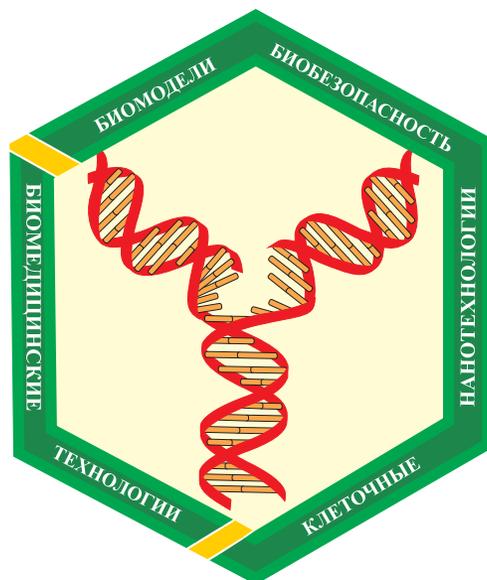
Научный журнал.

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

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

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

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и кандидата наук (редакция – январь 2018 года)



### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

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

### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**К.В. Анохин**, Москва, **Е.Е. Ачкасов**, Москва, **В.М. Баранов**, Москва, **И.А. Берзин**, Москва, **А.Т. Быков**, Сочи, **В. Влахов**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск, **А.М. Дыгай**, Томск, **А.Л. Зефиров**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан, **В.Г. Кукес**, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **А.И. Мирошников**, Пушкино МО, **А.Н. Мурашёв**, Пушкино МО, **С.В. Оковитый**, Санкт-Петербург, **В.П. Фисенко**, Москва, **Д.Ф. Хритинин**, Москва, **Б.Д. Цыганков**, Москва, **В.И. Цысь**, Смоленск

### Адрес редакции:

143442, Московская область,  
Красногорский р-н,  
пос. Светлые горы, владение 1  
Тел.: 8 (495) 561-52-64

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

Отпечатано в типографии «Айсинг»  
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18.  
Подписано в печать 16.03.2018  
Тираж 3 000 экз.

## Содержание

### НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

**Н.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова, В.Н. Каркищенко, В.В. Слободенюк, М.И. Воронова, Ю.В. Фокин**  
Сравнительное медико-генетическое исследование мускуса кабарги сибирской  
(*Moschus moschiferus*) .....6

**В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, С.Л. Люблинский**  
Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой  
хроматографии с масс-селективным детектором .....19

**В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, С.Л. Люблинский, М.Т. Гасанов, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин**  
Источники сырья новой биоактивной добавки к пище для коррекции эректильной дисфункции ....40

### РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

**Р.А. Клёсов, О.И. Степанова**  
Генетические биомодели метаболического синдрома .....50

**Ф.Х. Камилов, Т.И. Ганеев, В.Н. Козлов, Е.В. Кузнецова, Р.Р. Максютов**  
Выбор способа применения и дозы тиамазола для моделирования гипотиреоза  
у лабораторных крыс.....59

### МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Д.Г. Иванов, Н.В. Александровская**  
Влияние социальной изоляции на стрессоустойчивость и резорбцию костной ткани крыс  
при термическом стрессе .....71

**А.С. Липатова, П.П. Поляков, А.Х. Каде, А.И. Трофименко, С.В. Кравченко**  
Влияние транскраниальной электростимуляции на выносливость крыс с разной устойчивостью  
к стрессу .....84

## Content

### NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

**N.N. Karkischenko, N.V. Petrova, V.N. Karkischenko, V.V. Slobodenyuk, M.I. Voronova, Yu.V. Fokin**  
Comparative medical and genetic study of musk of Siberian musk deer (*Moschus moschiferus*) .....6

**V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, D.V. Khvostov, R.A. Ageldinov, S.L. Lyublinskiy**  
Analysis of biologically active musk compounds of musk deer (*Moschus moschiferus*) by gas chromatography with mass selective detector .....19

**V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, S.L. Lyublinskiy, M.T. Gasanov, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin**  
Sources of a new bioactive food additive for correcting erectile dysfunction .....40

### RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

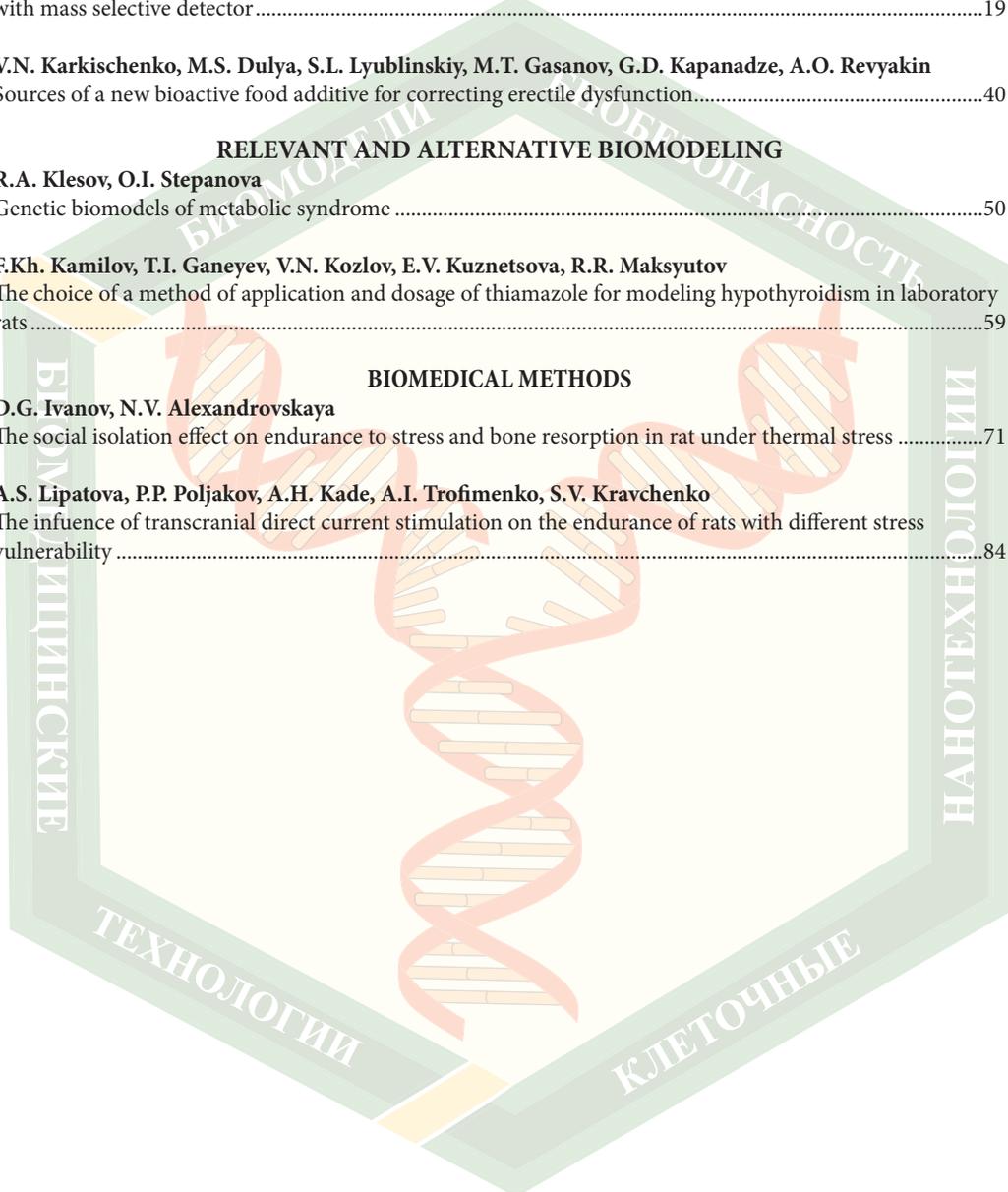
**R.A. Klesov, O.I. Stepanova**  
Genetic biomodels of metabolic syndrome .....50

**F.Kh. Kamilov, T.I. Ganeyev, V.N. Kozlov, E.V. Kuznetsova, R.R. Maksyutov**  
The choice of a method of application and dosage of thiamazole for modeling hypothyroidism in laboratory rats .....59

### BIOMEDICAL METHODS

**D.G. Ivanov, N.V. Alexandrovskaya**  
The social isolation effect on endurance to stress and bone resorption in rat under thermal stress .....71

**A.S. Lipatova, P.P. Poljakov, A.H. Kade, A.I. Trofimenko, S.V. Kravchenko**  
The influence of transcranial direct current stimulation on the endurance of rats with different stress vulnerability .....84





## Сравнительное медико-генетическое исследование мускуса кабарги сибирской (*Moschus moschiferus*)

Н.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова, В.Н. Каркищенко, В.В. Слободенюк, М.И. Воронова, Ю.В. Фокин

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

Контактная информация: *акад., д.м.н. Каркищенко Николай Николаевич, scbmt@yandex.ru*

Разработана и предложена тест-система для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с целью верификации обыкновенной, или сибирской, кабарги (*M. moschiferus*). Данная тест-система позволяет в короткие сроки и с большой эффективностью дифференцировать природное сырье мускуса кабарги от мускуса других видов животных (бобра, оленья европейского, косули европейской, лося обыкновенного). При этом отмечается высокая видовая специфичность системы, позволяющая с большой степенью точности проводить контроль качества сырья мускуса кабарги.

**Ключевые слова:** кабарга (*M. moschiferus*), мускус, ген-мишень, нуклеотидные последовательности, ПЦР-система в режиме реального времени.

### Введение

«Кабарговая струя» (или мускус) была известна с глубокой древности. О кабарожьем мускусе еще в V веке писал Евсевий Иероним, церковный писарь, автор латинского перевода Библии, о нем упоминается в сочинениях древних арабских врачей в конце XIX века [9].

Мускус содержится в препуциальной железе самцов кабарги, расположенной на нижней части брюха вблизи мочеполювого отверстия. В состав мускуса входят разнообразные органические вещества. Вещество, имеющее очень стойкий приятный запах мускуса, – мускон, или мусконоподобные кетоны и альдегиды – впервые было выделено в 1906 г. из желез южных подвидов кабарги. Кро-

ме него, в состав мускуса входят воски, мужские стероидные гормоны и др. биологически активные соединения [15, 22]. Мускус обладает общестимулирующим действием, повышает сексуальную активность. Он считается эффективным лекарством от конвульсий, удушья, ушибов и нарывов [14, 17, 18].

С середины XVI века или ранее мускус из Восточной Сибири и Приморья попал в Китай. У охотников ценились не мясо и шкура, поскольку за одну «струю», т.е. один мешочек с мускусом массой 30-40 г, купцы платили от 6-ти до 15-ти рублей золотом. И это притом, что, согласно «Домострою», в XVI веке за 3 копейки серебром можно было купить крестьянскую избу, а за 1-3 рубля – хорошую

корову или лошадь с подводом. По данным, 11 копеек серебром составлял месячный прожиточный лимит москвича. В середине XVII века постройка дома в Москве обходилась в 10 рублей. Апогея это хищничество достигло в 1855 г., когда охотниками Восточной Сибири было добыто 81200 «струй». В Европе мускусу, помимо медицинского, нашли новое применение: его стали добавлять в изделия парфюмерной промышленности – главным образом, в особо дорогие духи, отчего стойкость запаха духов увеличивалась в несколько раз. Из-за спроса восточного и западного рынков промысел кабарги еще более усилился. Кабаргу называли «оленом с роковым запахом». В 1985 г. стоимость мускусного секрета на мировом рынке составляла 30-45 тыс. долларов за 1 кг [5, 21].

В восточной медицине из мускуса изготавливается более ста лекарственных препаратов. Для изготовления части подобных «лекарств» спекулянты от торговли и медицины используют не только железу самцов (струю), но и всю тушу или ее части, т.е., в современном понимании, на рынок поставляется контрафакт. В давние времена в Китае было известно не менее трех сортов мускуса разной биологической активности и ценности. Популярность и дороговизна мускуса положили начало массовому истреблению кабарги. Самый варварский, но простой способ получения этого продукта – вырезать железу из тела убитого самца. В высушенном виде кабарожья струя может храниться в течение многих лет [23, 13].

Ежегодно из России нелегально вывозится кабарожьего мускуса на сумму 25 млн долларов США, – сообщается в газете «Деловой вторник», № 25, 2000.

Сложившаяся сейчас полукриминальная ситуация на рынке животного и растительного сырья ведет к разграблению природных ресурсов. Исследования генетики животных столь разнообразны, что привести все данные, накопленные по какому-либо виду, даже такому малоизученному как кабарга, в небольшой публикации очень сложно. Данная публикация включает результаты исследования, направленного на безусловное подтверждение природного сырья и его компонентов (мускуса кабарги), осуществление входного контроля субстанций при изготовлении лекарственных средств, исключение контрафактных продуктов. Достаточно сказать, что цена, по которой струя покупается у российского охотника, отличается от цены мускуса в Гонконге в 20-25 раз [1], при этом часто поставляется на рынок в форме контрафакта.

#### **Виды кабарги, их генотипы, карิโอ-типы, фенотипы**

Родовое и видовое названия кабарги (*Moschus moschiferus*) были даны К. Линнеем в 1758 г. В дальнейшем последовал этап выделения и описания около 10-ти отдельных видов кабарги из разных частей ареала, вновь объединяемых другими исследователями в один. Однако виды кабарог продолжали выделять вплоть до 1980-х гг. (*Moschus fuscus* Li – в 1981; *M. cupreus* Grubb – в 1982 г.). В XX в. наметилась тенденция к интеграции всех этих «видов» в несколько основных или даже один вид.

Флеров (1930, 1952) [10, 11, 12] выделял всего 3 вида кабарог: обыкновенную кабаргу (*M. moschiferus*), китайско-гималайскую кабаргу (*M. chrysogaster*) и кабаргу Березовского (*M. berezowski*) из провинций Китая Сычуань и Гань-

су. Еще раньше Р. Лидеккер и Цалкин (1947) [2] объединили все «виды» в один прежний. В пределах этого вида последний автор выделил 7 подвидов, предложил схему их эволюции и расселения. На разных этапах кабарог объединяли в одно семейство с оленьками (*Tragulidae*), но А. Milne-Edwards (1864) [19] выявил значительные различия между оленьками и кабаргами; с оленями (*Cervidae*), от которых у кабарог также имеются существенные отличия.

В настоящее время многие зоологи придают кабаргам статус отдельного семейства *Moschidae* в отряде парнокопытных (*Artiodactyla*). Различия во мнениях относительно количества видов в роде *Moschus*, единственного в семействе кабарог, присутствуют и в настоящее время. Существуют мнения о трех или даже семи видах кабарог [16]. Др. зоологи придерживаются позиции монотипии рода.

В систематике до сих пор не выработано четких критериев для разграничения не только видов мелких животных, но и таких крупных зверей, как кабарга и лось. Данные о систематическом разграничении семейства, рода и вида кабарог, даже без учета разногласий в отношении разных форм к разным подвидам или видам, необходимы для планирования использования и охраны кабарги в разных частях ареала.

Разделение кабарог на подвиды, сделанное В.И. Цалкиным (1947) [2], почти совпадает с их более поздними классификациями для территории России. Цалкин описал различия между северными и южными группами ее подвидов (два основных – мосхиферный, сифаноидный – и смешанный типы черепа), постепенную (клинальную) изменчивость

некоторых морфологических признаков у современных кабарог с юга к северу.

Соколов, Приходько (1997, 1998), Приходько (2003) [4, 7, 8], проведя краниологический анализ, выделили группу подвидов, которую они назвали «*sibirica nov.*» и для которой характерна относительно более короткая и высокая роstralная часть головы [2]. К ней они отнесли:

- сибирскую, или обыкновенную, кабаргу (*M. m. moschiferus*), распространенную на Алтае, в Восточной Сибири на запад до Енисея и на восток до реки Лены, в Забайкалье, Северной Монголии, в Большом и Малом Хингане и на западе Станового хребта;

- арктическую, или верхоянскую, кабаргу (*M. m. arcticus* Флеров, 1935) [3], заселяющую Верхоянский хребет и хребет Черского на запад до реки Лены и на восток до Колымы, Алдана и Станового хребта;

- дальневосточную кабаргу (*M. m. turowi*, *syn. M. m. turowi*, Цалкин, 1945) [3], обитающую в Сихотэ-Алине и на запад до реки Зеи;

- сахалинскую кабаргу (*M. m. Sachalinensis*, Флеров, 1935) [3], населяющую Сахалин.

К группе подвидов «*hymalaica nov.*», для которой характерна удлинённая форма роstralной части головы (морды) и нижней челюсти, ювенильные признаки в строении черепа некоторых подвидов в сравнении с северными [2], отнесены:

- корейский подвид (*M. m. parvipes* Hollister, 1911) [3], заселяющий п-ов Корея и прилежащие территории;

- китайская кабарга (*M. m. chryso-gaster* Hodgson, 1839) [3], распространенная в Центральном и Южном Китае, Тибете, Гималаях;

• гималайская кабарга (*M. m. leucogaster* Hodgson, 1839) [3], населяющая Тибет и Гималаи. Др. авторы выделяют в пределах южной группы форм многочисленные подвиды или виды. Некоторые из синонимов, которыми называют разные авторы ее южные и северные подвиды, приведены в книгах [2, 4]. Очевидно, что систематика «зарубежных» кабарог в плане присущего российским зоологам подхода разработана недостаточно.

Тем не менее, на территории бывшего Советского Союза и РФ обитает единственный вид кабарги – кабарга сибирская (*Moschus moschiferus*), который разделен на пять подвидов:

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

Все ныне живущие кабарги не столь сильно отличаются по морфологическим признакам друг от друга, как, например, разнообразные виды антилоп семейства Настоящих оленей (*Cervidae*) или быков семейства Бычьих (*Bovidae*). Незрелая морфологическая дифференциация сказывается, в частности, на существовании основных и промежуточных типов черепа разных форм кабарги, на клинальной их изменчивости [8, 2]. Лучше дифференцированы друг от друга более древние подвиды из южной части ареала, в становлении которых большое значение имела длительная географическая изоляция.

Столь же неопределенны и небольшие известные различия в наборе хромосом. Хромосомный набор кабарги содержит  $2n=58$  хромосом, иногда – В-хромосомы [6, 8]. Эти исследования выявили значительное сходство набора хромосом кабарог из Республики Алтай, Бурятии, Западных Саян и Иркутской области и небольшие отличия от них у одного самца дальневосточной кабарги (добавочные хромосомы, расположение мелких точечных хромосом-спутников в верхней части 4-й пары аутосом).

Хромосомный набор кабарги Березовского [20] практически не отличается от кариотипа сибирской кабарги. Как считают указанные авторы, эти признаки могут свидетельствовать в пользу монотипии рода *Moschus* на всем протяжении своего ареала.

Этот факт и подтверждает данные депонированных нуклеотидных последовательностей генов рода *Moschus* во всемирной базе данных NCBI GenBank, в которой на сегодняшний день отражены нуклеотидные последовательности генов обыкновенной (сибирской) кабарги (*M. moschiferus*), китайско-гималайской (*M. chrusogaster*) и кабарги Березовского (*M. berezowski*).

### Цель исследования

Целью нашего исследования являлся выбор наиболее перспективного гена, экспрессия которого стабильна на всем протяжении жизнедеятельности организма, а нуклеотидные последовательности менее всего подвержены мутациям. Данный ген, присущий всем видам рода *Moschus moschiferus*, или по отдельным ее видам, позволит создать уникальную систему ПЦР в режиме реального времени для контроля чистоты сырья мускуса кабарги.

Задачами исследования являлись:

- поиск генов-мишеней, депонированных в базе данных NCBI GenBank;
- проведение биоинформационного анализа последовательностей генов, специфичных для рода кабарги *Moschus moschiferus*;
- отбор наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей генов-мишеней;
- синтез видоспецифичных праймеров и зондов при создании ПЦР-системы в режиме реального времени;
- подбор и исследование расчетным и эмпирическим путем оптимальных конечных концентраций компонентов ПЦР-системы в режиме реального времени: дезоксинуклеотидтрифосфатов, ионов магния ( $Mg^{2+}$ ) и олигонуклеотидных праймеров и зондов;
- подбор расчетным и эмпирическим путем оптимальной температуры отжига олигонуклеотидных праймеров согласно соотношению оснований G/C и A/T их нуклеотидной последовательности;
- оптимизация количества повторяющихся циклов, при которых происходит наработка специфических продуктов амплификации;

- определение генетической общности внутри вида *Moschus moschiferus*;
- установление различий и верификация мускуса кабарги и его дифференциация с мускусом бобра и образцами видов животных семейства Оленьковые (*Cervidae*): оленя европейского (*Dama dama*), косули европейской (*Capreolus capreolus*), лося обыкновенного (*Alces alces*).

### Материалы и методы

Материалом для проведения исследования служил мускус кабарги. Исследование проводили поэтапно: выделение тотальной ДНК из мускуса кабарги, из тканей и препуциальной железы и др. животных в количестве 100 мг на каждую пробу, амплификация ДНК с помощью ПЦР в режиме реального времени (рис. 1).

Исследование нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA*: при выборе нуклеотидных последовательностей для конструирования олигонуклеотидных праймеров и зондов использовались последовательности гена, депонированные в электронной базе NCBI GenBank.

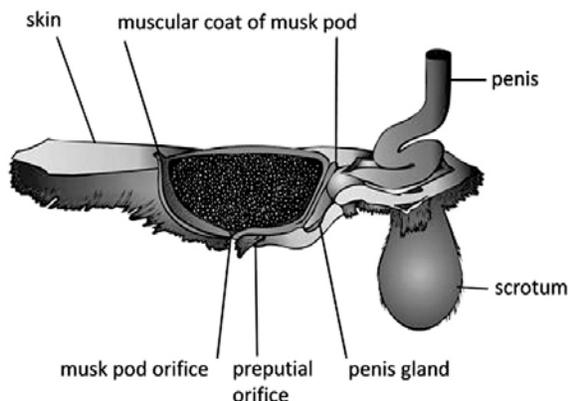


Рис. 1. Схема нативной ткани мочеполовой системы самца кабарги.

Для подбора зондов и праймеров применяли биоинформационный анализ последовательностей генов с помощью комплекса компьютерных программ Vector NTI Advance 9.0 (PC) [25], DNASTAR, BLAST [24]. Исследование будущей структуры олигонуклеотидных праймеров и зонда проводили на отсутствие внутренней вторичной структуры (отсутствие само- и взаимнокомплементарности), отсутствие комплементарности между 3'-концами (праймер-димеров, шпилек). Мечение красителями и гасителями по свойствам флуоресценции и гашения флуоресценции линейных зонда мишеней, с учетом ПЦР в реальном времени, осуществлялось в комбинации (по схеме «флуорофор – олигонуклеотид – гаситель»):

**ROX (карбоксих-Х-родамин) – зонд – BHQ2 (black hole quenchers).**

Вычисление концентрации производилось в соответствии с законом Ламберта-Бера при известной величине поглощения и молярном коэффициенте поглощения.

На значение молярного коэффициента поглощения влияет как состав олигонуклеотида, так и взаимодействия гетероциклических оснований, т.е. последовательность олигонуклеотида. Таким образом, зная значение поглощения (показатель спектрофотометра) и вычислив значение молярного коэффициента поглощения, мы рассчитываем концентрацию олигонуклеотида в растворе (мкМ) по уравнению Ламберта-Бера:

$$A = \epsilon \times C \times l,$$

где  $A$  – поглощение (ОЕ),  $\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения ( $M^{-1}cm^{-1}$ ),  $C$  – концентрация (М),  $l$  – длина оптического пути (см).

Определение поглощения ( $A$ ), измеренное при 260 нм в кювете с длиной

оптического пути 1 см, равно количеству олигонуклеотида в 1 мл воды. Концентрация олигонуклеотида в р-ре зависит от длины и последовательности, которые определяют значение суммарного молярного коэффициента поглощения ( $\epsilon$ ).

Отработку специфичности линейного зонда и праймеров для гена *16S rRNA* рода *Moschus* проводили в результате кратных амплификаций выделенной ДНК и с последующим анализом результатов порогового значения амплификации, при граничном значении порогового цикла  $Ct < 28$  регистрировали специфический уровень флуоресцентного сигнала по каналу ROX.

В работе применялся фермент ПЦР – HotTaq-полимераза. Для активации фермента перед проведением ПЦР проводили прогревание реакционной смеси с ферментом при 95°C в течение 15 мин (горячий старт). Для HotTaq-полимеразы в реакционной смеси использовался  $\times 10$  ПЦР-буфер следующего состава: 700 mM Трис-НСl, pH 8,3 / 25°C, 166 mM  $(NH_4)_2SO_4$ . Концентрация  $\times 10$  ПЦР-буфера в рабочей реакционной смеси доводилась до однократной концентрации.

Расчет оптимальной температуры отжига олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили по формуле (1), если суммарная длина нуклеотидной последовательности не превышала 20 оснований:

$$T_m = [(A + T) \times 2^\circ C] + [(G + C) \times 4^\circ C] \quad (1);$$

по формуле (2) – если суммарная длина олигонуклеотида составляла 20-30 оснований:

$$T_m = 22 + 1,46 ([2 \times (G + C)] + (A + T)) \quad (2),$$

где:  $T_m$  – температура отжига,  $A$  – число оснований аденина,  $T$  – число

оснований тимина, G – число оснований гуанина, C – число оснований цитозина.

Выделение ДНК проводили методом магнитной сепарации с помощью набора для выделения МАГНО-сорб («ИнтерЛабСервис», Россия) на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот и белков Kingfisher DUO («Thermo Scientific», Финляндия).

Аmplификацию с последующим определением гена *16S rRNA* проводили в 25 мкл смеси: ПЦР-буфер ( $\times 10$ ): 700 mM Трис-HCl, pH 8,6 / 25°C, 166 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 2,5 E HotTaq-полимеразы. Для амплификации фрагментов гена *16S rRNA* применяли условия амплификации: 95°C – 5 мин, затем 45 циклов: 95°C – 30 с, 55,5°C – 30 с, 72°C – 30 с. Детекцию накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time) проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США).

### Результаты и их обсуждение

На основании проведенного мониторинга генома рода *Moschus*, депонированного в базе данных NCBI GenBank, было установлено, что геном кабарги представлен ограниченным числом генов, большая часть из которых не имеет строго специфичных последовательностей, присущих только роду *Moschus*.

Одним из более перспективных генов рода *Moschus*, представленных в базе, был определен ген *16S rRNA*. Данный ген, по литературным данным, используется многими учеными мира для построения и изучения систематики, эволюционного родства различных живых систем. Ген *16S rRNA* участвует

в синтезе абсолютно всех рибосомальных белков внутри каждой клетки организма, обеспечивая тем самым жизнедеятельность на постоянном уровне, и эволюционно практически не подвержен мутациям. По своей структуре ген *16S rRNA* имеет как сходство между видами, так и индивидуальность, специфичность, присущую только конкретному роду/виду организма. Именно родовая специфичность нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA* кабарги позволила определить его как потенциальную мишень.

По результатам проведенного биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA* рода *Moschus*, депонированных в базе NCBI GenBank, были подобраны наиболее перспективные последовательности для создания олигонуклеотидных праймеров и зонда (табл.).

Для подбора форвард-прайма использовали разработанную нами ПЦР-систему в реальном времени для быстрого и высокоточного выявления специфичной нуклеотидной последовательности гена *16S rRNA* на участке 1-188 п.н. Для подбора реверс-прайма использовали нуклеотидную последовательность гена *16S rRNA* на участке 175-334 п.н. Для подбора нуклеотидной последовательности зонда использовали последовательность гена *16S rRNA* на участке 67-200 п.н. (табл.).

В результате проведения ПЦР-исследования ДНК кабарги с применением подобранных праймеров и зонда на основе последовательности гена *16S rRNA* рода *Moschus* были получены специфические результаты в режиме реального времени по каналу детекции ROX (рис. 2).

## Олигонуклеотидные праймеры и зонд ПЦР-системы

| Исследуемая мишень гена<br>16S rRNA | Олигонуклеотидные праймеры и зонд  |
|-------------------------------------|--|
| Mom F                               | ACCAAAGCTAGCCACAAATTTCACTCAACCTAACAATCAAAGCAAAATAAA<br>ACAAAACATTTATTTAATACCTTAAAGTATAGGAGATAGAAATTTAACTTGG<br>CGCTATAGAGAAAGTACCGTAAGGGAACGATGAAAGAAAATATACAAAGTAT<br>AAAAAGCAAAGATTACCCCTTGTACCTTTTG |
| Mom R                               | CCTTGTACCTTTTGCATAATGAGTTAACTAGTATGAAGCTTAACAAAACG<br>AATTCAGCTAAGCCACCCGAAACCAGACGAGCTACSTATGAACAGTT<br>TATTAAGAACCAACTCATCTATGTAGCAAATAGTGAGAAGATTTATAGG<br>TAGAGGTGACACGCC                          |
| Mom Z                               | AATACCTTAAAGTATAGGAGATAGAAATTTAACTTGGCGCTATAGAGAAAG<br>TACCGTAAGGGAACGATGAAAGAAAATATACAAAGTATAAAAAAGCAAAGAT<br>TACCCCTTGTACCTTTTGCATAATGAGTTA  |

В результате проведенной на первом этапе работы все образцы ДНК кабарги имеют специфическое накопление продукта амплификации, детектируются прибором в виде логарифмической кривой, т.е. показали себя как положительные.

Полученные данные свидетельствуют о специфичности ПЦР-системы в

режиме реального времени в отношении дифференциации рода *Moschus* и, следовательно, возможности проводить качественную ПЦР-диагностику гена, присущего всем видам рода *Moschus*, и осуществлять контроль чистоты сырья мускуса.

В качестве апробации данной ПЦР-системы нами проведен эксперимент, в

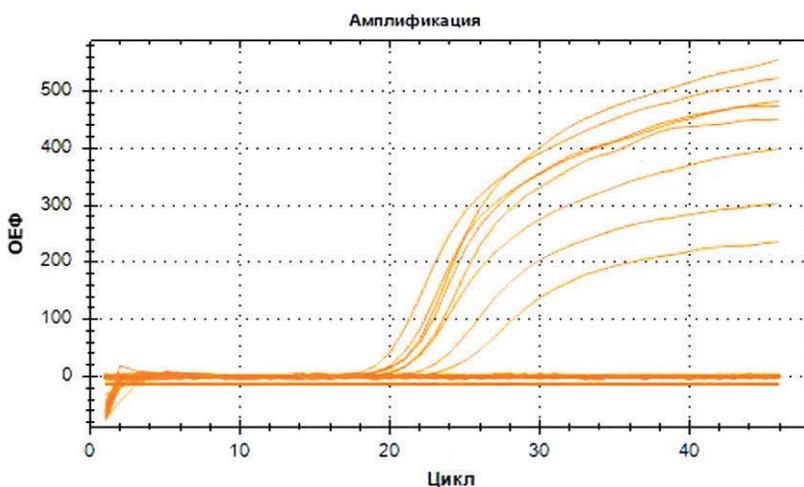


Рис. 2. Графическое изображение сигналов флуоресценции проведенной амплификации мускуса кабарги сибирской *Moschus moschiferus*.

По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ).

котором исследуемыми образцами являлись:

- ДНК мускуса кабарги Natural Qinghai Wild Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Muskiness (Китай);
- ДНК мускуса кабарги Natural Xizang Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Tibet Muskiness (Китай);
- ДНК мускуса кабарги, обитающей на территории России в республике Алтай;
- ДНК соединительнотканной части препуциальной железы кабарги, обитающей на территории России в республике Алтай;
- ДНК бобрового мускуса, или струи бобра обыкновенного (Castor fiber).

Этот животный продукт, выработанный секреторными железами, характеризуется буроватым цветом и мускусным запахом, также может использоваться как фальсификат мускуса кабарги.

По окончании проведенной пробоподготовки и амплификации с выбран-

ными праймерами и флюоресцирующим зондом по предоставленной выше программе получили следующие результаты.

На рис. 3 отображены детектируемые положительные образцы мускуса кабарги Natural Qinghai Wild Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Muskiness, мускуса кабарги Natural Xizang Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Tibet Muskiness, ДНК мускуса кабарги, обитающей на территории России в Республике Алтай, а также ДНК соединительнотканной части препуциальной железы кабарги, обитающей на территории России в Республике Алтай.

В отрицательных пробах мускуса бобра не выявляется специфичного продукта амплификации.

На третьем этапе эксперимента в качестве исследуемых образцов были выбраны ДНК разных животных, в т.ч. кабарга, относящихся к большому отряду парнокопытных и подотряду жвачных, а также:

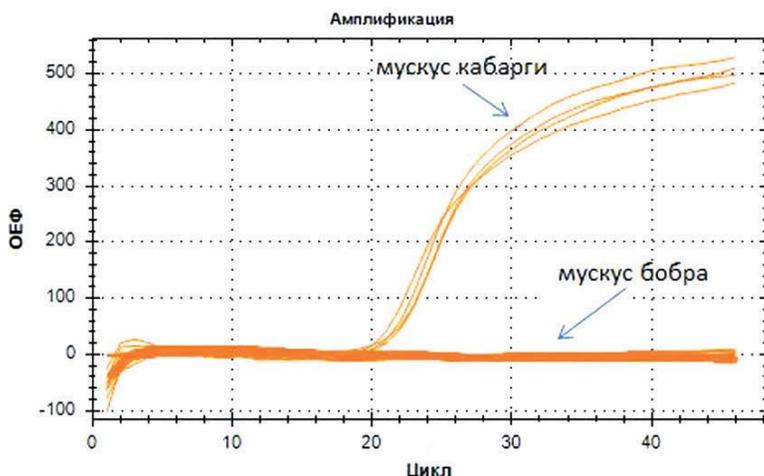


Рис. 3. Сравнительное графическое изображение сигналов флуоресценции продуктов амплификации мускуса кабарги и струи (мускуса) бобра.

По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ).

- ДНК оленя европейского (*Dama dama*),
- ДНК косули европейской (*Capreolus capreolus*),
- ДНК лося обыкновенного (*Alces alces*).

В результате проведенной амплификации разработанной тест-системой получили следующие итоговые данные: отсутствие специфичного сигнала (рис. 4) у исследуемых образцов оленя, косули и лося значит, что ДНК этих животных не имеют искомого участка, проявили себя отрицательно. Пробы с ДНК кабарги из разных источников дифференцированы со специфичным продуктом амплификации, а значит, являются положительными. Зарегистрированы пробы мускуса кабарги и ткани препуциальной железы кабарги.

Полученные данные свидетельствуют о работоспособности подобранной ПЦР-системы, позволяющей проводить

верификацию рода *Moschus* в режиме реального времени, с применением флуоресцирующего зонда.

После генотипирования проведено исследование профиля химического состава мускуса кабарги в лаборатории биоаналитических исследований ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, представленное в следующей статье.

### Выводы

1. Получена ПЦР-система в режиме реального времени для верификации обыкновенной, или сибирской, кабарги (*M. moschiferus*), геном-мишенью в которой выступает ген *16S rRNA*.

2. Разработанная тест-система позволяет в короткие сроки и с большой эффективностью дифференцировать природное сырье для последующих этапов производства.

3. Осуществлен поиск генов-мишеней, депонированных в базе данных NCBI GenBank.

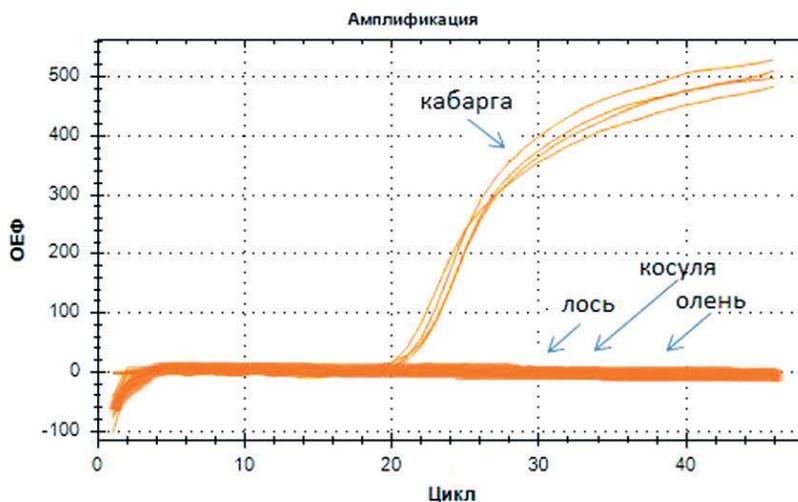


Рис. 4. Графическое изображение сигналов флуоресценции продуктов амплификации мускуса кабарги и мышечных тканей косули, лося, оленя. По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ).

4. Проведен биоинформационный анализ последовательностей генов, специфичных для рода кабарги *Moschus moschiferus*.

5. Выбраны наиболее перспективные нуклеотидные последовательности генов-мишеней.

6. Синтезированы видоспецифичные праймеры и зонд для создания ПЦР-системы в режиме реального времени.

7. Расчетным и эмпирическим путем подобраны и исследованы оптимальные конечные концентрации компонентов ПЦР-системы в режиме реального времени (дезоксинуклеотидтрифосфатов, ионов магния ( $Mg^{2+}$ ) и олигонуклеотидных праймеров и зонда), а также оптимальная температура отжига олигонуклеотидных праймеров согласно соотношению оснований G/C и A/T их нуклеотидной последовательности.

8. Оптимизировано количество повторяющихся циклов, при которых происходит наработка специфических продуктов амплификации.

9. Определено единство внутри вида *Moschus moschiferus*, обусловленное филогенетическим происхождением.

10. Осуществлена верификация мускуса кабарги и его дифференциация с мускусом бобра и образцами др. видов животных семейства Оленьковые (*Cervidae*): оленя европейского (*Dama dama*), косули европейской (*Capreolus capreolus*), лося обыкновенного (*Alces alces*).

### Список литературы

1. **Вайсман А.** Всемирный фонд дикой природы (WWF) намерен бороться с нелегальным промыслом кабарги // Честное Слово. – 2004. – № 392.
2. **Гептнер В.Г., Цалкин В.И.** Систематика кабарги (род *Moschus* L., 1758) // Олени СССР. – М., 1947. – С. 120-176.

3. **Зайцев В.А.** Кабарга: экология, динамика численности, перспективы сохранения. – М.: Изд-во Центра охраны дикой природы, 2006. – 120 с. ISBN 5-93699-052.
4. **Приходько В.И.** Кабарга. Происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация. – М., 2003. – 443 с.
5. **Приходько В.И.** Ресурсы, разведение и охрана кабарги // Состояние популяций, охрана и использование ресурсов кабарги Восточной Сибири. – Иркутск: ИрГСХА, 2003а. – Вып. 1. – С. 149-168.
6. **Соколов В.Е., Орлов В.Н., Чудиновская Г.А., Приходько В.И.** Кариологический анализ кабарги // Докл. 2-го Всесоюз. совещ. по копытным СССР. Копытные фауны СССР. – М. – 1980. – С. 46-47.
7. **Соколов В.Е., Приходько В.И.** Систематика кабарги (*Artiodactyla*, *Mammalia*). Сообщ. I // Известия АН. Сер. биол. – 1997. – № 6. – С. 677-687.
8. **Соколов В.Е., Приходько В.И.** Систематика кабарги (*Artiodactyla*, *Mammalia*). Сообщ. II // Известия АН. Сер. биол. – 1998. – № 1. – С. 37-46.
9. **Устинов С.К.** Загадочные тропы кабарги. – Иркутск: Вост.-Сиб. кн. изд-во, 1989. – 108 с.
10. **Флеров К.К.** К систематике и географическому распространению кабарги (*Moschus moschiferus* L.) // Ежегодник Зоол. Музея Акад. наук СССР. – Т. XXXI. – 1930. – Вып. 1. – С. 1-20.
11. **Флеров К.К.** Кабарги и олени // Фауна СССР. Млекопитающие. – М.-Л. – 1952. – № 55. – Т. 1. – Вып. 1. – 256 с.
12. **Флеров К.К.** Копытные (*Ungulata*) арктических стран // Звери Арктики. – Л., 1935. – С. 105-264.
13. **Хомес Ф.** Сибирская кабарга нуждается в защите // Радиожурнал “Человек и природа”. – 2002.
14. **Чечушков М.А., Канападзе Г.Д., Петрова Н.В., Ревякин А.О.** Таксономическая характеристика кабарги (*M. moschiferus*), разработка и совершенствование методов ее отлова в дикой природе // Биомедицина. – 2017. – № 4. – С. 4-17.
15. **Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E.** Study on the Components of Musk. I. Ether Soluble Components // Chem. Phann. Bull. – 1975. – V. 23. – No. 3. – Pp. 629-635.
16. **Green M.J.B.** The distribution, status and conservation of the Himalayan musk deer (*Moschus*

- chrysogaster) // Biological conservation. – 1986. – No. 35. – Pp. 47-375.
17. **Lee T.H.** Measure and current usage status in Korea of medicine made with endangered species // Proceedings of the Seminar on International Trade in Endangered Wild Fauna and Flora. – Seoul, Republic of Korea, 1995.
  18. **Lydekker R.** Notes on the Mammalian Fauna of the Ward and Upper China alleus // J. Asiat. Soc. Bengal. – 1877. – V. XLVI.
  19. **Milne-Edwards A.** Recherches sur la fatile des Chevrotains // Ann. Sc. Nat. Zool. – 1864. – Ser. V. II.
  20. **Shi L., Ma K.** The mitotic and synaptenemal karyotypes of the musk deer *Moschus berezovskii* F. // Mamm. Chromosome Newslett. – 1986. – V. 27. – No. 1-4. – Pp. 103-108.
  21. **Singh C.B.** Success in captive breeding of musk deer in Uttar Pradesh // Tiger Paper, 1985. – Pp. 31-32.
  22. **Yu D., Das B.C.** Structure of hydroxymuscopiridine A and hydroxymuscopiridine B, two new constituents of musk // Planta Med. – 1983. – V. 49. – No. 3. – Pp. 183-184.
  23. <http://bio.1september.ru/2002/14/1.htm>.
  24. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
  25. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>.
- ### References
1. **Vajsman A.** Vsemirnyj fond dikoj prirody (WWF) nameren borot'sja s nelegal'nym promyslom kabargi [The World Wildlife Fund (WWF) intends to combat the illegal fishing of musk deer]. Chestnoe Slovo [Honor Bright]. 2004. No. 392. (In Russian).
  2. **Geptner V.G., Calkin V.I.** Sistematika kabargi (rod *Moschus* L., 1758) [Systematics of musk deer (genus *Moschus* L., 1758)]. Oleni SSSR [Deer of the USSR]. Moscow, 1947. Pp. 120-176. (In Russian).
  3. **Zajcev V.A.** Kabarga: jekologija, dinamika chislennosti, perspektivy sohraneniya [Kabarga: ecology, population dynamics, perspectives of conservation]. Moscow: Izd-vo Centra ohrany dikoj prirody, 2006. 120 p. ISBN 5-93699-052. (In Russian).
  4. **Prihod'ko V.I.** Kabarga. Proishozhdenie, sistematika, jekologija, povedenie i kommunikacija [The musk deer. Origin, systematics, ecology, behavior and communication]. Moscow, 2003. 443 p. (In Russian).
  5. **Prihod'ko V.I.** Resursy, razvedenie i ohrana kabargi [Resources, breeding and protection of musk deer]. Sostojanie populjacij, ohrana i ispol'zovanie resursov kabargi Vostochnoj Sibiri [The state of populations, the protection and use of the resources of musk deer of Eastern Siberia]. Irkutsk: IrGSKhA, 2003a. Issue 1. Pp. 149-168. (In Russian).
  6. **Sokolov V.E., Orlov V.N., Chudinovskaja G.A., Prihod'ko V.I.** Kariologicheskij analiz kabargi [Karyological analysis of musk deer]. Dokl. 2-go Vsesojuz. soveshh. po kopytnym SSSR. Kopytnye fauny SSSR [Reports of the 2 nd All-Union Conference on Ungulates of the USSR. Hoofed fauna of the USSR]. Moscow. 1980. Pp. 46-47. (In Russian).
  7. **Sokolov V.E., Prihod'ko V.I.** Sistematika kabargi (Artiodactyla, Mammalia). Soobshh. I [Taxonomy of the musk deer (Artiodactyla, Mammalia). Msg. I]. Izvestija AN. Ser. biol. [Proceedings of the Academy of Sciences. Biology series]. 1998. No. 6. Pp. 677-687. (In Russian).
  8. **Sokolov V.E., Prihod'ko V.I.** Sistematika kabargi (Artiodactyla, Mammalia). Soobshh. II [Taxonomy of the musk deer (Artiodactyla, Mammalia). Msg. II]. Izvestija AN. Ser. biol. [Proceedings of the Academy of Sciences. Biology series]. 1998. No. 1. Pp. 37-46. (In Russian).
  9. **Ustinov S.K.** Zagadochnye tropy kabargi [Mysterious trails of musk deer]. Irkutsk: Vost.-Sib. kn. izd-vo, 1989. 108 p. (In Russian).
  10. **Flerov K.K.** K sistematike i geograficheskomu rasprostraneniju kabargi (*Moschus moschiferus* L.) [The taxonomy and geographical distribution of musk deer (*Moschus moschiferus* L.)]. Ezhegodnik Zool. Muzeja Akad. nauk SSSR [Yearbook of Zool. Museum of the Academy of Sciences of the USSR]. V. XXXI. 1930. Issue 1. Pp. 1-20. (In Russian).
  11. **Flerov K.K.** Kabargi i oleni [Musk deer and deer]. Fauna SSSR. Mlekopitajushhie [Fauna of the USSR. Mammals]. Moscow-Leningrad. 1952. No. 55. V. 1. Issue 1. 256 p. (In Russian).
  12. **Flerov K.K.** Kopytnye (Ungulata) arkticheskikh stran [Ungulata of Arctic countries]. Zveri Arktiki [Arctic beasts]. Leningrad. 1935. Pp. 105-264. (In Russian).
  13. **Homes F.** Sibirskaja kabarga nuzhdaetsja v zashite [Siberian musk deer needs protection]. Radiozhurnal "Chelovek i priroda" [Radio journal "Man and Nature"]. 2002. (In Russian).

14. *Chechushkov M.A., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Revjakin A.O.* Taksonomicheskaja harakteristika kabargi (*M. moschiferus*), razrabotka i sovershenstvovanie metodov ee otlova v dikoj prirode [Taxonomic characteristics of musk deer (*M. moschiferus*), development and improvement of methods for its capture in the wild]. Biomedicine. 2017. No. 4. Pp. 4-17. (In Russian).
15. *Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E.* Study on the Components of Musk. I. Ether Soluble Components. Chem. Phann. Bull. 1975. V. 23. No. 3. Pp. 629-635.
16. *Green M.J.B.* The distribution, status and conservation of the Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*). Biological conservation. 1986. No. 35. Pp. 47-375.
17. *Lee T.H.* Measure and current usage status in Korea of medicine made with endangered species. Proceedings of the Seminar on International Trade in Endangered Wild Fauna and Flora. Seoul, Republic of Korea, 1995.
18. *Lydekker R.* Notes on the Mammalian Fauna of the Ward and Upper China alleus. J. Asiat. Soc. Bengal. 1877. V. XLVI.
19. *Milne-Edwards A.* Recherches sur la fatile des Chevrotains. Ann. Sc. Nat. Zool. 1864. Ser. V. II.
20. *Shi L., Ma K.* The mitotic and synaptenemal karyotypes of the musk deer *Moschus berezovskii* F. Mamm. Chromosome Newslett. 1986. V. 27. No. 1-4. Pp. 103-108.
21. *Singh C.B.* Success in captive breeding of musk deer in Uttar Pradesh. Tiger Paper, 1985. Pp. 31-32.
22. *Yu D., Das B.C.* Structure of hydroxymuscopiridine A and hydroxymuscopiridine B, two new constituents of musk. Planta Med. 1983. V. 49. No. 3. Pp. 183-184.
23. <http://bio.1september.ru/2002/14/1.htm>.
24. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
25. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>.

## Comparative medical and genetic study of musk of Siberian musk deer (*Moschus moschiferus*)

N.N. Karkischenko, N.V. Petrova, V.N. Karkischenko V.V. Slobodenyuk, M.I. Voronova, Yu.V. Fokin

A test system for carrying out polymerase chain reaction (PCR) in real time for the purpose of verification of common or Siberian musk deer (*M. moschiferus*) was developed and proposed. This test system makes it possible to differentiate the natural musk deer's musk from musk of other species of animals (beaver, European deer, European roe deer, moose) in a short time and with great efficiency. At the same time, the high specificity of the system is noted, which allows to control the quality of raw musk deer's musk with a high degree of accuracy.

**Key words:** musk deer (*M. moschiferus*), musk, target gene, nucleotide sequences, real-time PCR system.

## Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором

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

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

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

Проведено исследование состава биологически активных компонентов мускуса кабарги в условиях комплексной пробоподготовки и последующего определения состава методом ГХ-МС с применением дериватизации силилированием и метилированием. Найдены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного определения главных компонентов. Подробно представлены результаты идентификации и определения содержания наиболее значимых (мажорных и минорных) компонентов в ткани железы в соответствии с библиотекой NIST 2014 и алгоритмом относительной нормализации. Предложены механизмы трансформации макроциклических компонентов (мускон, экзальтон), связанные с душистыми свойствами мускусовой железы кабарги. Описаны возможные связи компонентов препарата на основе железы с биологическим эффектом. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности состава железы, предложены маркерные компоненты в составе мускусовой железы и указаны возможные взаимосвязи обнаруженных компонентов состава с биологическими эффектами.

**Ключевые слова:** кабарга (*Moschus moschiferus*), мускус, железа, газовая хроматография, масс-спектрометрия, дериватизация, андростероиды.

### Введение

Кабарга (*Moschus moschiferus*) – небольшое, похожее на оленя животное, населяющее крутые, поросшие хвойным лесом скалистые склоны гор. Кабарга характеризуется стенофагией (узкоспециализированное питание животных) и преобладанием в ее рационе лишайников, доля которых очень высока и может достигать 95%.

Мускус (выделение особой железы) кабарги является одним из наиболее ценных природных биостимуляторов, применение которых в арабской, тибетской, китайской и индийской медицине известно с середины IV века [1]. Он при-

меняется или как монокомпонентный препарат, или как обязательный базисный компонент различных комплексов поддержания жизнедеятельности и долголетия. Представленные в литературе по народной и региональной медицине данные свидетельствуют о его эффективности при инфекционных заболеваниях (иммуностимулирующее действие), вялом заживлении ран (регенеративное действие), нарушениях кроветворения (противоанемическое действие), состояниях хронического утомления, астении, последствиях черепно-мозговых травм, нарушений мозгового кровообращения, нейроинфекций (нейропротекторное,

ноотропное, психоэнергизирующее действие), онкологических заболеваниях (иммунный контроль над опухолевым ростом, повышение эффективности и переносимости лучевой и химиотерапии опухолей, ускоренное восстановление после хирургического лечения), а также для борьбы с импотенцией и бесплодием [10].

Экспериментальные и клинические наблюдения на мышах, крысах, морских свинках и кроликах показали, что мускус в дозах 1-100 мг/кг массы тела оказывает анальгезирующее и противовоспалительное влияние, вызывает спонтанные сокращения матки у крыс, тормозит перистальтику изолированной подвздошной кишки у кролика [10].

В экспериментальных исследованиях обнаружены антиокислительные (антиоксидантные) свойства мускуса кабарги [5, 12]. Антиоксидантные свойства мускуса предполагают эффективное его применение в профилактике и лечении заболеваний, причиной которых является оксидативный стресс, или в патогенезе которых он участвует. К таким заболеваниям относятся нейродегенеративные заболевания (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера, эпилепсия, деменция, рассеянный склероз), сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемически-реперфузионные поражения миокарда, дистрофия миокарда), сахарный диабет, заболевания дыхательной системы (респираторный дистресс-синдром, пневмония, бронхообструктивные заболевания), различные формы анемий, ретинопатии, катаракта, ревматоидный артрит, различные интоксикации.

Известно, что одним из компонентов стероидной фракции мускуса является

3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -андростандиол, у которого обнаружен модулирующий (стимулирующий) эффект на мелатонин-синтезирующие ферменты шишковидной железы – N-ацетилтрансферазу и гидроксидол-О-метилтрансферазу [12]. Следовательно, мускус железы может оказывать благоприятное действие на биологические ритмы человека, скорость процессов старения, процессы спонтанного канцерогенеза.

Такая широкая сфера его показаний к применению позволяет предположить, что в его составе могут присутствовать регуляторные соединения пептидной природы, гормонально активные комплексы и ростовые факторы, в т.ч. активирующие жизненный цикл стволовых клеток [4].

Представленные в литературе данные об эффективности применения мускуса кабарги, в т.ч. при инфекционных заболеваниях, вялом заживлении ран, нарушениях кроветворения, заболеваниях нервной системы, онкологических заболеваниях, импотенции и бесплодии, носят разрозненный, чаще всего – описательный характер. Они не введены в научный оборот, т.к. не соответствуют требованиям доказательной медицины. Каких-либо контролируемых доклинических и клинических исследований эффективности и безопасности препаратов мускуса кабарги на сегодняшний день не проводилось. Перспективность для современной медицины новых биогенных стимуляторов, полученных из мускуса кабарги, основанная на многовековом опыте их применения в арабской, тибетской, китайской и индийской медицине, не вызывает сомнений [2].

Несмотря на столь обширный период применения, состав активных компонентов мускуса кабарги остается малоизучен-

ным, не идентифицированы компоненты, ассоциированные с широким спектром биологической активности ткани. Известно, что в состав мускуса входят жирные кислоты, воски, ароматические и стероидные соединения, сложные эфиры холестерина. Основной носитель мускусного запаха связывают с присутствием в составе макроциклического кетона мускона. Однако с большинством из этих компонентов известные биологические эффекты не сопоставлены и не доказаны экспериментально. Более того, известно, что различные пробы мускуса по своей биологической активности не являются эквивалентными, и их эффективность варьирует от умеренной до очень высокой.

В связи с этим **целью** нашего исследования стала идентификация биологически активных соединений, обеспечивающих биологическую эффективность мускуса кабарги.

Задачи состояли в разработке методов пробоподготовки экстрактов мускусной железы в различных условиях, подборе условий дальнейшей дериватизации и их идентификации в природном сырье методом ГХ-МС анализа. На основе результатов выполненной работы будет возможно решать задачи стандартизации, в т.ч. биологической, природного сырья, разработки технологии получения эффективных лекарственных форм препаратов и методов контроля их качества.

Ранее из экстрактов секрета препуциальной железы самцов кабарги выделено более 20-ти различных природных соединений. Большинство из них идентифицированы с низким фактором надёжности в идентификации (табл. 1). Рядом работ было установлено, что в мускусе кабарги присутствуют мускон [15], стероидные гормоны, мускопиридины [6] и др. макроциклические соединения.

Таблица 1

**Химический состав (% к весу экстракта секрета) мускусной железы**

| Компоненты секрета                                    | Китайская кабарга [6, 13] | Сибирская кабарга [12] |
|---|---------------------------|------------------------|
| Воски   | 17,0                      | 38,0                   |
| Мускон  | 22,6                      | 0**                    |
| Алифатические спирты                                  | 2,8                       | 0**                    |
| Кислоты и фенолы                                      | —*                        | 10,0                   |
| Стероиды (суммарно)                                   | 46,4                      | 38,0                   |
| Холестанол  | —*                        | 1,8                    |
| Холестерин  | 7,7                       | 7,0                    |
| 5 $\alpha$ -13,17-дикетоандростан                     | 1,3                       | 0**                    |
| 5 $\beta$ -3,17-дикетоандростан                       | 1,3                       | 0**                    |
| $\Delta^4$ -3,17-дикетоандростан                      | 1,7                       | 0**                    |
| $\Delta^{4,6}$ -3,17-дикетоандростан                  | 1,7                       | 0**                    |
| Андростерон   | 3,1                       | 3,0                    |
| $\Delta^4$ -3 $\alpha$ -окси-17-кетоандростан         | —*                        | 3,4                    |
| $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидрокси-17-кетоандростан      | 1,2                       | 0**                    |
| Эпиандростерон  | 0,7                       | 0**                    |
| 5 $\beta$ -3 $\alpha$ -окси-17-диооксиандростан       | 5,6                       | 9,5                    |
| 5 $\alpha$ -3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -диооксиандростан | 5,3                       | 3,0                    |
| 5 $\beta$ -3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -диооксиандростан  | 1,4                       | 1,0                    |
| 5 $\beta$ -3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -диооксиандростан | 6,3                       | 3,1                    |

Примечания: \* – данные отсутствуют, \*\* – соединение или отсутствует, или его концентрация менее чем 0,5%.

Мускусный запах секрету препуциальной железы придает смесь летучих компонентов железы, одним из которых является макроциклический кетон мускон (3-метилпентадеканон, рис. 1), содержание которого широко варьирует в зависимости от подвиговой классификации, ареала обитания и сезонности [14]. Так, у животных из географически удаленных популяций (Китай, Непал) его процентное отношение к весу исследуемого экстракта может составлять от менее чем 0,5% [15]

до 22,6% [6]. В образцах из др. мест обитания мускон не обнаружен [3].

Известно, что молекула 3-метилпентадеканона (мол. вес: 238 а.е.м., CAS 541-91-3) синтезируется рядом методов направленного органического синтеза через стадии циклизации и конденсации линейных карбоновых и дикарбоновых кислот [11], в которых исходными являются гексадекановая дикарбоновая, 3-метилгексадекановая и др. линейные кислоты (рис. 2).



Рис. 1. Молекулярная структура и ГХ-МС спектр мускона (3-метилпентадеканона, CAS 541-91-3). Источник: Library NIST14.

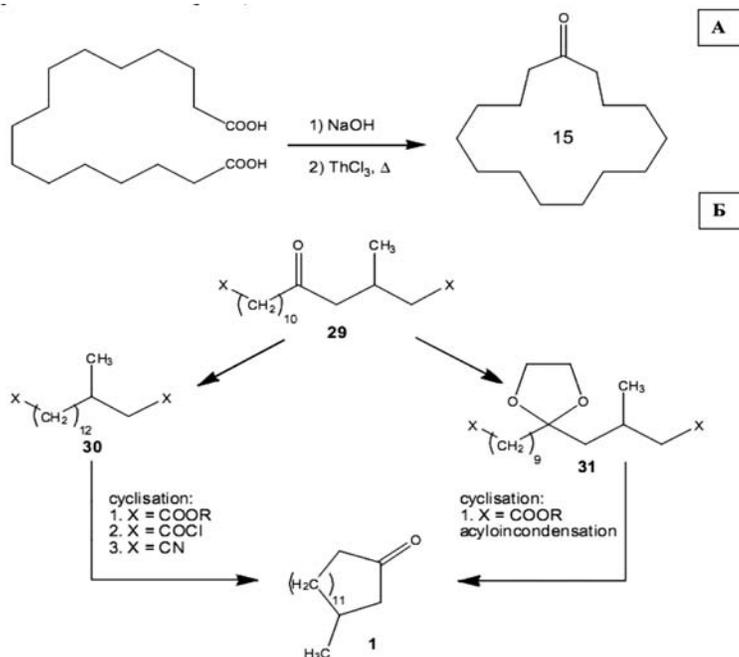


Рис. 2. Схема реакции циклизации гексадекановой дикарбоновой кислоты с образованием мусконподобного макроциклического кетона (пентадеканона, экзальтон) (А). Схема лабораторного получения мускона (3-метилпентадеканона, 1) из различных линейных карбопроизводных (Б).

Обратная реакция дециклизации и раскрытия цикла макроциклических мусконов может происходить как под воздействием внешних факторов (света, температуры), так и ввиду особенностей биотрансформации внутренней секреции в присутствии ферментов, металлопротеиназ и микробиоты мускусной железы.

Основу липидных компонентов мускуса составляют стероиды – 38,0-46,4%, в т.ч. холестеранол, холестерин и соединения ряда андростана (рис. 3). Среди липидов значительную долю (до 38%) занимают воски, т.е. сложные эфиры холестерина и высших жирных спиртов с длинноцепочными алифатическими кислотами. Воски могут играть роль инертной подложки, пролонгирующей сигнальное действие пахучих соединений. Они могут служить также источником свободных жирных кислот, например,

при ферментативной их трансформации. В составе секрета препуциальной железы в значительных количествах (до 10%) присутствуют свободные жирные кислоты и фенольные соединения, среди которых преобладают  $C_{16}$ – $C_{24}$  и ароматическая фенилуксусная кислота. В липидах секрета присутствуют также не идентифицированные компоненты, которые в принципе могут выполнять сигнальную функцию, хотя содержание их в экстракте оказалось незначительным – менее 0,5%.

Обнаруженные межпопуляционные (или подвидовые) различия в составе выделений препуциальной железы кабарги могут быть обусловлены различным набором спектра предпочитаемых кормов. Обоняние у копытных играет решающую роль при выборе поедаемых растений. Пищевые предпочтения видов, ориентированные на запах расте-

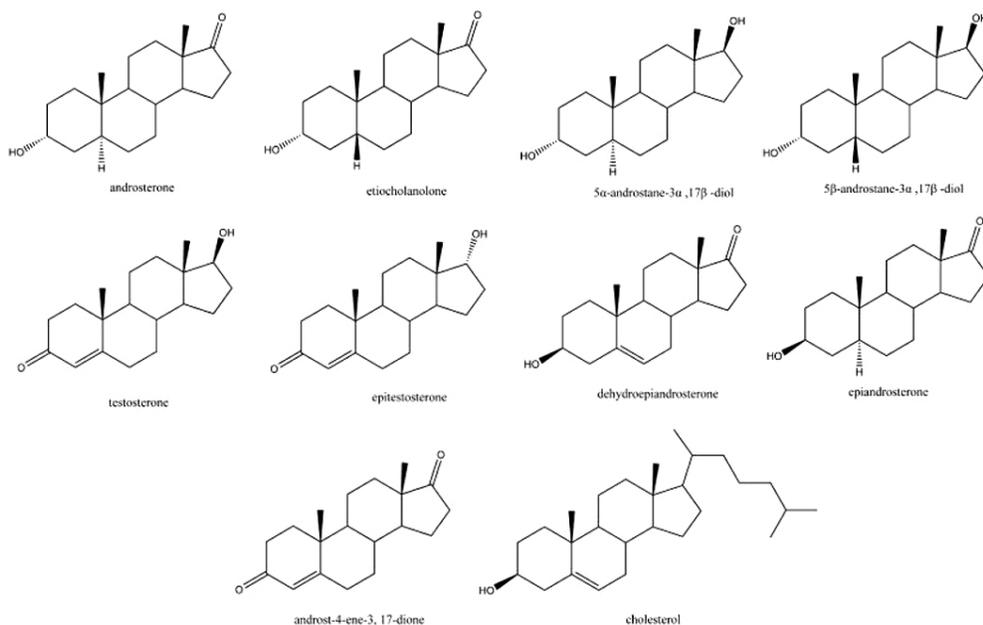


Рис. 3. Андрогенная группа стероидов, обнаруживаемая в мускусной железе кабарги (по данным [9]).

ний, широко используются в последние годы как самостоятельное направление химической экологии, а сам эффект получил название «ольфакторный опосемантизм» [7]. Растения, обладающие предпочитаемыми запахами, не только удовлетворяют потребности животного в пище, но могут также служить источником поступления в организм ряда органических веществ, способных связываться с клетками-мишенями в специфических кожных железах.

### Материалы и методы

#### Образцы для исследования

Изучаемыми объектами были нативные ткани мускусной железы кабарги сибирской (рис. 4), извлекаемые из мускусного мешочка – специфичного природного контейнера с зернистой темно-коричневой тканью. Препаратами сравнения выступали два объекта извлеченной мускусной железы кабарги китайской – коммерчески доступные образцы «Natural Qinghai Wild Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance» двух различных партий, маркированные нами как Gold и Silver.

Первичным объектом для извлечения биологически активных компонентов является ткань мускусной железы, имеющей на своей поверхности фрагменты кожи, волос, фасций (рис. 4). Поэтому первым этапом подготовки ткани железы к последующему анализу является механическое освобождение образца ткани от инородных включений.

Пробоподготовка включала этапы механической гомогенизации и последующей экстракции компонентов, а также этапы химического тканевого лизиса для высвобождения активных компонентов из тканей в среде различных растворителей и значения рН.

#### Пробоподготовка для анализа жирно-кислотного состава мускусной железы кабарги

Условия экстрагирования из нативных тканей природного сырья являются наиболее значимой стадией для полного представления о качественном и количественном составе объекта.

Нами отработаны условия экстрагирования из ткани мускусной железы растворителями широкого ряда с раз-



Рис. 4. Общий вид ткани мускусной железы кабарги.



ра – 200°C; поток гелия – 1,0 см<sup>3</sup>/мин; деление потока – 1:10; время анализа – 33 мин; ввод 1 мкл пробы.

Для надежной идентификации дериватов использовали автоматическую базу поиска и идентификации данных хромато-масс-спектрометрии NIST14 MS Library.

### Дериватизация компонентов мускусной железы

Известны многочисленные варианты эффективной дериватизации первичных и вторичных аминов, карбоновых кислот, спиртов, стероидов методом силилирования. При ГХ-МС анализе определяемые аналиты химически модифицируются для обеспечения более разделяемых пиков с улучшенными хроматографическими свойствами – време-

нем удерживания и разрешением, а также более информативных масс-спектров после электронной ионизации (ЭИ).

Используя методы дериватизации силилированием для экстрактов мускусной железы кабарги, время удерживания полученных продуктов изменяется, а форма пика компонента значительно улучшается.

### Результаты и их обсуждение

Весь пул хроматографически разделенных компонентов (рис. 6) был идентифицирован в автоматическом режиме (библиотека NIST14 MS Library) и подвергнут ранжированию по вкладам площадей каждого компонента в общий ионный ток и степени достоверности предложенных структур.

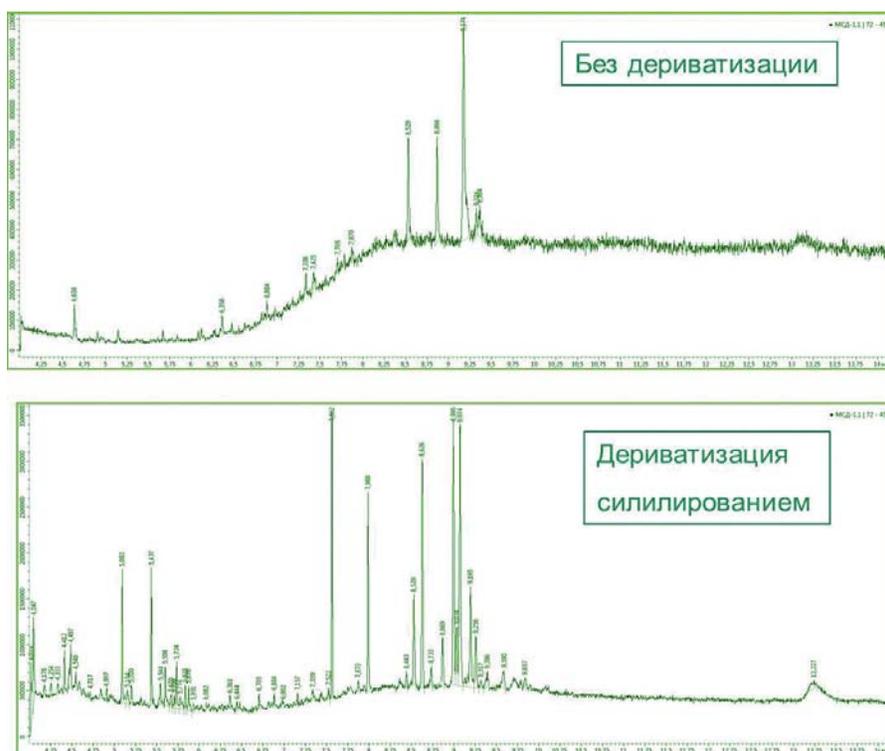


Рис. 6. Профиль хроматограммы ГХ-МС анализа субстанции мускусной железы без и после дериватизации силилированием.

Таблица 2

Состав ткани мускусовой железы кабарги сибирской по классам соединений (после дериватизации силилированием)

| № п/п | Группа                               | Типичные представители   | Массовая доля, % |
|-------|--------------------------------------|--|------------------|
| 1.    | Производные жирных кислот            | Октадеканойдная, гексадеканойдная, тетракозаноидная, докозаноидная, гептакозаноидная, нонадеканойдная кислота и их эфиры | 52,37            |
| 2.    | Андростероны                         | Дегидроизоандростерона ацетат  | 6,92             |
| 3.    | Ненасыщенные углеводороды (воска)    | Докасен, нонадецен, метилнонадиен  | 4,59             |
| 4.    | Стероиды (холестеролы)               | Холестерол, холестанон, холестаен, холестаенол   | 8,68             |
| 5.    | Кетоны и альдегиды (мускон-подобные) | Эфиры бензальдегида, фуранона  | 4,48             |
| 6.    | Эйкозаноиды и простагландин          | Арахидоновая кислота, эфиры эйкозаноидной кислоты  | 3,78             |
| 7.    | Циклические производные              | Производные циклопентанона, циклотетрадекана   | 7,26             |
| 8.    | Спирты многоатомные                  | Пентанол, гептадеканол, нонадеканон, эритритол   | 2,34             |
| 9.    | Эпоксид-производные жирных кислот    | Производные оксирана   | 2,54             |
| 10.   | Пирролидины                          | Пирролифен   | 1,27             |
| 11.   | Фумаровые эфиры жирных кислот        | Фумаровая кислота, 2-хлорпропилтридециловый эфир   | 1,23             |
| 12.   | Эстрогенные фитостеролы              | 17-Пентатриаконтен   | 1,02             |
| 13.   | Пиримидиновые эфиры                  | 5-(1,3-бутадиенил)-5-этил-гексагидропиримидин-2,4,6-трион  | 0,37             |
| 14.   | Фенольные производные                | 3,5-дигидроксибензойная кислота и её эфиры   | 0,56             |
| 15.   | Фенотиазиновые производные           | 6-гидроксибензо(а)фенотиазин-5-он  | 0,11             |
| 16.   | Неидентифицированные липиды          | -  | 2,48             |

Анализ состава экстрактов мускусовой железы без дериватизации представлен малым количеством компонентов в сравнении с профилем состава с предварительной дериватизацией силилированием (рис. 6).

Состав экстрактов мускусовой железы кабарги многообразен и представлен широким классом соединений, типов

их модификаций и имеет 15 основных групп веществ (табл. 2).

Количество определяемых соединений в экстракте мускусовой железы в различных условиях экстрагирования и последующей дериватизации достигает 70-90 хроматографически разделяемых компонентов (рис. 7).

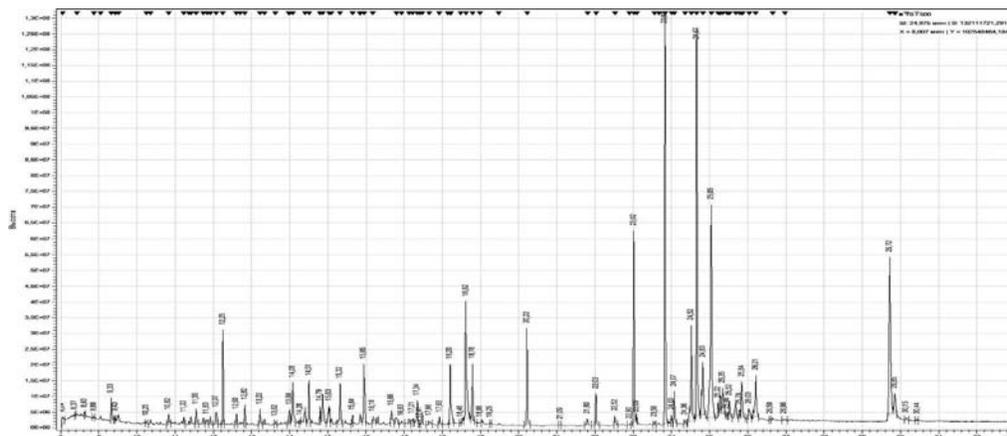


Рис. 7. Типичный вид хроматограммы ГХ-МС анализа экстракта мускусовой железы кабарги сибирской. В ГХ-МС анализе определено 93 соединения.

Определяемые компоненты сгруппированы нами по относительному уровню концентраций на мажорные (более 0,5 отн.%) и минорные (менее 0,5 отн.%) по вкладу площадей всех обнаруживаемых соединений в общий интегральный

пул по полному ионному току ГХ-МС хроматограмм.

Доля мажорных компонентов в составе экстрактов ткани достигает 90 отн. %, диаграмма соотношения которых приведена на рис. 8 и в табл. 3.

**Мажорные компоненты экстракта мускусовой железы**

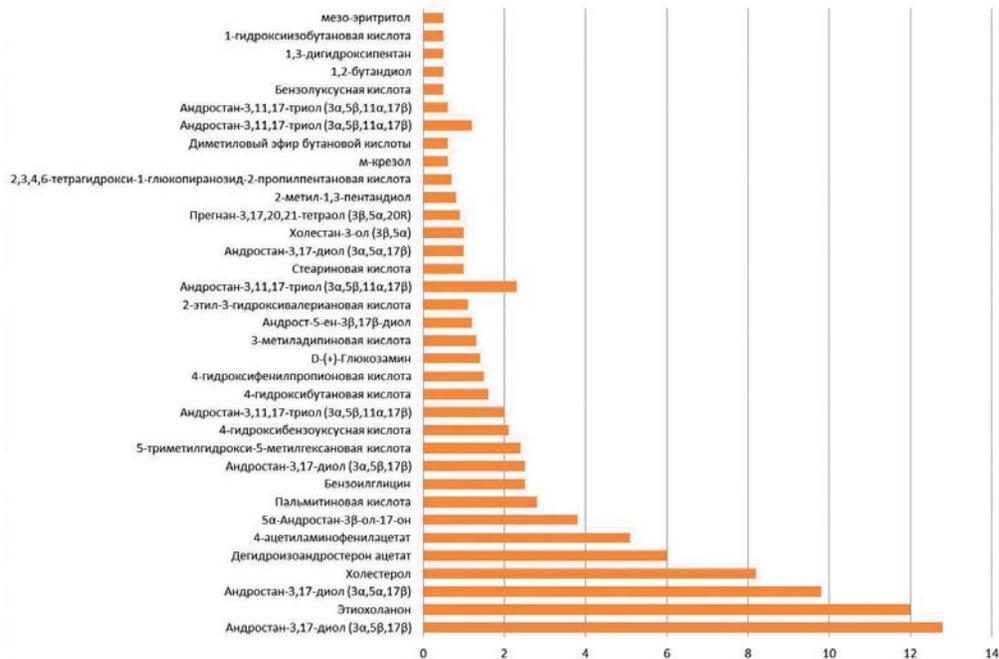


Рис. 8. Диаграмма относительного содержания (%) мажорных компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги.

Данные ГХ-МС анализа по содержанию и идентификации мажорных компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги сибирской (после дериватизации силилированием)

| № компонента | Содержание, отн. % | Наименование определяемого компонента в анализе ГХ-МС (ИЮПАК)                                 | Наименование определяемого компонента                                     |
|--------------|--------------------|---|---|
| 72           | 12,8               | Androstane-3,17-diol, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )-, 2TMS derivative                  | Андростан-3,17-диол (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )                  |
| 67           | 12,0               | Etiocholanone, TMS derivative   | Этиохоланон   |
| 74           | 9,8                | Androstane-3,17-diol, (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-, 2TMS derivative                 | Андростан-3,17-диол (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,17 $\beta$ )                 |
| 89           | 8,2                | Cholesterol, TMS derivative   | Холестерол  |
| 63           | 6,0                | Dehydroisoandrosterone acetate  | Дегидроизоандростерон ацетат  |
| 54           | 5,1                | Trimethylsilyl [4-(acetylamino)phenyl]acetate   | 4-ацетиламинофенилацетат  |
| 71           | 3,8                | 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ -ol-17-one, TMS derivative                                    | 5 $\alpha$ -Андростан-3 $\beta$ -ол-17-он                                 |
| 58           | 2,8                | Palmitic Acid, TMS derivative   | Пальмитиновая кислота   |
| 51           | 2,5                | Hippuric acid, TMS derivative   | Бензоилглицин   |
| 73           | 2,5                | Androstane-3,17-diol (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )-, 2TMS derivative                   | Андростан-3,17-диол (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )                  |
| 19           | 2,4                | 5-Trimethylsilyloxy-5-methylhexanoic acid, trimethylsilyl ester                               | 5-триметилгидроксис-5-метилгексановая кислота                             |
| 39           | 2,1                | 4-Hydroxybenzeneacetic acid, 2TMS derivative  | 4-гидроксibenзоуксусная кислота   |
| 86           | 2,0                | Androstane-3,11,17-triol, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-, 3TMS derivative | Андростан-3,11,17-триол (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ ) |
| 35           | 1,6                | 4-Hydroxybutanoic acid, 2TBDMS derivative   | 4-гидроксibутановая кислота   |
| 55           | 1,5                | 4-Hydroxyphenyllactic acid, 3TMS derivative   | 4-гидроксифенилпропионовая кислота  |
| 28           | 1,4                | D-(+)-Glucosamine, 4TMS derivative  | D-(+)-Глюкозамин  |
| 30           | 1,3                | 3-Methyladipic acid, 2TMS derivative  | 3-метиладипиновая кислота   |
| 83           | 1,2                | Androst-5-ene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, 2TMS derivative                                    | Андрост-5-ен-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диол                                  |
| 32           | 1,1                | 2-Ethyl-3-trimethylsilyloxy(trimethylsilyl) valerate  | 2-этил-3-гидроксивалериановая кислота                                     |
| 77           | 1,1                | Androstane-3,11,17-triol, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-, 3TMS derivative | Андростан-3,11,17-триол (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ ) |
| 60           | 1,0                | Stearic acid, TMS derivative  | Стеариновая кислота   |
| 69           | 1,0                | Androstane-3,17-diol, (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-, 2TMS derivative                 | Андростан-3,17-диол (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,17 $\beta$ )                 |
| 90           | 1,0                | Cholestan-3-ol, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-, TMS derivative                                     | Холестан-3-ол (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )                                    |
| 81           | 0,9                | Pregnane-3,17,20,21-tetrol, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,20R)-, 4TMS derivative                    | Прегнан-3,17,20,21-тетраол (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,20R)                   |
| 33           | 0,8                | 2-Methyl-1,3-pentanediol, 2TMS derivative   | 2-метил-1,3-пентандиол  |

| № компонента | Содержание, отн. % | Наименование определяемого компонента в анализе ГХ-МС (ИЮПАК)                                 | Наименование определяемого компонента                                     |
|--------------|--------------------|---|---|
| 45           | 0,7                | 2-Propylpentanoic acid, 2,3,4,6-tetra(trimethylsilyl)-1-glucopyranoside                       | 2,3,4,6-тетрагидрокси-1-глюкопиранозид-2-пропилпентановая кислота         |
| 5            | 0,6                | m-Cresol, TMS derivative  | м-крезол  |
| 18           | 0,6                | Butanoic acid, dimethyl(ethenyl)silyl ester   | Диметилловый эфир бутановой кислоты                                       |
| 80           | 0,6                | Androstane-3,11,17-triol, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-, 3TMS derivative | Андростан-3,11,17-триол (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ ) |
| 85           | 0,6                | Androstane-3,11,17-triol, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-, 3TMS derivative | Андростан-3,11,17-триол (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ ) |
| 14           | 0,5                | Benzeneacetic acid, TMS derivative  | Бензолуксусная кислота  |
| 22           | 0,5                | 1,2-Butanediol, 2TMS derivative   | 1,2-бутандиол   |
| 23           | 0,5                | 1,3-Bis(trimethylsilyloxy)pentane   | 1,3-дигидроксипентан  |
| 27           | 0,5                | $\alpha$ -Hydroxyisobutyric acid, 2TMS derivative   | 1-гидроксиизобутановая кислота  |
| 29           | 0,5                | meso-Erythritol, 4TMS derivative  | мезо-эритритол  |

Среди группы минорных компонентов, суммарно составляющих до 10 отн.%, нужно отметить установленное содержание ряда производных с широким спектром биологической активности, таких

как 4-меркаптобензойной кислоты, трифторацетата транс-дегидроандростерона, триметокси-12Н-бензоксипино-изохинолина, 3-цианохиноксалин оксида и некоторых др. (рис. 9, табл. 4).

### Минорные компоненты экстракта мускусовой железы



Рис. 9. Диаграмма относительного содержания (%) минорных компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги.

Данные ГХ-МС анализа по содержанию и идентификации минорных компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги сибирской (после дериватизации силилированием)

| № компонента | Содержание, отн. % | Наименование определяемого компонента в анализе ГХ-МС (ИЮПАК)  | Наименование определяемого компонента  |
|--------------|--------------------|--|--|
| 61           | 0,4                | trans-Dehydroandrosterone, trifluoroacetate  | Транс-дегидроандростерона трифторацетат  |
| 10           | 0,3                | Benzoic Acid, TMS derivative   | Бензойная кислота  |
| 20           | 0,3                | 2-Methylpentan-2-ol, trimethylsilyl ether  | 2-метилпентан-2-ол   |
| 37           | 0,3                | 4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative   | 4-гидроксibenзойная кислота  |
| 40           | 0,3                | 4-Mercaptobenzoic acid, 2TMS derivative  | 4-меркаптобензойная кислота  |
| 47           | 0,3                | 2,5-Dihydroxybenzoic acid, 3TMS derivative   | 2,5-дигидроксibenзойная кислота  |
| 49           | 0,3                | 6,9,10-Trimethoxy-12H-benz(6,7)oxepino(2,3,4-i,j)isoquinoline  | 6,9,10-триметокси-12Н-бенз(6,7)оксепино(2,3,4)изохинолин                               |
| 59           | 0,3                | Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative   | Олеиновая кислота  |
| 7            | 0,2                | 2-Hydroxy-3-methylbutyric acid, 2TMS derivative  | 2-гидрокси-3-метилбутановая кислота  |
| 15           | 0,2                | Butanedioic acid, 2TMS derivative  | Бутандиовая кислота  |
| 16           | 0,2                | 3-Cyanoquinoxaline 1-oxide   | 3-цианохиноксалин оксид-1  |
| 34           | 0,2                | 3-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative   | 3-гидроксibenзойная кислота  |
| 42           | 0,2                | Xylitol, 5TMS derivative   | Ксилитол   |
| 44           | 0,2                | 2-Cyclopentene-1-carboxylic acid, 1-(4-methyl-3-pentenyl)-2-[(trimethylsilyl)oxy]-, ethyl ester          | 1-(4-метил-3-пентенил)-2-гидрокси этиловый эфир 2-циклопентен-1-карбоксической кислоты |
| 48           | 0,2                | $\alpha$ -D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate | $\alpha$ -D-глюкопиранозид метил-2-ацетиламино-2-деокси-циклик метилборанат            |
| 68           | 0,2                | Androstane-3,17-diol, (3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )-, 2TMS derivative                              | Андростан-3,17-диол (3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )                                |
| 75           | 0,2                | 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ -ol-17-one, TMS derivative   | 5 $\alpha$ -Андростан-3 $\beta$ -ол-17-он  |

Несмотря на низкую представленность минорных компонентов, экспериментально найденных в ходе ГХ-МС анализа, присутствие подобных компонентов даже в микромолярных концентрациях способно значительно влиять на спектр биологической активности и их выраженность.

Молекулярные структуры некоторых классов активных минорных компонентов с предполагаемым наиболее выраженным спектром биологической активности представлены на рис. 10.

В составе препаратов сравнения (коммерческих образцов мускусовой железы кабарги) обнаружен менее выраженный

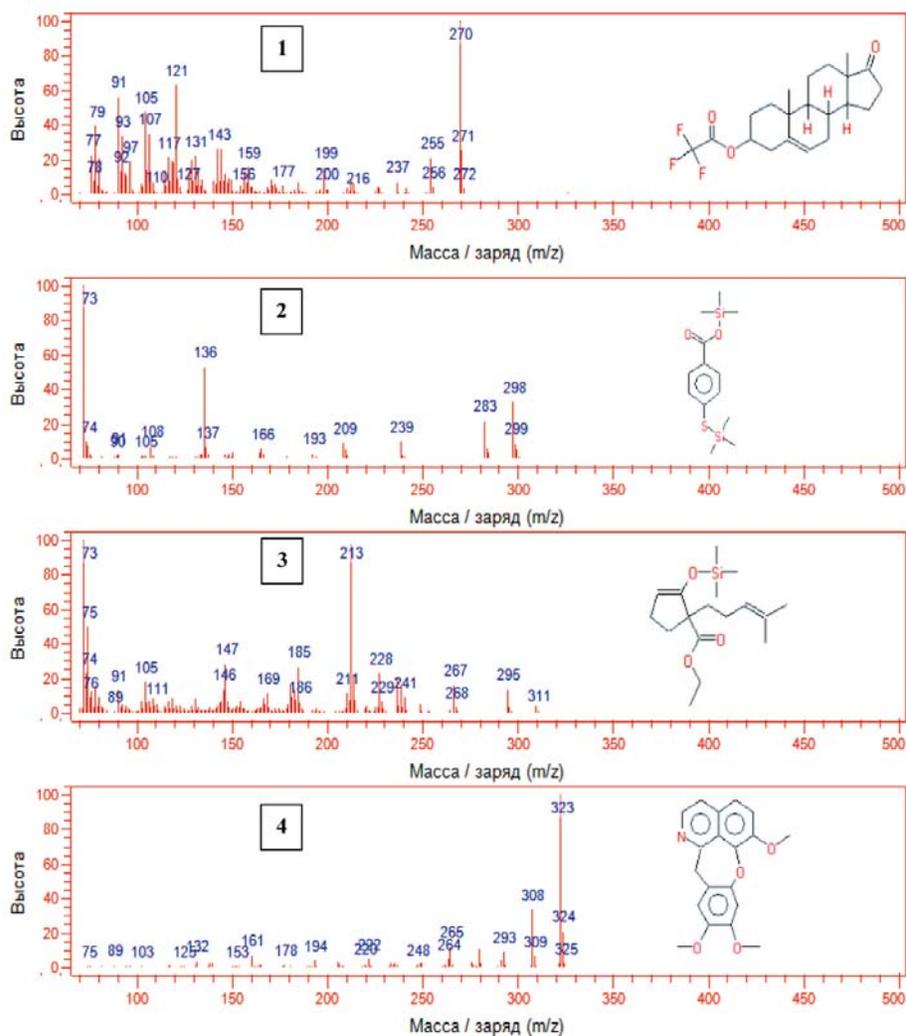


Рис. 10. Структурные формулы и ГХ-МС спектры дериватов минорных компонентов состава мускусовой железы кабарги сибирской.

Обозначения: **1** – Транс-дегидроандростерона трифторацетат; **2** – 4-меркаптобензойная кислота; **3** – 1-(4-метил-3-пентенил)-2-гидрокси этиловый эфир 2-циклопентен-1-карбоксой кислоты; **4** – 6,9,10-триметокси-12Н-бенз(6,7)оксеино(2,3,4)изохинолин. Источник: Library NIST14.

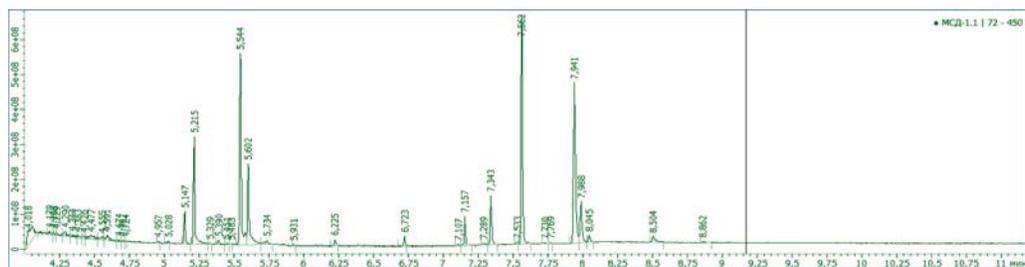


Рис. 11. Типичный вид хроматограммы ГХ-МС анализа экстракта мускусовой железы кабарги китайской. В ГХ-МС анализе определено 29 соединений.

и менее поликомпонентный профиль соединений. Так, в составе экстракта мускусовой железы кабарги китайской (Gold) в условиях экстракции, дериватизации и последующего ГХ-МС анализа обнаружено только 29 соединений (рис. 11).

Примечательно, что наряду с обнаруженными в составе обоих образцов срав-

нения мусконом (3-метилпентадеканон) и тоналидом (7-ацетил-6-этил-1,1,4,4-тетраметилтетралин) – душистыми представителями мусконподобного ряда – установлено полное отсутствие соединений андрогеновой группы стероидов (табл. 5).

Литературный поиск показывает, что наряду с характерным запахом компо-

Таблица 5  
Данные ГХ-МС анализа по содержанию и идентификации компонентов в экстракте мускусовой железы кабарги китайской (после дериватизации силилированием)

| № п/п | Наименование соединения  | Время, мин  | Площадь, %   |
|-------|--|-------------|--------------|
| 1.    | Dasycarpidan-1-methanol, acetate (ester)                                       | 4,02        | 0,11         |
| 2.    | Benzyl alcohol   | 4,39        | 0,06         |
| 3.    | Sorbic Acid  | 4,68        | 3,95         |
| 4.    | Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-  | 4,99        | 0,08         |
| 5.    | Benzoic acid   | 5,30        | 23,70        |
| 6.    | Hexanoic acid, 2-ethoxyethyl ester   | 5,62        | 0,17         |
| 7.    | Pentadecane  | 5,68        | 0,09         |
| 8.    | Thymol   | 5,73        | 0,11         |
| 10.   | Glucosamine, N-acetyl-N-benzoyl-   | 5,97        | 0,14         |
| 11.   | Dodecanal  | 6,12        | 0,13         |
| 12.   | Octanoic acid, 2-ethoxyethyl ester   | 6,27        | 0,26         |
| 13.   | Pentadecane  | 6,36        | 0,14         |
| 14.   | Diethyl Phthalate  | 6,63        | 0,33         |
| 15.   | 2-Ethoxyethyl nonanoate  | 6,77        | 0,17         |
| 16.   | Benzophenone   | 6,81        | 0,14         |
| 17.   | Heptacosane  | 6,89        | 0,17         |
| 18.   | 1,4-Bis(5-(4-bromophenyl)furyl)-1-butene                                       | 7,00        | 0,55         |
| 19.   | Benzyl Benzoate  | 7,10        | 1,40         |
| 20.   | Decanedioic acid, bis(2-ethoxyethyl) ester                                     | 7,20        | 0,64         |
| 21.   | <b>7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin (Tonalid)</b>                  | <b>7,30</b> | <b>1,91</b>  |
| 22.   | <b>Muscone</b>   | <b>7,35</b> | <b>42,07</b> |
| 23.   | n-Hexadecanoic acid  | 7,43        | 3,99         |
| 24.   | Stearic acid, 2-hydroxy-1-methylpropyl ester                                   | 7,62        | 1,08         |
| 25.   | Oleic Acid   | 7,82        | 1,78         |
| 26.   | Dasycarpidan-1-methanol, acetate (ester)                                       | 7,86        | 0,38         |
| 27.   | Stearic acid, 2-hydroxy-1-methylpropyl ester                                   | 8,05        | 8,26         |
| 28.   | 2-Butoxyethyl oleate   | 8,51        | 7,60         |
| 29.   | 11H-Dibenzoa,gquinolizin-11-one, 5,6,8,8a,9,10,13,13a-octahydro-2,3-dimethoxy- | 8,57        | 0,19         |

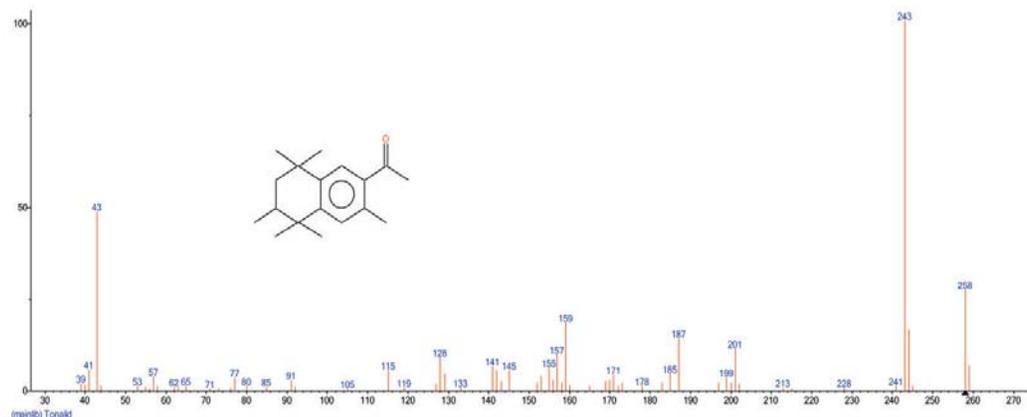


Рис. 12. Молекулярная структура и ГХ-МС спектр тоналида (7-ацетил-6-этил-1,1,4,4-тетраметилтетралин, CAS 1506-02-1). Источник: Library NIST14.

нент тоналид (7-ацетил-6-этил-1,1,4,4-тетраметилтетралин, рис. 12) обладает широким спектром андрогенной активности, проявляя подавляющее действие на ароматазу как ингибитор.

Анализ многокомпонентного профиля всех изученных образцов показал, что наибольшей информативностью обладает ГХ-МС после стадий пробо-

подготовки – экстракции этилацетатом, упаривания, концентрирования и дериватизации силилированием.

Нами предложено использовать группу андростероидов как маркерный показатель состава нативной ткани мускусовой железы кабарги в задачах фенотипирования, идентификации и входного контроля биологического сырья.

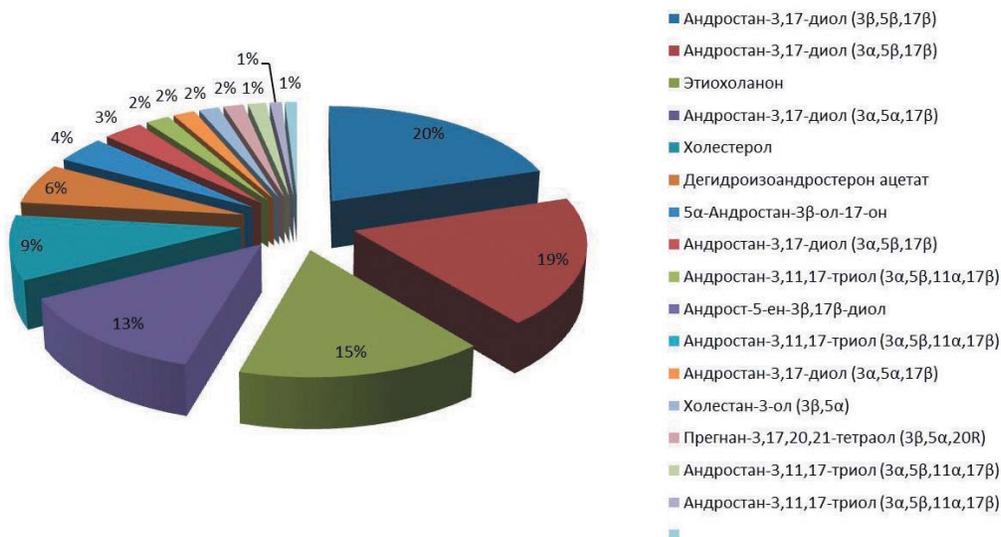
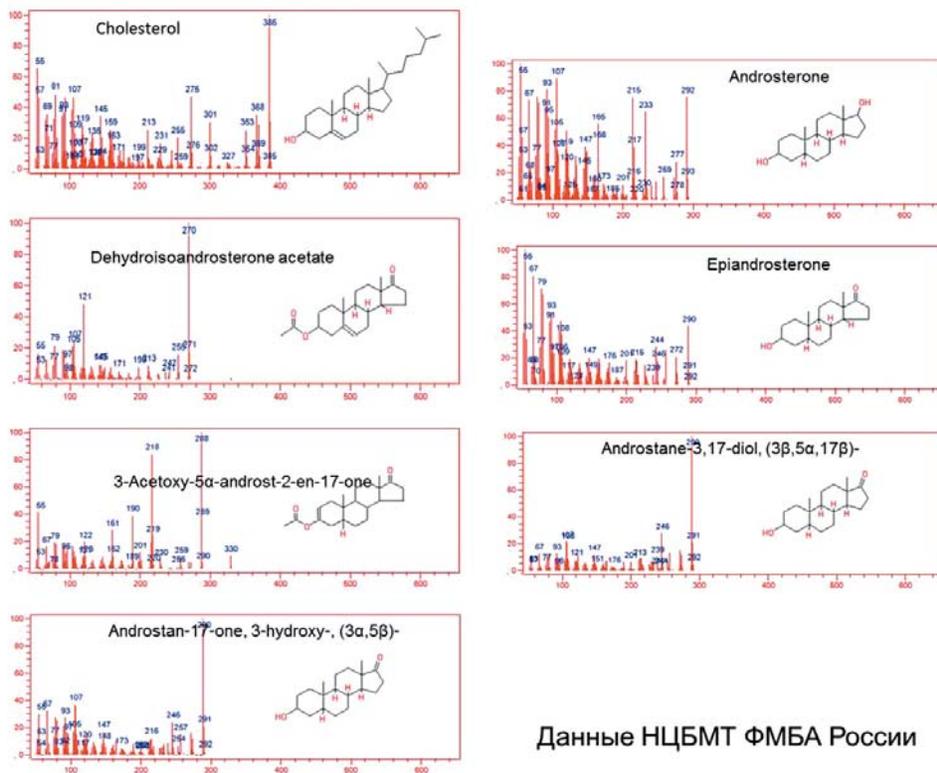


Рис. 13. Стероидный профиль и относительное соотношение стероидов в экстракте мускусовой железы кабарги сибирской.



Данные НЦБМТ ФМБА России

Рис. 14. Типичные соединения андростероидной группы, обнаруженные в составе экстракта мускусовой железы кабарги сибирской. Источник: Library NIST14.

Данный показатель может выступать критерием нормирования в разработке субстанции и лекарственных форм на основе мускусовой железы кабарги.

Выбранная группа стероидов и их предшественников представлена 16-тью соединениями, преимущественно содержащимися в экстрактах ткани мускусовой железы, каждый из которых в общем составе экстракта составляет более 0,5 отн. % (рис. 13, 14).

Структурные формулы наиболее типичных андростероидных производных, характерных для нативной ткани мускусовой железы кабарги сибирской, а также их предшественников, представлены на рис. 14.

## Выводы

1. В результате проведения ряда исследовательских работ по изучению состава мускусовой железы кабарги отработаны методы пробоподготовки с экстрагированием в среде различных растворителей, условия дериватизации метилированием и силилированием, позволяющие надёжно идентифицировать многокомпонентный состав мускусовой железы и проводить количественное определение. Обнаружены особенности биотрансформации мускона и мускон-подобных макроциклических кетонов в результате метаболизма и дециклизации.

2. В составе мускусовой железы кабарги сибирской нами идентифицирова-

но 93 компонента. Установлено, что отличительными особенностями состава мускусной железы кабарги является наличие широкого ряда андростероидов, жирных ненасыщенных и насыщенных кислот (и их эфиров), кетонов и альдегидов (мусконподобные производные, придающие мускусной железе специфический запах), ароматических производных и гетероциклического класса соединений (пиримидины, фураны).

3. Предложено использовать группу андростероидов как маркерный показатель состава нативной ткани мускусной железы кабарги в задачах фенотипирования, идентификации и входного контроля биологического сырья. Данный показатель может выступать критерием нормирования в разработке субстанции и лекарственных форм на основе мускусной железы кабарги.

4. На основе результатов выполненной работы могут решаться задачи стандартизации (в т.ч. – биологической) природного сырья, разработки технологии получения эффективных лекарственных форм препаратов и методов контроля их качества. Многие из обнаруженных производных андростеронов, представленные как в группе мажорных, так и минорных компонентов состава, могут быть использованы для определения в биосредах фармакокинетических свойств субстанций и лекарственных форм на основе мускусной железы кабарги на доклинических и клинических стадиях с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

5. Известные из литературы по народной и региональной медицине данные о широком спектре биологической активности связаны с многокомпонентным и разнообразным по классам

соединений составом. Так, составные компоненты м-крезол и фурановые производные оказывают антисептическое и антибактериальное действие. Пиримидиновые производные проявляют иммуностимулирующее и гемостимулирующее действие при ряде инфекционных заболеваний, вялом заживлении ран (регенерационное действие), нарушениях кроветворения (противоанемическое действие). Кроме того, пиримидины являются антимикотиками широкого спектра действия. Производные бензойной кислоты в числе мажорных и минорных компонентов (4-гидроксibenзоуксусная кислота, 4-меркаптобензойная кислота) эффективны при кожных заболеваниях как наружные антисептические (противомикробное действие) и фунгицидные (противогрибковое) средства, а также при трихофитиях и микозах.

6. Обнаруженные жирные кислоты и их производные активно участвуют в обмене веществ у млекопитающих, формируя следующие полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК): пальмитолеиновая, олеиновая, линоленовая, арахидоновая (АК) и эйкозапентаеновая. В тканях мускусной железы определены и др. полиеновые жирные кислоты ( $C_{20}$ ,  $C_{22}$ ,  $C_{24}$ ), образующиеся из линолевой и линоленовой кислот путем удлинения углеродной цепи. В клетках и тканях мускусной железы ПНЖК встречаются не в свободном состоянии, а в составе липидов различных классов: триглицеридов, фосфолипидов, кардиолипина, сфинголипидов, эфиров стеролов и жирных кислот (например, эфиры холестерина, восков). Линолевая (18:2) и  $\alpha$ -линоленовая (18:3) ПНЖК являются незаменимыми, или эссенциальными, для человека и должны поступать в

организм с пищей. Именно эти ПНЖК являются предшественниками двух больших семейств длинноцепочечных ПНЖК (ДЦПНЖК) [ $\omega$ -6 (линолевая) и  $\omega$ -3 ( $\alpha$ -линоленовая кислота)], выполняющих в организме очень важные функции, – пластическую и регуляторную [8]. Такие важнейшие ПНЖК, как линолевая,  $\alpha$ -линоленовая и АК, называют витамином F. Биологические эффекты, оказываемые  $\omega$ -3 ПНЖК, реализуются на клеточном и органном уровнях. Являясь структурным компонентом биологических мембран клеток,  $\omega$ -3 ПНЖК оказывают непосредственное влияние на текучесть липидного биослоя, проницаемость мембран; мембраносвязанную ферментную активность; функционирование мембранных рецепторов и распознавание антигенов, а также электрофизиологические свойства мембран. Таким образом, ПНЖК оказывают регулирующее влияние на электрофизиологические свойства биомембран и функции мембранных белков, что имеет особое значение в тканях, обладающих высокой электрофизиологической активностью (ткани мозга, сетчатка глаза), и имеют выраженный биологический эффект в состояниях хронического утомления, астении, последствиях черепно-мозговых травм, нарушений мозгового кровообращения. Регулирующее влияние на организм ДЦПНЖК оказывают благодаря тому, что являются предшественниками эйкозаноидов. К ним относятся простаиноиды (простагландины, простациклины, тромбоксаны) и лейкотриены. Эйкозаноиды являются окисленными производными ПНЖК – эйкозатриеновой, АК и эйкозапентаеновой. Биологические эффекты производных ПНЖК  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 типов в большинстве своем противоположные,

поскольку  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ПНЖК в организме метаболизируются в эйкозаноиды с участием одних и тех же ферментов, эти процессы идут параллельно и взаимоконкурентно. Правильное соотношение между  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 в пище важно для поддержания баланса гормональных, обменных, клеточных и др. процессов.

7. Широкий спектр обнаруженных мажорных и минорных производных андростероидов определяет биологические эффекты в процессах сперматогенеза и полового поведения, а также оказывает влияние на азотистый и фосфорный обмен. Биологическое действие андростероидов наиболее специфично проявляется в тканях-мишенях, где происходит его избирательное накопление: в клетках семенных канальцев, придатке яичка, предстательной железе, семенных пузырьках, гипоталамусе, матке, овариальных фолликулах. Синтез и секреция тестостерона зависит от андростероидов-предшественников и регулируются лютеинизирующим и фолликулостимулирующими гормонами гипофиза. При этом биологически активной формой тестостерона в организме млекопитающих является дигидротестостерон, широко представленный в составе мускусной железы кабарги. Спектр биологических эффектов андростероидной группы производных широко представлен: нейропротекторное, ноотропное, психознергизирующее действие, активность в онкологических заболеваниях (иммунный контроль над опухолевым ростом, повышение эффективности и переносимости лучевой и химиотерапии опухолей), токолитическое воздействие, ингибирующее действие на ароматазную активность, а также стимулирующее действие в процессах репродукции.

## Список литературы

1. Кабарга: Энциклопедический словарь Брокгауза и Эфрона. – СПб, 1890-1907 гг., 86 томов. DVD-версия. ИДДК ООО «Дистрибьютор», 2010.
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В. Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Люблинский С.Л. Очерки спортивной медицины. Т. 3. Векторы фармакорегуляции. – М., СПб: Айсинг, 2014. – 356 с.
3. Приходько В.И. Кабарга. Происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация. – М.: Геос, 2003. – 443 с.
4. Уйба В.В., Котенко К.В., Корчажкина Н.Б., Петрова Н.Б., Михайлова А.А. Применение мускуса кабарги в клинической практике: метод. реком. – М., 2013. – 18 с.
5. Штолько В.Н., Золотова Н.Ф., Приходько В.И. Антиокислительная активность мускуса кабарги // Мат-лы конф. «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», Смоленск, 2007. – С. 138-140.
6. Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E. Study on the components of musk. I. Ether soluble components // Chem. Pharm. Bull. – 1975. – Vol. 23. – No. 3. – Pp. 629-635.
7. Eisner T., Grant R. Toxicity odor aversion, and “olfactory aposematism” // Science. – 1981. – No. 213. – Pp. 476-478.
8. Lauritzen L., Hansen H., Jorgensen M., Michaelsen K. The essentiality of long chain  $\omega$ -3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina // Progress in lipid research. – 2001. – No. 40. – Pp. 1-94.
9. Li D., Chen B., Zhang L. The musk chemical composition and microbiota of Chinese forest musk deer males // Scientific Report. – 2016.
10. Morichita S., Mishima Y., Shoji M. Pharmacological properties of musk // Gen. Pharmacol. – 1987. – Vol. 18. – No. 3. – Pp. 253-261.
11. Ruzicka L. Carbon rings VII: Constitution of muscone // Helv. Chim. Acta. – 1926. – Vol. 9. – 715 p.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prichodko V.I., Zinkevich E.P. Musk Deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of Main Lipid Components from Preputial Gland Secretion // J. of Chemical Ecology. – 1987. – Vol. 13. – No. 1. – Pp. 71-83.
13. Thevis M., Schänzer W., Geyer H., et al. Traditional Chinese medicine and sports drug testing: identification of natural steroid administration in doping control urine samples resulting from musk (pod) extracts // Br. J. Sports Med. Published Online First. 2012. doi: 10.1136/bjsports-2012-090988.
14. Wang J.L., Huang H.M. The taxonomy and status of forest musk deer in China // Chem. Abstr. – 1980. – Vol. 180. – Pp. 102-110.
15. Yu D., Das B.C. Structure of hydroxymuscopiperidine A and hydroxymuscopiperidine B, two new constituents of musk // Planta med. – 1983. – Vol. 49. – No. 3. – Pp. 183-184.

## References

1. Kabarga: Entsiklopedicheskiy slovar' Brokgauza i Efrona [Kabarga. Encyclopedic Dictionary of Brockhaus and Efron]. Saint-Petersburg, 1890-1907. 86 volumes. DVD-version. IDDK ООО «Distrib'yutor», 2010. (In Russian).
2. Karkischenko N.N., Uyba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kotenko K.V., Lyublinskiy S.L. Ocherki sportivnoy meditsiny. T. 3. Vektory farmakoregulirovaniya [Sketches of sports medicine. V. 3. Vectors of pharmaco-regulation]. Moscow, Saint-Petersburg: Aysing, 2014. 356 p. (In Russian).
3. Prikhod'ko V.I. Kabarga. Proiskhozhdeniye, sistematika, ekologiya, povedeniye i kommunikatsiya [The musk deer. Origin, systematics, ecology, behavior and communication]. Moscow: Geos, 2003. 443 p. (In Russian).
4. Uyba V.V., Kotenko K.V., Korchazhkina N.B., Petrova N.B., Mikhaylova A.A. Primeneniye muskusa kabargi v klinicheskoy praktike: metod. rekom. [The use of musk musk deer in clinical practice: methodical recommendations]. Moscow, 2013. 18 p. (In Russian).
5. Shtol'ko V.N., Zolotova N.F., Prikhod'ko V.I. Antiokislitel'naya aktivnost' muskusa kabargi [Antioxidative activity of musk of musk deer]. Mat-ly konf. «Aktivnyye formy kisloroda, oksid azota, antioksidanty i zdorov'ye cheloveka» [Proceedings of the conference “Active forms of oxygen, nitrogen oxide, antioxidants and human health”]. Smolensk, 2007. Pp. 138-140. (In Russian).
6. Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E. Study on the components of musk. I. Ether soluble components. Chem. Pharm. Bull. 1975. Vol. 23. No. 3. Pp. 629-635.
7. Eisner T., Grant R. Toxicity odor aversion, and “olfactory aposematism”. Science. 1981. No. 213. Pp. 476-478.

8. Lauritzen L., Hansen H., Jorgensen M., Michaelsen K. The essentiality of long chain  $\omega$ -3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina». Progress in lipid research. 2001. No. 40. Pp. 1-94.
9. Li D., Chen B., Zhang L. The musk chemical composition and microbiota of Chinese forest musk deer males. Scientific Report. 2016.
10. Morichita S., Mishima Y., Shoji M. Pharmacological properties of musk. Gen. Pharmacol. 1987. Vol. 18. No. 3. Pp. 253-261.
11. Ruzicka L. Carbon rings VII: Constitution of muscone. Helv. Chim. Acta. 1926. Vol. 9. 715 p.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prichodko V.I., Zinkevich E.P. Musk Deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of Main Lipid Components from Preputial Gland Secretion. J. of Chemical Ecology. 1987. Vol. 13. No. 1. Pp. 71-83.
13. Thevis M., Schänzer W., Geyer H., et al. Traditional Chinese medicine and sports drug testing: identification of natural steroid administration in doping control urine samples resulting from musk (pod) extracts. Br. J. Sports Med. Published Online First. 2012. doi: 10.1136/bjsports-2012-090988.
14. Wang J.L., Huang H.M. The taxonomy and status of forest musk deer in China. Chem. Abstr. 1980. Vol. 180. Pp. 102-110.
15. Yu D., Das B.C. Structure of hydroxymuscopiperidine A and hydroxymuscopiperidine B, two new constituents of musk. Planta med. 1983. Vol. 49. No. 3. Pp. 183-184.

## Analysis of biologically active musk compounds of musk deer (*Moschus moschiferus*) by gas chromatography with mass selective detector

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

The study of the composition of biologically active musk components of musk deer in integrated sample preparation and subsequent determination of composition was made by GC-MS with the use of derivatization by silylation and methylation. Optimal extraction conditions, chromatographic separation and relative quantification of the main components were found. The results of identification and determination of the content of the most significant (major and minor) components in the gland tissue in accordance with the NIST library 2014 and the algorithm of relative normalization are presented in detail. Mechanisms for the transformation of macrocyclic components (muscon, exaltone), associated with the fragrant properties of the musk gland of musk deer, are proposed. Possible links between the components of the drug on the basis of the gland with a biological effect are described. According to the research results the conclusions about the multicomponent nature of the composition of the gland proposed marker ingredients in the musk gland and the possible relationship of the discovered components of the composition with the biological effects.

**Key words:** musk deer (*Moschus moschiferus*), musk, tissue, gas chromatography, mass spectrometry, derivatization, androsterones.

## Источники сырья новой биоактивной добавки к пище для коррекции эректильной дисфункции

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, С.Л. Люблинский, М.Т. Гасанов,  
Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин

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

Контактная информация: д.б.н. Капанадзе Гия Джемалиевич, [giyak@yandex.ru](mailto:giyak@yandex.ru)

В работе дается описание природных материалов, на основе которых возможно создание новой эффективной биоактивной добавки к пище для коррекции эректильной дисфункции. В ФГБУН НЦБМТ ФМБА России получены активные субстанции из мускуса кабарги, экстракта виноградных косточек, красного корня, биоматериалов пятнистого оленя. Начаты доклинические исследования их эффективности, безопасности, фармакокинетики и подбора доз. Завершаются работы по выбору наиболее экономически эффективной технологии выделения активных компонентов из природного сырья для разработки опытно-промышленного регламента. На основе полученных активных субстанций планируется создание новой биоактивной добавки к пище для коррекции эректильной дисфункции.

**Ключевые слова:** эректильная дисфункция, биоактивная добавка к пище, природный материал, мускус кабарги, экстракт виноградных косточек, красный корень, биоматериалы пятнистого оленя.

### Введение

Эректильная дисфункция (ЭД) – затруднения в достижении или сохранении достаточной ригидности полового члена, а также сокращение продолжительности эрекции на протяжении всего полового акта или на любом из его этапов. Данное патологическое состояние встречается у каждого второго мужчины в возрасте старше 40-ка лет и отрицательно сказывается на качестве его жизни [2-4].

В патогенезе возникновения и прогрессирования ЭД можно выделить три группы факторов: психологические (частые психоэмоциональные перегрузки, стресс, депрессия), соматические (сахарный диабет, ожирение, заболевания сердечно-сосудистой системы и др.) и ятрогенные (прием лекарственных препаратов:  $\beta$ -адренобло-

каторов, цитостатиков и др., а также проведение некоторых оперативных вмешательств) [5-15].

Существенный прогресс в терапии ЭД был достигнут в конце 90-х гг. прошлого века, когда на фармацевтическом рынке появился первый представитель группы ингибиторов фосфодиэстеразы 5-го типа (ФДЭ-5) – силденафил. В настоящее время в РФ также зарегистрированы и др. препараты, относящиеся к этой группе: варденафил, тадалафил и уденафил. Данные лекарственные средства показали свою высокую эффективность у большинства пациентов, независимо от причины возникновения ЭД, возраста, сопутствующих заболеваний и т.д. [2, 16, 17]. Однако в подавляющем числе случаев эти препараты используются разово – что называется, «по требованию». Это обусловлено целым

рядом причин, главными из которых являются их высокая стоимость, несовместимость при одновременном приеме с др. лекарственными средствами и возможные побочные эффекты [17].

Удачным решением вышеуказанных проблем являются биологически активные добавки (БАД) к пище на основе сырья растительного и животного происхождения, достаточно широко представленные на отечественном рынке [18]. Но в ходе анализа было установлено, что эффективность подавляющего большинства БАД значительно уступает ингибиторам ФДЭ-5, а стоимость действительно активных добавок не уступает таковой данных лекарственных средств.

Таким образом, поиск новых отечественных источников сырья растительного и животного происхождения в качестве компонентов БАД для коррекции ЭД является актуальной задачей, стоящей перед отечественным здравоохранением, а ее успешное решение позволит существенно повысить качество

жизни мужчин трудоспособного возраста, что и послужило **целью** настоящего исследования.

### Материалы и методы

**Мускус кабарги** представляет собой секрет препуциальной железы самцов кабарги. Состав экстракта мускусовой железы кабарги многообразен и представлен широким перечнем соединений (рис. 1).

По общности химического строения в нем можно обозначить 17 основных групп (табл. 1) [1].

Многокомпонентный профиль химических соединений, представленных в экстракте мускусовой железы кабарги (ЭМЖК), определяет его значительную фармакологическую активность. При этом из данного обширного перечня можно выделить доминирующие эффекты ЭМЖК, основываясь на процентном содержании веществ, их обеславливающих.

Т.к. основными представителями ЭМЖК являются соединения андросте-



Рис. 1. Общий вид ткани и экстракта мускусовой железы кабарги.

## Группы соединений, идентифицированные в экстракте мускусовой железы кабарги сибирской (после дериватизации силилированием)

| № п/п | Группа                               | Типичные представители   |
|-------|--------------------------------------|--|
| 1.    | Производные жирных кислот            | Октадеканойдная, гексадеканойдная, тетракозаноидная, докозаноидная, гептакозаноидная, нонадеканойдная кислота и их эфиры |
| 2.    | Андростероны                         | Дегидроизоандростерона ацетат  |
| 3.    | Ненасыщенные углеводороды (воска)    | Докасен, нонадецен, метилноадиен   |
| 4.    | Стеролы (холестеролы)                | Холестерол, холестанон, холестаен, холестаенол   |
| 5.    | Кетоны и альдегиды (мускон-подобные) | Эфиры бензальдегида, фуранона  |
| 6.    | Эйкозаноиды и простаноиды            | Арахидоновая кислота, эфиры эйкозаноидной кислоты  |
| 7.    | Циклические производные              | Производные циклопентанона, циклотетрадекана   |
| 8.    | Спирты многоатомные                  | Пентанол, гептадеканол, нонадеканон, эритритол   |
| 9.    | Эпокси-производные жирных кислот     | Производные оксирана   |
| 10.   | Пирролидины                          | Пирролифен   |
| 11.   | Фумаровые эфиры жирных кислот        | Фумаровая кислота, 2-хлорпропилтридециловый эфир   |
| 12.   | Эстрогенные фитостеролы              | 17-Пентатриаконтен   |
| 13.   | Пиримидиновые эфиры                  | 5-(1,3-бутадиенил)-5-этил-гексагидропиримидин-2,4,6-трион  |
| 14.   | Фенольные производные                | 3,5-дигидроксibenзойная кислота и её эфиры   |
| 15.   | Фенотиазиновые производные           | 6-гидроксibenзо(а)фенотиазин-5-он  |
| 16.   | Белки и пептиды                      | Структура не установлена (не идентифицированы)   |
| 17.   | Макро- и микроэлементы               | Медь, железо, йод и др.  |

роидной группы, преобладающими эффектами данной природной композиции будут андрогенный и анаболический, вызванные прямым активирующим воздействием этих соединений на ядерные стероидные рецепторы, локализованные в клетках органов-мишеней: половые органы, скелетная мускулатура, костная и жировая ткани и др.

Проявлениями данных эффектов являются восстановление и/или повы-

шение либидо, улучшение эректильной функции и половой активности, активация сперматогенеза, увеличение мышечной массы и, как следствие, повышение выносливости и работоспособности. Происходит кальцификация костей и уменьшение количества жировой ткани, а также ускорение репаративных процессов в организме человека.

Ранее нами были изучены различные образцы мускуса кабарги китайского

происхождения. В большинстве случаев выявлены грубые фальсификаты неизвестного животного происхождения со значительным добавлением активных синтетических компонентов[1].

Согласно имеющимся литературным данным, мускон – основной компонент китайского мускуса, являющийся главным критерием качества сырья по количеству содержанию.

Мускусный запах секрету препуциальной железы придает смесь летучих компонентов, одним из которых является макроциклический кетон мускон (3-метилпентадеканон), содержание которого широко варьирует в зависимости от подвиговой классификации, ареала обитания и сезонности. Так, у животных из географически удаленных популяций (Китай, Непал) его процентное отношение к весу исследуемого экстракта может варьировать от 0,5% до 22,6%. В образцах из др. мест обитания кабарги мускон не обнаружен.

В ходе проведенных исследований мускуса китайской кабарги установлено, что мускон является его неактивным и интактным компонентом. Таким образом, наличие мускона в мускусе кабарги не может быть маркерным признаком качества сырья для фармацевтических целей.

В настоящее время в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России разработано несколько различных технологий получения активных субстанций мускуса кабарги. Проведены доклинические исследования их эффективности, безопасности, фармакокинетики и подбора доз. Завершаются работы по выбору наиболее экономически эффективной технологии выделения активных компонентов из сырья мускуса кабарги для разработки опытно-промышленного регламента.

**Экстракт виноградных косточек** представляет собой поликомпонентную субстанцию, одной из важнейших составляющих которой является ресвератрол (рис. 2).

Ресвератрол – природный фитоалексин, синтезируемый в растениях при участии фермента ревератрол-синтазы, обладающий фитонцидным действием.

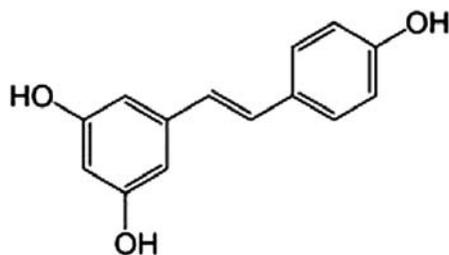


Рис. 2. Структурная формула Ресвератрола.

Механизм действия складывается из нескольких компонентов:

1. Повышает концентрацию эндогенного тестостерона, блокируя фермент ароматазу, преобразующий тестостерон в эстрадиол, а также конкурирует с последним за его рецепторы в клетках органов-мишеней.

2. В 2012 г. установлена способность ресвератрола блокировать различные подтипы фермента фосфодиэстеразы, что сопровождается накоплением в клетке циклического АМФ и проявляется ускорением процессов окисления жирных кислот, усилением митохондриального дыхания и активацией процессов глюконеогенеза.

3. Более чем в 10 раз повышает активность фермента супероксиддисмутазы – одного из ключевых ферментов антиоксидантной системы организма.

4. Экспрессия гена ситруина, приводящая к увеличению количества рибосом и митохондрий в клетках и, как следствие, к возрастанию анаболических процессов и увеличению синтеза макроэргов.

5. Ресвератрол непосредственно действует на фибробласты миокарда и ингибирует их активность, подавляя прогрессирование кардиосклероза.

6. Ресвератрол предупреждает повреждение и апоптоз нейронов, т.е. оказывает нейропротекторное действие, что может стать обоснованием его использования при нейродегенеративных заболеваниях – например, болезни Альцгеймера и др.

7. В настоящее время ведется активное изучение онкопротекторных свойств ресвератрола.

В ходе исследований подтверждена антиароматазная активность ресвератрола. Сочетанное применение ресвератрола с активными компонентами мускуса кабарги позволит значительно снизить возможные побочные действия мускуса кабарги при курсовом применении. Также комбинации с ресвератролом эффективно снижают терапевтические дозы активных компонентов мускуса

кабарги, что одновременно уменьшает стоимость конечных лекарственных препаратов.

В настоящее время в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России получен ресвератрол из экстракта виноградных косточек. Ведутся НИР по подбору эффективных терапевтических доз.

#### **Красный корень (*Hedysarum alpinum L.*)**

Красный корень (или Копеечник альпийский, или Копеечник сибирский) относится к роду Копеечник (*Hedysarum*), семейство Бобовые. Род содержит свыше 150-ти видов растений, произрастающих в основном в прохладных географических районах. На территории РФ насчитывается 126 видов этого рода. Все они – травянистые многолетние растения со стержневым деревянистым корнем. На Дальнем Востоке встречается 8 видов, в Западной Сибири – 13 видов, на Алтае – 8 видов, на склонах Южного Урала – 2 вида, на Сахалине и Курилах – 1 вид – *Hedysarumsachalinense*.

По данным фитохимического скрининга состава красного корня, основными его компонентами являются танины, флавоноиды, алкалоиды, ксантоны и оксикоричные кислоты (табл. 2).

Таблица 2  
Группы химических соединений, входящих в состав *Hedysarum alpinum L.*

| Танины<br>(дубильные<br>вещества)                               | Флавоноиды                                    | Алкалоиды | Ксантоны                     | Оксикоричные<br>кислоты  |
|---|---|-----------|------------------------------|--|
| галловая кислота,<br>эпигаллокатехин,<br>катехин,<br>эпикатехин | дандзин,<br>гиперозид,<br>рутин,<br>кверцетин | цитизин   | мангиферин,<br>изомангиферин | цикоревая кислота,<br>кофейная кислота,<br>хлорогеновая кислота,<br>неохлорогеновая<br>кислота |

Некоторые активные компоненты, обладающие биологической активностью, ранее не описанные в литературе и статье, приведены на рис. 3-5.

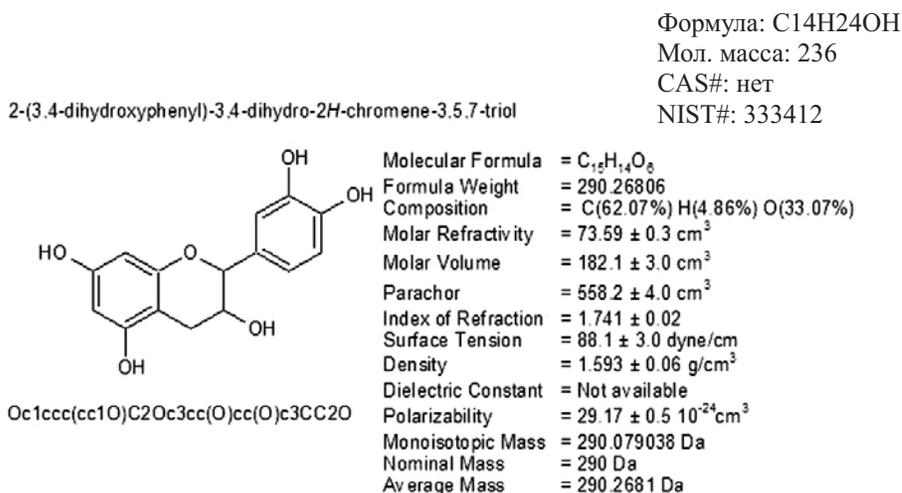


Рис. 3. Структурная формула и физико-химические свойства 2-(3,4-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-2H-хромен-3,5,7-триола.

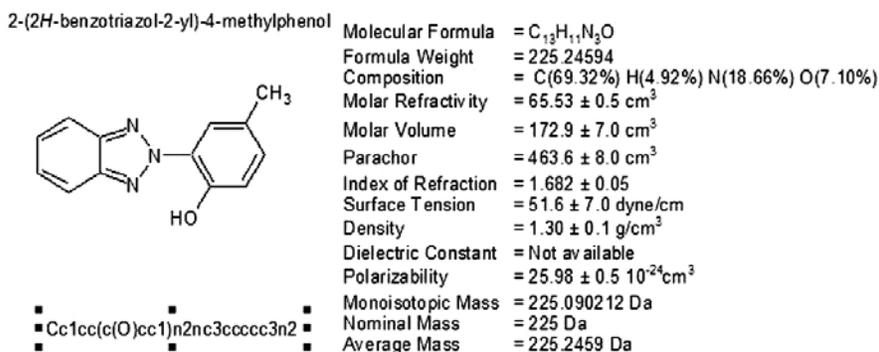


Рис. 4. Структурная формула и физико-химические свойства 2-(2H-бензотриазол-2-ил)-4-метилфенола.

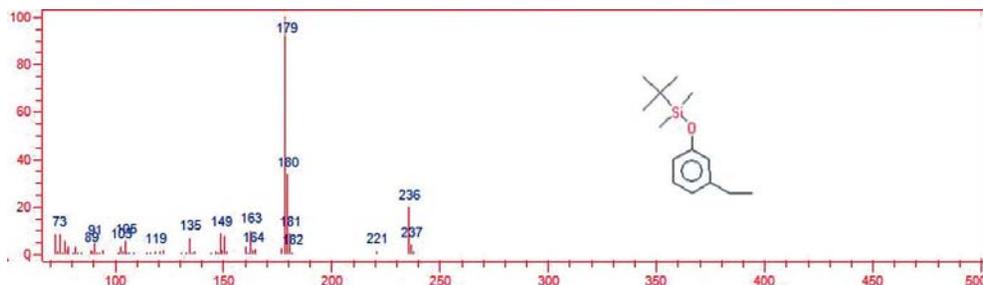


Рис. 5. Структурная формула и хроматограмма 3-этилфенола.

Данные соединения представляют наибольший интерес, т.к. в результате НИР, проведенной в НЦБМТ ФМБА России в 2017 г., установлена их способность ингибировать  $5\beta$ -редуктазу. Данный фермент катализирует переход тестостерона в андростерон (в сравнении с тестостероном обладает 68% от его первоначальной андрогенной активности) и этиохоланолон (вообще не обладает андрогенной активностью).

Таким образом, после применения экстракта красного корня происходит увеличение концентрации эндогенного тестостерона. Наряду с повышением содержания андрогенов, под действием экстракта красного корня происходит расширение сосудов малого таза, сопровождающееся улучшением эректильной функции.

Экстракт красного корня оказывает актопротекторный эффект, проявляющийся повышением работоспособности и ускорением процессов восстановления после интенсивных физических нагрузок.

Также экстракт красного корня оказывает противовоспалительное и антиэкссудативное действия, обладает иммуномодулирующим, спазмолитическим, антиоксидантным, мочегонным и вазопротекторным эффектами.

В РФ красный корень зарегистрирован как БАД, показаниями к применению которой являются острый и хронический простатит, уретрит у мужчин и женщин, аденома предстательной железы, импотенция, туберкулез, бронхит, бронхиальная астма, плеврит, пневмония, мастопатия и новообразования молочной железы, цистит, пиелонефрит, нефрит, анемия, эпилепсия, головные боли, герпес, меноррагии.

В настоящее время в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России разработана уникальная по своей концентрации и эффективности активная субстанция экстракта красного корня. Ее эффективная терапевтическая доза для человека составляет 50 мг/сут, что подтверждено доклиническими исследованиями, данными фармакокинетики и безопасности.

#### **Биоматериалы пятнистого оленя**

В народной медицине стран Восточной Азии неокостеневшие рога (панты) пятнистого оленя используются более двух тысяч лет. Как в чистом виде, так и в сочетании с др. лечебными средствами их широко применяли при анемии, истощении, общем ослаблении организма после инфекционных заболеваний, недостаточности сердечно-сосудистой системы, медленном заживлении ран, для восстановления функции половых органов и т.д.

Среди активных компонентов основы пантов и др. биоматериалов пятнистого оленя можно выделить следующие группы:

- 1) биологически активные пептиды и белки;
- 2) полисахариды;
- 3) жирные кислоты с незначительным содержанием фосфолипидов и свободных жирных кислот – главным образом, олеиновой, вакценовой и пальмитиновой;
- 4) глюкозаминогликаны: сульфат хондроитина, коллаген и гиалуроновая кислота;
- 5) группа производных холестерина;
- 6) андростероидная группа: тестостерон, дегидроэпиандростерон, прогестерон и эстрадиол;
- 7) макро- и микроэлементы: кальций, фосфор, натрий, калий, магний, железо, цинк, марганец, медь, кальций.

В странах Востока используют не только растущие рога, но и окостеневшие. В китайской медицине вообще все части тела пятнистого оленя считаются лекарственными: зубы, кости, мозг, кровь, мясо, кожа, сухожилия, желчь и т.д. Растертые высушенные сухожилия (по 5-8 г на прием) в виде отвара в сочетании с др. средствами китайские врачи назначали при истощении и слабости. Восточные лекарства из растущих рогов оленей с успехом используются в наши дни. Однако признание этих эффективных лекарственных средств научной медициной произошло не сразу.

С древних времен считается, что биоматериалы пятнистых оленей являются действенным средством против различных функциональных расстройств половой системы у мужчин и женщин.

В ходе исследования препаратов, приготовленных с использованием биологического сырья оленей, российскими учеными были установлены следующие свойства данных средств:

- повышение репродуктивной и эректильной функций;
- устранение расстройств, связанных с климактерическим синдромом у женщин;
- повышение тонуса и двигательной функции желудочно-кишечного тракта;
- улучшение обмена веществ, активизация выделительной функции почек;
- кардиопротекторное действие;
- ускорение процессов регенерации поврежденных тканей;
- повышение общего тонуса организма и стресспротекторный эффект;
- нормализация артериального давления.

В настоящее время в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России получено заморожен-

ное сырье пантов и половых органов самцов пятнистого оленя. Разработан проектный регламент технологической экстракции активных компонентов из биоматериалов пятнистого оленя. Получение первых экспериментальных партий экстрактов для изучения ожидается в ближайшее время.

### **Заключение**

В ФГБУН НЦБМТ ФМБА России получены активные субстанции из мускуса кабарги, экстракта виноградных косточек, красного корня, биоматериалов пятнистого оленя. Начаты доклинические исследования их эффективности, безопасности, фармакокинетики и подбора доз. Завершаются работы по выбору наиболее экономически эффективной технологии выделения активных компонентов из природного сырья для разработки опытно-промышленного регламента.

Доказано, что в мускусе кабарги значительную долю в группах мажорных и минорных компонентов занимает класс производных андростероидов, выступающих характерной маркерной составляющей мускуса.

В отношении экстракта виноградных косточек доказано, что он повышает концентрацию эндогенного тестостерона, блокируя фермент ароматазу, преобразующий тестостерон в эстрадиол, а также конкурирует с последним за его рецепторы в клетках органов-мишеней.

Нами показано, что вещества, из которых состоит субстанция красного корня, способны ингибировать 5 $\beta$ -редуктазу. Данный фермент катализирует переход тестостерона в андростерон (в сравнении с тестостероном

обладает 68% от его первоначальной андрогенной активности) и этиохоланолон (вообще не обладает андрогенной активностью).

В ходе исследования препаратов, приготовленных с использованием биологического сырья оленей, российскими учеными было установлено, что применение данных препаратов способствует повышению репродуктивной и эректильной функций.

На основе полученных активных субстанций будет создана новая биологически активная добавка к пище для коррекции эректильной дисфункции.

### Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агелдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором // Биомедицина. – 2018. – № 1. – С. 19-39.
2. <http://www.remedium.ru/doctor/detail.php?ID=68326>
3. <http://cyberleninka.ru/article/n/istoriya-ucheniya-ob-erektilnoy-disfunktsii>
4. <https://moluch.ru/archive/115/30944/>
5. <http://ecuro.ru/sites/default/files/Apolikhin-Krasnyak.pdf>
6. <http://lib.medvestnik.ru/apps/lib/assets/uploads/pharmateca/PDF/8206.pdf>
7. <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=37043>
8. <http://health-ua.com/stati/urologiya-i-andrologiya/prakticheskoe-rukovodstvo-po-erektilnoy-disfunktsii-3.html>
9. <https://www.lvrach.ru/2003/07/4530520/>
10. <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4588.pdf>
11. <https://medprosvita.com.ua/ehrektilnaya-disfunkciya-novyjj-simpt/>
12. <http://asu.edu.ru/images/File/dissertacii/dissovet21200901/Loginov/dissertation-Loginova-PV.pdf>
13. <http://medical-diss.com/medicina/abdominalnoe-ozhirenie-kak-faktor-riska-narusheniy-spermatogeneza-i-besplodiya-u-muzhchin>
14. <http://www.dslib.net/fiziologia/vlijanie-jemocionalnogo-naprzazhenija-i-fizicheskikh-nagruzok-na-sostojanie-polovoj.html>
15. <http://ecuro.ru/node/3597>

### References

1. Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L., Karkischenko N.N. Analiz biologicheski aktivnykh soedinenij muskusa kabargi (*Moschus moschiferus*) metodom gazovoy hromatografii s mass-selektivnym detektorom [Analysis of biologically active musk compounds of musk deer (*Moschus moschiferus*) by gas chromatography with mass selective detector]. Biomedicine. 2018. No. 1. Pp. 19-39. (In Russian).
2. <http://www.remedium.ru/doctor/detail.php?ID=68326>
3. <http://cyberleninka.ru/article/n/istoriya-ucheniya-ob-erektilnoy-disfunktsii>
4. <https://moluch.ru/archive/115/30944/>
5. <http://ecuro.ru/sites/default/files/Apolikhin-Krasnyak.pdf>
6. <http://lib.medvestnik.ru/apps/lib/assets/uploads/pharmateca/PDF/8206.pdf>
7. <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=37043>
8. <http://health-ua.com/stati/urologiya-i-andrologiya/prakticheskoe-rukovodstvo-po-erektilnoy-disfunktsii-3.html>
9. <https://www.lvrach.ru/2003/07/4530520/>
10. <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4588.pdf>
11. <https://medprosvita.com.ua/ehrektilnaya-disfunkciya-novyjj-simpt/>
12. <http://asu.edu.ru/images/File/dissertacii/dissovet21200901/Loginov/dissertation-Loginova-PV.pdf>
13. <http://medical-diss.com/medicina/abdominalnoe-ozhirenie-kak-faktor-riska-narusheniy-spermatogeneza-i-besplodiya-u-muzhchin>
14. <http://www.dslib.net/fiziologia/vlijanie-jemocionalnogo-naprzazhenija-i-fizicheskikh-nagruzok-na-sostojanie-polovoj.html>
15. <http://ecuro.ru/node/3597>

16. <http://xn--w-huba.umedp.ru/upload/iblock/d6b/d6b1e00a72c0b4f782c2d8646fb2396a.pdf>
17. <https://www.rlsnet.ru/>
18. [http://umedp.ru/articles/erektlnaya\\_disfunktsiya\\_preimushchestva\\_i\\_nedostatki\\_regulyatorov\\_rastitelnogo\\_proiskhozhdeniya.html](http://umedp.ru/articles/erektlnaya_disfunktsiya_preimushchestva_i_nedostatki_regulyatorov_rastitelnogo_proiskhozhdeniya.html)

## **Sources of a new bioactive food additive for correcting erectile dysfunction**

**V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, S.L. Lyublinskiy, M.T. Gasanov,  
G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin**

The paper describes the driving materials, on the basis of which it is possible to create a new effective bioactive food additive to correct erectile dysfunction. Active substances from musk of musk gland, extract of grape seeds, red root (*Hedýsarum*), biomaterials of spotted deer were obtained in Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia. Preclinical studies of their efficacy, safety, pharmacokinetics and dosing have been started. The work on the selection of the most cost-effective technology for the isolation of active components from natural raw materials for the development of experimental industrial regulations is being completed. Based on the active substances obtained, it is planned to create a new bioactive food additive to correct erectile dysfunction.

**Key words:** erectile dysfunction, bioactive food additive, natural material, gland of musk deer, grape seed extract, red root (*Hedýsarum*), biomaterials of sika deer.



## Генетические биомодели метаболического синдрома

Р.А. Клёсов, О.И. Степанова

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

Контактная информация: Клёсов Роман Алексеевич, klesrom@mail.ru

Представлен обзор основных доступных в настоящее время генетических биомоделей метаболического синдрома, используемых для изучения патофизиологических основ его развития, и пригодных для поиска и оценки новых эффективных способов лечения данного заболевания.

**Ключевые слова:** метаболический синдром, инсулин, лептин, ожирение.

### Метаболический синдром

Метаболический синдром (МС) – комплекс патологических состояний. Классическим вариантом МС считается следующее сочетание: абдоминальное ожирение + гиперинсулинемия + артериальная гипертензия (АГ) + гиперлипидемия + нарушение толератности к глюкозе (НТГ) или сахарный диабет типа 2 (СД-2).

В качестве альтернативных вариантов выступают следующие сочетания:

- гиперинсулинемия + АГ + гиперлипидемия + НТГ или СД-2 («европейский вариант» – метаболический синдром без ожирения);
- гиперинсулинемия + АГ + гиперлипидемия + абдоминальное ожирение (вариант без НТГ);
- гиперинсулинемия + АГ + гиперлипидемия (вариант без ожирения и НТГ) [1].

Для изучения патофизиологических основ развития и методов профилактики и лечения МС требуется поиск и создание адекватных экспериментальных моделей.

Развитие тех или иных компонентов МС может быть выражено в различной степени, поэтому для каждой конкретной ситуации важно выбрать приемлемых животных-биомоделей.

### Животные модели метаболического синдрома

В настоящее время наиболее известной животной моделью для изучения метаболического синдрома являются крысы линии fa/fa Zucker fatty rats (ZFR, Lep<sup>rfa</sup>) [22]. У этих грызунов обнаружена мутация гена – рецептора лептина на 5-й хромосоме, что приводит к снижению связывания лептина с поверхностью рецептор-экспрессирующих кле-

ток (без изменения сродства к лептину) развивается гиперфагия и ожирение уже и к развитию устойчивости к лептину в на 4-й неделе жизни (табл.). Эти нарушения в головном мозге, вследствие чего у них сочетаются с небольшой гипер-

Таблица

Модели метаболического синдрома

| Модель   | Ожирение  | Гиперлипиде-<br>мия        | Инсулинрети-<br>стентность                          | Артериальная<br>гипертензия |
|--|---|----------------------------|---|-----------------------------|
| <b>Модели ожирения</b>   |   |                            |   |                             |
| Lep <sup>ob/ob</sup>   | После прекращения вскармливания молоком   | ↑ЛПВП                      | +   | Неустойчивое АД             |
| LepR <sup>db/db</sup>  | После прекращения вскармливания молоком   | ↑ЛПВП                      | +   | Неустойчивое АД             |
| A <sup>y/a</sup>   | Отсроченное начало  | Незначительно ↑ЛПВП        | С задержкой   | +                           |
| MC4-R <sup>-/-</sup>   | Отсроченное начало; обостряется после диеты с высоким содержанием жира; MC4-R также наблюдается у людей с ожирением | Не определяется            | +   | Снижение АД                 |
| MC3-R <sup>-/-</sup>   | Отсроченное начало  | Не определяется            | Защищена  | Не определяется             |
| <b>Модели гиперлипидемии</b>   |   |                            |   |                             |
| LDLR <sup>-/-</sup>  | Индуцируется после диеты с высоким содержанием жира   | ↑ЛПНП                      | Индуцируется после диеты с высоким содержанием жира | -                           |
| apoE <sup>-/-</sup>  | В целом устойчива   | ↑ЛПНП и ЛПОНП<br>↓ЛПВП     | В целом устойчива                                   | -                           |
| <b>Модели с ожирением и гиперлипидемией</b>  |   |                            |   |                             |
| Lep <sup>ob/ob</sup> ; LDR <sup>-/-</sup> and LepR <sup>db/db</sup> ; LDLR <sup>-/-</sup>  | После прекращения вскармливания молоком   | ↑ЛПНП и ЛПОНП              | +   | Не определяется             |
| Lep <sup>ob/ob</sup> ; apoE <sup>-/-</sup> and LepR <sup>db/db</sup> ; apoE <sup>-/-</sup> | После прекращения вскармливания молоком   | ↑ЛПНП и ЛПОНП<br>↓ЛПВП     | +   | Не определяется             |
| A <sup>y/a</sup> ; LDLR <sup>-/-</sup> western diet feeding                                | Отсроченное начало  | ↑ЛПНП и ЛПОНП              | +   | Не определяется             |
| LDLR 3KO   | После прекращения вскармливания молоком   | ↑ЛПНП и ЛПОНП              | +   | +                           |
| apoE 3KO   | После прекращения вскармливания молоком   | ↑ЛПНП и ЛПОНП              | +   | +                           |
| apoE <sup>-/-</sup> 60% HFD  | Спустя время после диеты с высоким содержанием жира   | ↑ ЛПОНП                    | +   | +                           |
| <b>Модели с АГ</b>   |   |                            |   |                             |
| NZBWF1   | Возрастное начало   | Не определяется            | +   | +                           |
| KKA <sup>y/a</sup>   | +   | -                          | +   | +                           |
| <b>Модели с СД-2</b>   |   |                            |   |                             |
| C57BL/KsJYLepr <sup>db/+</sup> (B/Ks-Lepr <sup>db/+</sup> )                                | На 2-м мес. жизни   | Недостаточно ↑ЛПНП и ЛПОНП | +   | +                           |

Примечания: наличие (+), отсутствие (-); повышение (↑), сильное повышение (↑↑); снижение (↓), сильное снижение (↓↓).

гликемией, инсулинрезистентностью, гиперинсулинемией, гиперлипидемией и умеренной гипертензией [7]. Островки Лангерганса гипертрофированы, их количество увеличено. Кроме того, у животных наблюдается поражение почек. В плазме крови этих крыс повышено содержание холестерина, жирных кислот и триглицеридов, а в печени обнаружена гиперпродукция липопротеинов. Увеличение концентрации триглицеридов в крови связано с накоплением липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), а увеличение холестерина крови связано с его увеличением во фракциях ЛПОНП и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [2].

Крысы линии Zucker diabetic fatty rat (ZDF) – избирательно инбредны к гипергликемии и являются подштаммом линии ZFR. Они несут аутосомно-рецессивный дефект транскрипции  $\beta$ -клеток, что наследуется независимо от мутации гена рецептора лептина (*Lepr*). Ген, ответственный за дефект, не был определен, но этого дефекта недостаточно, чтобы вызвать диабет, и только в сочетании с мутацией гена *Lepr* он может привести к гипергликемии [21]. Крысы линии ZDF менее страдают ожирением, но больше инсулиноустойчивы, чем крысы ZFR. Мужские особи более склонны к развитию диабета, который развивается, как правило, на 7-10-й неделе после рождения. У женских особей отмечены ожирение, инсулинзависимость, но без развития диабета [19]. У крыс ZDF гипергликемия, гиперинсулинемия и гипертриглицеридемия развиваются после 12-15-недельного возраста наряду с диастолической и систолической дисфункцией. В этот же период жизни у них отмечалось умеренное увеличение

систолического АД. В возрасте 20-ти недель содержание холестерина в сыворотке крови у ZDF-крыс было в 2,5 раза выше по сравнению с *Lepr<sup>fa</sup>*-штаммом. Альбуминурия в возрасте 31-й недели сопровождалась утолщением базальной мембраны и клубочковым фиброзом (после 47-ми недель жизни). Увеличение триглицеридов в печени наблюдалось после 20-недельного возраста. Исследования  $\beta$ -клеток этих крыс показали, что основной дефект состоит в увеличении скорости их апоптоза [22]. Снижение синтеза инсулина и подавление функции транспортера глюкозы GLUT-2 считаются у этих крыс причинами гипергликемии. Снижение транспорта глюкозы также связано с уменьшением уровня GLUT-4 в жировой ткани и скелетных мышцах крыс ZDF [22].

Таким образом, данные модели демонстрируют множество нарушений, характерных для МС [9]. Они могут быть использованы для скрининга эффектов различных инсулин-чувствительных агентов и агентов против ожирения. Крысы линии ZFR могут быть полезны в оценке роли жировой ткани в развитии ожирения и для изучения нарушений лептинового пути передачи сигнала [6]. Однако данные по развитию гипертензии у этой линии крыс противоречивы, что и послужило причиной создания новой модели [9]. Этой моделью является линия крыс *DahlS.Z-Lepr<sup>fa</sup>/Lepr<sup>fa</sup>* или (*DS/obese rats*), выведенная путем скрещивания крыс *DS* (*Dahl salt-sensitive rats*) и *ZFR*, которые имеют мутацию в гене *Lepr*. У крыс линии *DS* развивается соль-индуцированная гипертензия, что впоследствии приводит к сердечной недостаточности. У крыс *DS/obese*,

получавших нормальную диету, развивается ожирение, а также гипертония, дислипидемия и резистентность к инсулину [11].

Спонтанно гипертензивные крысы (Spontaneously hypertensive rats) – хорошо известная экспериментальная модель для изучения гипертонии, которая также может быть использована как модель инсулинорезистентности. У этих крыс развивается гипертония, абдоминальное ожирение, гипертриглицеридемия. На основе этого штамма выведены такие линии крыс, как спонтанно гипертензивные крысы с ожирением (SHROB-крысы, obese spontaneously hypertensive rats / Koletsky rats) и SHR/NDmc-тучные крысы (SHR/NDmc-corpulent rats), которые считаются более успешными моделями для создания МС, чем SHR-крысы, поскольку ген рецептора лептина у них «выключен» [10].

Спонтанно гипертензивные крысы с ожирением – это модель с фенотипическими признаками, присущими МС (см. табл.). Она выведена на основе крыс линии SHR и имеет моногенетическое ожирение на гипертоническом генетическом фоне. У этих крыс развивается гипертония, гиперинсулинемия, гиперлипидемия и нефропатия. Ожирение развивается с 5-недельного возраста и связано с мутацией гена рецептора лептина, в результате чего уровень циркулирующего лептина увеличивается в 30 раз, что приводит к гиперфагии и увеличению массы тела. У крыс развивается гиперлипидемия, даже если они содержатся на стандартной диете, что характеризуется заметным увеличением концентрации триглицеридов, умеренным повышением уровня холестерина в плазме крови. Гиперинсулинемия у них

сочетается с нормальным или умеренно повышенным уровнем глюкозы в крови. Спонтанная гипертония развивается с 3-мес. возраста, к 30-й неделе у них возрастает АД до 200 мм рт.ст. У SHROB-крыс также обнаружены сосудистые заболевания, особенно – артерий брюшной полости, напоминающие атеросклероз сосудов человека [14].

Крысы линии SHR/NDmc-тучные крысы (SHR/NDmc-corpulent rats, SHR-cp) также могут быть использованы в качестве животной модели для изучения МС. Это инбредный подштамм SHR/N-тучных крыс, который демонстрирует развитие таких метаболических изменений, как увеличение массы тела и жировой ткани, вследствие гиперфагии, что сопровождается гипертонией, гипертрофией сердца, СД и гиперлипидемией.

Линия крыс Stroke-prone-SHR (SHRSP-крысы) является животной моделью, у которой развивается тяжелая гипертония и сопутствующие ей расстройства, такие как нефропатия, гипертрофия сердца, атеросклероз и развитие инсульта со 100% смертностью. Как SHR-модель, SHRSP-крысы также используются для моделирования инсулинорезистентности (см. табл.). Однако они весят меньше, чем нормотензивные крысы, и имеют более низкий уровень общего холестерина и жирных кислот в крови [9].

В недавней работе [12] авторы создали новую животную модель МС путем введения сегмента мутантного гена рецептора лептина от линии гетерозиготных fa/fa Zucker fatty rats в геном SHRSP-крыс. Новый конгенный штамм SHRSP-fatty (fa/fa)-крысы (SHRSP fatty (fa/fa) rats) отличается развитием ги-

пертонии, ожирения, гиперлептинемии, гиперлипидемии и гиперинсулинемии [12]. В исследовании Ueno T. и др. [22] показаны гистопатологические изменения у этих крыс со стороны сердечно-сосудистой системы, сопровождающиеся утолщением сердечных, сонных, почечных артерий и стенки аорты. У животных отмечали гломерулосклероз почек и гиперплазию панкреатических островков. Авторы утверждают, что фенотип SHRSP-fatty (fa/fa)-крыс аналогичен метаболическому синдрому человека [13].

Хотя резистентность к инсулину может быть определяющей в развитии жировой болезни печени, предположили, что и стеатоз печени может играть весомую роль в патогенезе метаболического синдрома и способствовать резистентности к инсулину печени и скелетных мышц [12]. Авторы работы [19] создали новую модель крыс Sterol-regulatory element-binding protein-SHR (SREBP-SHR-крысы) путем трансгенной гиперэкспрессии белков, связывающих стеролрегуляторные элементы у спонтанно гипертензивных крыс (SHR-крыс). У крыс данной линии развивается стеатоз печени, гиперинсулинемия, гипергликемия и гипертриглицеридемия в отсутствие ожирения. SREBP-SHR-модель крыс может быть полезна для исследования взаимосвязи жировой болезни печени и MC [19].

Резистентность к лептину может развиваться и в результате дефекта передачи сигнала лептина в клетку, связанного с действием его различных посредников. Центральная система меланокортина является посредником многих эффектов лептина и играет важную роль в регуляции энергетического

гомеостаза [15]. Механизм, посредством которого изменения в передаче сигналов в ЦНС модулируют хранение триглицеридов в печени, опосредован этой системой. Меланокортиновый рецептор 4-го типа (MC4R) экспрессируется в ряде ядер мозга грызунов, которые связаны с нейроэндокринными путями [16]. Изменения в гене рецептора меланокортина 4-го типа (ген MC4R) являются наиболее распространенной моногенной причиной ожирения, которая известна у человека. Кроме того, у мышей, которые дефицитны по меланокортиновому рецептору 4-го типа, отмечаются многие из тех же фенотипических характеристик, что и у людей с мутациями гена MC4R. MC4R-дефицитные мыши имеют синдром ожирения, который характеризуется гиперфагией, гипергликемией, гиперинсулинемией, гипометаболизмом, увеличением мышечной массы и линейного роста. Гиперинсулинемия в этой модели не является полностью зависимой от ожирения, т.к. у молодых MC4R-дефицитных животных наблюдался повышенный уровень циркулирующего в крови инсулина до ожирения. Несмотря на тяжелое ожирение в зрелом возрасте, MC4R-дефицитные животные не страдают гипертонией. Другой примечательной особенностью MC4R-дефицитных мышей является их повышенная чувствительность к высокому содержанию жиров в питании, что усугубляет гиперфагию, ожирение и гиперинсулинемию. Несмотря на развитие многих типичных признаков MC, очень мало известно о дислипидемии у этой модели. В частности, не отмечено изменений в содержании триглицеридов и незатерифицированных жирных

кислот в плазме крови, но наблюдался стеатоз печени [20].

Мыши линии *Agouti yellow* ( $A^*$ ) ( $Ay/a$ -мыши) имеют несколько спонтанных мутаций, влияющих на экспрессию белка Агути, транскрибирующего агути-геном ( $A$ ). Белок Агути в норме у грызунов экспрессируется только в меланоцитах и контролирует окраску шерсти. Доминантная мутация *Agouti yellow* ( $A^*$ ) в локусе Агути в хромосоме 2 вызывает повсеместную эктопическую экспрессию белка Агути [11]. Этот белок действует как антагонист меланокортинового сигнального пути, который реализует действие лептина. Такие мыши показывают разную окраску шерсти, возрастное ожирение и инсулинорезистентность за счет гиперфагии и гипоактивности. У особей с ожирением отмечена гипертензия без атеросклеротического поражения. Они являются детородными до 4-мес. возраста, в отличие от мышей линий *Lepob/ob* и *LepRdb/db* [6].

Модель мышей  $KKAy/a$  создана на основе линии мышей Куо Кондо ( $KK$  mice,  $KK$ -мыши) путем введения гена ожирения *Agouti yellow* в Куо Кондо штамм [8]. Таким образом, у этих мышей присутствует ген ожирения и диабетический ген, в отличие от  $KK$ -мышей, у которых есть только диабетический ген. У данной модели развивается ожирение в зрелом возрасте, более серьезная гиперинсулинемия и более заметные изменения в панкреатических островках, чем у  $KK$ -мышей. Причиной этих изменений является эктопическая экспрессия агути-антагонистического белка-рецептора меланокортина 4-го типа ( $MCR4$ ) в гипоталамусе. У этой линии мышей панкреатические островки

гипертрофированы, а  $\beta$ -клетки дегранулированы, что приводит к резистентности к инсулину [16].

Мыши линии *New Zealand Obese mice* ( $NZO$ -мыши) являются полигенной моделью ожирения, созданной путем селективного скрещивания (см. табл.). У них развивается гиперфагия и ожирение, которое может быть следствием резистентности к лептину, что связано с нарушением транспорта лептина через гематоэнцефалический барьер. Эти мыши гиперлептинемичны с 9-12-недельного возраста, они также имеют гиперинсулинемию, что связано с печеночной резистентностью к инсулину с раннего возраста. У них повышено содержание глюкозы в крови, а также нарушена толерантность к глюкозе, что усугубляется с возрастом. Примерно у 50% мужских особей развивается СД [17].

Мутантные мыши  $C57BL/KsJYLepr^{db}/+(B/Ks-Lepr^{db}/+)$  несут рецессивный ген *leptin receptor- $Lepr^{db} - (db)$*  (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). Ген  $db$  в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сходный с *diabetes mellitus*, с дегрануляцией  $\beta$ -клеток в островках ПЖ, но без дефицита инсулина. Мыши-диабетики  $B/Ks-Lepr^{db}/Lepr^{db} (db/db)$  обоих полов бесплодны. При динамическом исследовании показателей углеводного обмена у гомозиготных мышей опытной группы ( $db/db$ ) с момента рождения было установлено, что у них уже на 3-4-й неделе жизни уровень глюкозы в крови повышается с 4,3-6,0 ммоль/л (исходный уровень сразу же после рождения) до 9-13 ммоль/л, и в среднем достигает  $10,3 \pm 2,4$  ммоль/л. Содержание гликозилированного гемоглобина ( $HbA1c$ ) повышается с 3,0-3,5% до  $4,9 \pm 1,0\%$ , а уже к 6-7-й неделе превыша-

ет 5,2-6,1%; у мышей db/db имеет место и ранее прогрессирующее повышение в крови содержания глюкозы и HbA1c, полифагия, полидипсия, полиурия и нарастающее ожирение [3-5].

### Выводы

Таким образом, все рассмотренные модели грызунов могут быть потенциально использованы для изучения МС. Большинство из этих моделей относятся к моногенным, т.е. развитие нарушений у них связано с дефектом одного гена. Однако стоит отметить, что развитие МС у человека обусловлено многими факторами – не только изменением метаболического действия лептина.

Полигенные животные модели, которые также представлены в настоящем обзоре, могут обеспечить более высокую экстраполяцию результатов на человека [16]. Тем не менее, в отличие от моногенной модели, у полигенных моделей отсутствует контроль дикого типа. Кроме того, мужские особи моногенных моделей обнаруживают более существенные изменения, чем женские [18].

Хотя не существует идеальной модели животных для имитации заболеваний человека, но каждая из описанных моделей грызунов имеет специфические свойства, которые делают их полезными для изучения как механизмов развития МС, так и потенциальных методов лечения, поэтому необходимо продолжать поиск и создание оптимальных биомоделей МС.

### Список литературы

1. *Бутрова С.А.* Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению // РМЖ. – 2001. – Т. 9. – № 2. – С. 56-60.
2. *Кравчук Е.Н., Галагудза М.М.* Экспериментальные модели метаболического синдрома // Артериальная гипертензия. – 2014. – Т. 20. – № 5. – С. 377-383.
3. *Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Галахова Т.В., Онищенко Н.А., Касинская Н.В.* Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLeprdb/+ // Биомедицина. – 2009. – № 2. – С. 28-40.
4. *Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Онищенко Н.А., Баранова О.В.* Альтернативные модели клеточной трансплантологии при сахарном диабете 2 типа в различные сроки заболевания // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 22-25.
5. *Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Онищенко Н.А., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Касинская Н.В.* Эффективность коррекции клинических и морфологических признаков сахарного диабета 2 типа при трансплантации клеток костного мозга в зависимости от стадии заболевания // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 33-52.
6. *Animal Models for the Study of Human Disease / Ed. by P.M. Conn.* – 2013. – 1st Edition. – 1108 p. – Pp. 247-252.
7. *Baldelli R., Dieguez C., Casanueva F.F.* The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects // Ann. Med. – 2002. – V. 34. – Pp. 5-18.
8. *Chakraborty G., Thumpayil S., Lafontant D.E., et al.* Age dependence of glucose tolerance in adult KK-Ay mice, a model of non-insulin dependent diabetes mellitus // Lab. Anim. (NY). – 2009. – V. 38. – Pp. 364-68.
9. *de Artinano A.A., Castro M.M.* Experimental rat models to study the metabolic syndrome // British J. of Nutrition. – 2009. – V. 102. – Pp. 1246-1253.
10. *Del Giudice E.M., Cirillo Q., Santoro N., et al.* Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Ftolian obese children. Report of three new mutations // Int J. Obesity. – 2001. – V. 25. – No. 1. – Pp. 61-67.
11. *Hattori T., Murase T., Ohtake M., et al.* Characterization of a new animal model of metabolic syndrome: the ahlS.Z-L eprfa/Leprfa rat // Nutrition and Diabetes. – 2011. – doi:10.1038/nutd.2010.1.
12. *Hiraoka-Yamamoto J., Nara Y., Yasui N., et al.* Establishment of a new animal model of metabolic syndrome: SHRSP fatty (fa/fa) rats // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2004. – V. 31. – Pp.107-109.

13. *Iikuni N., Lam Q.L., Lu L., et al.* Leptin and inflammation // *Curr. Immunol. Rev.* – 2008. – Vol. 4. – No. 2. – Pp. 70-79.
14. *Kastin A.J., Pan W., Maness L.M., et al.* Decreased transport of leptin across the blood – brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor // *Peptides.* – 1999. – V. 20. – Pp. 1449-1453.
15. *Kennedy A.J., Ellacott K.L., King V.L., Hasty A.H.* Mouse models of the metabolic syndrome // *Dis. Model Mech.* – 2010. – V. 3(3-4). – Pp. 156-166.
16. *King A.J.F.* The use of animal models in diabetes research // *British J. of Pharmacology.* – 2012. – V. 166. – Pp. 877-894.
17. *Leiter E.H.* Selecting the “right” mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – V. 560. – Pp. 1-17.
18. *Panchal S.K., Brown L.* Rodent Models for Metabolic Syndrome Research // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* – 2011. – Article ID 351982. –doi:10.1155/2011/351982.
19. *Qi N.R., Wang J., Zidek V., et al.* A new transgenic rat model of hepatic steatosis and the metabolic syndrome // *Hypertension.* – 2005 – V. 45. – Pp. 1004-1011.
20. *Reaven G.M.* Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension and cardiovascular disease // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V. 88(6). – Pp. 2399-2403.
21. *Srinivasan K., Ramarao P.* Animal models in type 2 diabetes research: An overview // *Indian J. Med. Res.* – 2007. – V. 125. – Pp. 451-472.
22. *Ueno T., Takagi H., Fucuda N., et al.* Cardiovascular Remodeling and Metabolic Abnormalities in HRSP.Z-Leprfa/IzmDmcr Rats as a New Model of Metabolic Syndrome // *Hypertens. Res.* – 2008. – V. 31. – Pp. 021-031.
3. *Stepanova O.I., Karkischenko V.N., Baranova O.V., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Galahova T.V., Onishhenko N.A., Kasinskaya N.V.* Geneticheskaja model' saharnogo diabeta 2 tipa na mutantnyh myshah linii C57BL/KsJYLeprdb/+ [Genetic model of type 2 diabetes mellitus on mutant mice of C57BL/KsJYLeprdb/+ line]. *Biomedicine.* 2009. No. 2. Pp. 28-40. (In Russian).
4. *Stepanova O.I., Karkischenko N.N., Onishhenko N.A., Baranova O.V.* Alternativnie modeli kletочноy transplantologii pri saharnom diabete 2 tipa v razlichnyie sroki zabolevaniya [Alternative models of stem cells transplantation with a diabetes 2 types at various terms of disease]. *Biomedicine.* 2010. No. 5. Pp. 22-25. (In Russian).
5. *Stepanova O.I., Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Onishhenko N.A., Baranova O.V., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Kasinskaya N.V.* Effektivnost' korrekcii klinicheskikh i morfologicheskikh priznakov saharnogo diabeta 2 tipa pri transplantacii kletok kostnogo mozga v zavisimosti ot stadii zabolevaniya [Efficiency of correction of clinical and morphological symptoms of diabetes 2 types at transplantation of stem cells depending on a disease stage]. *Biomedicine.* 2012. No. 2. Pp. 33-52. (In Russian).
6. *Animal Models for the Study of Human Disease.* Ed. by P.M. Conn. 2013. 1st Edition. 1108 p. Pp. 247-252.
7. *Baldelli R., Dieguez C., Casanueva F.F.* The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann. Med.* 2002. V. 34. Pp. 5-18.
8. *Chakraborty G., Thumpayil S., Lafontant D.E., et al.* Age dependence of glucose tolerance in adult KK-Ay mice, a model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lab. Anim. (New York).* 2009. V. 38. Pp. 364-68.
9. *de Artinano A.A., Castro M.M.* Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *British J. of Nutrition.* 2009. V. 102. Pp. 1246-1253.
10. *Del Giudice E.M., Cirillo Q., Santoro N., et al.* Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Ftolian obese children. Report of three new mutations. *Fnt S. Obesity.* 2001. V. 25. No. 1. Pp. 61-67.
11. *Hattori T., Murase T., Ohtake M., et al.* Characterization of a new animal model of metabolic syndrome: the aHLS.Z-L eprfa/Leprfa rat. *Nutrition and Diabetes.* 2011. doi:10.1038/nutd.2010.1.

## References

1. *Butrova S.A.* Metabolicheskij sindrom: patogenez, klinika, diagnostika, podhody k lecheniju [Metabolic syndrome: pathogenesis, clinic, diagnosis, approaches to treatment]. *RMZh [Russian Medical J.].* 2001. V. 9. No. 2. Pp. 56-60. (In Russian).
2. *Kravchuk E.N., Galagudza M.M.* Jeksperimental'nye modeli metabolicheskogo sindroma [Experimental models of metabolic syndrome]. *Arterial'naja gipertenzija [Arterial hypertension].* 2014. V. 20. No. 5. Pp. 377-383. (In Russian).

12. *Hiraoka-Yamamoto J., Nara Y., Yasui N., et al.* Establishment of a new animal model of metabolic syndrome: SHRSP fatty (fa/fa) rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004. V. 31. Pp.107-109.
13. *Iikuni N., Lam Q.L., Lu L., et al.* Leptin and inflammation. *Curr. Immunol. Rev.* 2008. Vol. 4. No. 2. Pp. 70-79.
14. *Kastin A.J., Pan W., Maness L.M., et al.* Decreased transport of leptin across the blood – brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides.* 1999. V. 20. Pp. 1449-1453.
15. *Kennedy A.J., Ellacott K.L., King V.L., Hasty A.H.* Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis. Model Mech.* 2010. V. 3(3-4). Pp. 156-166.
16. *King A.J.F.* The use of animal models in diabetes research. *British J. of Pharmacology.* 2012. V. 166. Pp. 877-894.
17. *Leiter E.H.* Selecting the “right” mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research. *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 560. Pp. 1-17.
18. *Panchal S.K., Brown L.* Rodent Models for Metabolic Syndrome Research // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011. Article ID 351982. doi:10.1155/2011/351982.
19. *Qi N.R., Wang J., Zidek V., et al.* A new transgenic rat model of hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hypertension.* 2005 V. 45. Pp. 1004-1011.
20. *Reaven G.M.* Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 88(6). Pp. 2399-2403.
21. *Srinivasan K., Ramarao P.* Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J. Med. Res.* 2007. V. 125. Pp. 451-472.
22. *Ueno T., Takagi H., Fucuda N., et al.* Cardiovascular Remodeling and Metabolic Abnormalities in HRSPZ-Leprfa/IzmDmcr Rats as a New Model of Metabolic Syndrome. *Hypertens. Res.* 2008. V. 31. Pp. 021-031.

## Genetic biomodels of metabolic syndrome

R.A. Klesov, O.I. Stepanova

An overview of the currently available genetic biomodels of the metabolic syndrome used to study the pathophysiological foundations of the development of the disease and are suitable for the search and evaluation of new effective ways of treating this disease.

**Key words:** metabolic syndrome, insulin, leptin, obesity.

## Выбор способа применения и дозы тиамазола для моделирования гипотиреоза у лабораторных крыс

Ф.Х. Камиллов<sup>1</sup>, Т.И. Ганеев<sup>1</sup>, В.Н. Козлов<sup>2</sup>, Е.В. Кузнецова<sup>2</sup>,  
Р.Р. Максютлов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа

<sup>2</sup> – Башкирский институт технологий и управления (филиал) ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)», Мелеуз

Контактная информация: д.м.н. Камиллов Феликс Хусаинович, bro-raops@yandex.ru

Изучено влияние тиамазола в суточных дозах 20; 10; 5; 2,5 и 1 мг/100 г массы тела на гистоструктуру щитовидной железы, печени и уровень гормонов гипотизарно-тиреоидной системы (свободного тироксина, общего 3,5,3'-трийодтиронина и тиреотропного гормона). Проведенное исследование показало, что высокие дозы тиреостатика (20, 10 и 5 мг/100 г массы тела) индуцируют симптомы полиорганной патологии токсического генеза и не отражают процессы, характерные для гипотиреоза. Для моделирования тиреоидной дисфункции по типу эндемического эффекта рекомендуется тиамазол в дозе 2,5 мг/100 г массы тела, обеспечивающей устойчивое снижение мезора циркадианных ритмов температуры тела и функциональной активности тиреоидной системы на фоне незначительно выраженных микроморфологических трансформаций в щитовидной железе и печени. Относительно низкие дозы тиамазола (1 мг/100 г массы тела) в те же сроки введения не обеспечивают устойчивого снижения температуры тела во все фазы циркадианного ритма (7<sup>00</sup>, 11<sup>00</sup>, 15<sup>00</sup>, 19<sup>00</sup> и 23<sup>00</sup> ч).

**Ключевые слова:** экспериментальный гипотиреоз, тиамазол, нарушения микроциркуляции, циркадианные биоритмы, крысы.

### Введение

Одна из задач экспериментальной биологии – получение данных, наиболее полно и объективно отражающих суть происходящих патофизиологических сдвигов в организме подопытного животного в ходе получения экспериментальной модели заболевания. Не последнюю роль в научной методологии играет моделирование функциональной активности щитовидной железы. Оно позволяет изучать влияние тиреоидного статуса на интенсивность метаболических процессов, дифференцировку и рост клеток в пренатальном и постнатальном периодах. В настоящее время существует множество способов моде-

лирования дисфункций гипотизарно-тиреоидной системы [16].

С целью получения модели экспериментального гипотиреоза широко используются химические модели [2, 3, 11]. К веществам, подавляющим активность щитовидной железы, относятся калия перхлорат, калия тиоцианат, производные тиоурацила и мерказолил [17, 18]. По мнению ведущих специалистов в области клинической и экспериментальной тиреологии, ключевым в создании модели экспериментального гипотиреоза является вопрос об определении разовой и курсовой доз тиреостатика, обеспечивающих устойчивое снижение функциональной активности

щитовидной железы. Для верификации гипотиреоза у лабораторных животных широко используются данные о скорости метаболических процессов (гликолиза, цикла трикарбоновых кислот), но ведущим критерием считается значительное и устойчивое снижение (на 40-80%) содержания  $T_4$  и  $T_3$  на фоне повышения тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови [16]. Анализ литературных данных, посвященных проблемам моделирования гипотиреоза, показывает, что в экспериментах достигается необходимое снижение уровней тиреоидных гормонов, в т.ч., за счет введения относительно высоких доз (50,0 и 20,0 мг/100 г массы тела (МТ)) тиреостатика [4, 8]. Однако авторы не акцентируют внимание на выраженные морфофункциональные трансформации в органах и тканях у экспериментальных животных, однозначно зависящие от схем введения мерказолила [14]. Существенный недостаток химической модели с применением мерказолила – несоответствие патогенеза созданной модели механизмам развития йодной недостаточности в организме человека [5, 13].

**Цель** настоящего исследования – выявление разовой и курсовой доз тиамазола, обеспечивающих моделирование гипотиреоза при минимизации побочных эффектов тиреостатика.

### **Материалы и методы**

Исследования проводили на нелинейных белых крысах-самцах (72 особи) массой 180-220 г, полученных из ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека». Длительность карантина для животных составляла 14 дней. Крысы содержались в

клетках группами по 5 особей. В качестве подстилки использовали древесные опилки нехвойных пород деревьев. Температура воздуха в помещениях вивария поддерживалась в диапазоне 18-20°C при относительной влажности 60-70%. Животные содержались в стандартных условиях на рационе вивария и были разделены на 6 групп: первая – контрольная, у животных 2-й, 3-й, 4-й, 5-й и 6-й групп вызывали гипотиреоз ежедневным внутрижелудочным введением тиамазола соответственно в разовых дозах 20,0; 10,0; 5,0; 2,5 и 1,0 мг/100 г (МТ). Высокие дозы тиреостатика (20,0 и 10,0 мг/100 г МТ) вводили в течение двух недель, а относительно низкие (5,0; 2,5 и 1,0 мг/100 г МТ) – трех недель [8]. Исследования проводили с соблюдением этических норм и рекомендаций по гуманному обращению с животными, используемыми в экспериментальных и др. научных целях (приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»). Забой крыс 1-й, 2-й и 3-й групп осуществляли на 15-е сутки эксперимента, а 4-й, 5-й и 6-й – на 22-е сутки декапитацией под эфирным наркозом. Кусочки ткани щитовидной железы и печени фиксировали в 10% нейтральном формалине. После стандартной гистологической проводки материал заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Гематологические и биохимические исследования крови проводили по общепринятым методикам [15]. С целью определения функционального состояния щитовидной железы в сыворотке крови подопытных крыс определяли уровни гормонов щитовидной железы – свободного ти-

роксина ( $cT_4$ ), общего 3,5,3'-трийодтиронина ( $oT_3$ ) и тиреотропного гормона (ТТГ) – методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-систем: «ТиродИФА-свободный  $T_4$ », «ТиродИФА-трийодтиронин-01», «ТиродИФА-ТТГ-1» (ЗАО «Алкор Био», Россия) с помощью иммуноферментного автоматического анализатора «УНИПЛАН» (Россия). Исследования суточных биоритмов температуры тела у лабораторных крыс проводили на протяжении двух суток подряд с интервалом 4 ч – в  $7^{00}$ ,  $11^{00}$ ,  $15^{00}$ ,  $19^{00}$  и  $23^{00}$ , следуя рекомендациям [1]. Термометрию производили миниатюрным максимальным электрическим термометром, вставляемым в прямую кишку (перед введением термометр дезинфицировали и смазывали вазелином). Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием пакета программ Statistica 6.0 фирмы «Soft» с расчетом при нормальном распределении признака средней арифметической ( $M$ ), ошибки средней арифметической ( $m$ ) и  $t$ -критерия Стьюдента.

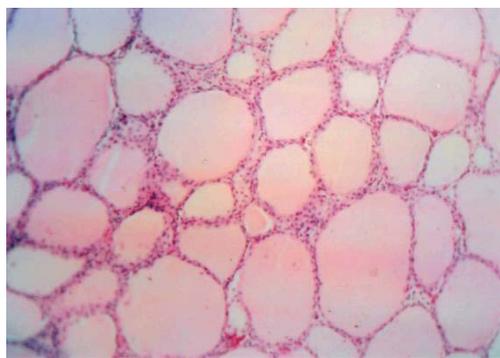


Рис. 1. Фолликулы с коллоидом в щитовидной железе крыс контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото: ок.  $\times 10$ , об.  $\times 20$ .

### Результаты исследований

Щитовидная железа клинически здоровых крыс (1-я группа) покрыта соединительнотканной капсулой, от которой вглубь железы отходят тонкие перегородки, разделяющие железу на дольки. Структурно-функциональной единицей щитовидной железы является фолликул (рис. 1), форма их округлая или угловатая. Фолликулы представлены в виде замкнутых пузырьков, выстланных однослойным эпителием. Между фолликулами встречаются малодифференцированные клетки – тироциты, образующие интерфолликулярные островки. Тироциты, имеющие кубическую форму, содержат ядро, которое располагается в базальной половине клетки. Цитоплазма тироцитов окрашивается оксифильно, клетки плотно прилегают друг к другу.

Щитовидная железа у крыс 2-й группы, получавших тиамазол в дозе 20 мг/100 г МТ, имеет измененные мелкие и крупные кровеносные сосуды. В большинстве случаев они свободны от крови и зияют (рис. 2), что свидетельствует о нарушениях в системе микроцир-

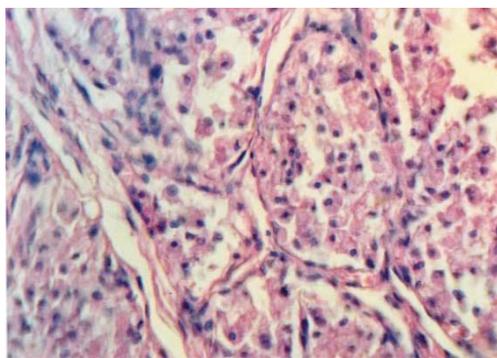


Рис. 2. Деструктивные процессы в щитовидной железе у крыс при применении тиреостатика в дозе 20 мг/100 г МТ. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото: ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ .

куляции железы. Как в центральной, так и в краевой части щитовидной железы коллоид в фолликулах отсутствует. Отдельные деструктивно измененные тироциты расположены на базальной мембране и имеют цитоплазматические выросты различной конфигурации, устремленные в полость фолликула. При этом вокруг ядра сохраняется узкий ободок цитоплазмы. Ядра деформированных тироцитов подвергаются кариопикнозу и уменьшены в размерах – хроматин плотный, окрашивается в темно-синий цвет. Некоторые остатки ядра тироцитов свободно располагаются внутри фолликулов. В стенках фолликулов определяются участки, лишенные железистых клеток, где к ним прилегают фибробластические клетки рыхлой соединительной ткани. В центральной части железы наблюдаются фолликулы с деформированной полостью, а в периферической части тироциты полностью выстилают стенку фолликулов, лишенных интрафолликулярного коллоида. При этом фолликулы как бы сжаты, что придает стенке сетчатое строение. Часть деформированных тироцитов лишена связей с базальной мембраной и

свободно располагается в интрафолликулярной полости в виде скоплений, а в подкапсулярных зонах железы определяют хорошо сохранившуюся стенку и полость, содержащую следы коллоида. В центральной части железы встречаются скопления плотно расположенных клеток кубической или полигональной формы, содержащих равномерно окрашиваемую цитоплазму и центрально расположенное ядро округлой формы: данные структуры, вероятно, представляют интерфолликулярные островки. Кровеносные сосуды периферических участков характеризуются умеренным кровенаполнением, а центральных участков – отсутствием форменных элементов крови. Наблюдаемые гемодинамические нарушения способствуют развитию деструктивно-дистрофических процессов в паренхиме железы.

Печень животных контрольной группы покрыта соединительнотканной капсулой (рис. 3). Дольки печени разделены слабо развитой междольковой соединительной тканью. В центре дольки находится центральная вена, от которой начинаются печеночные пластинки, образованные двумя рядами

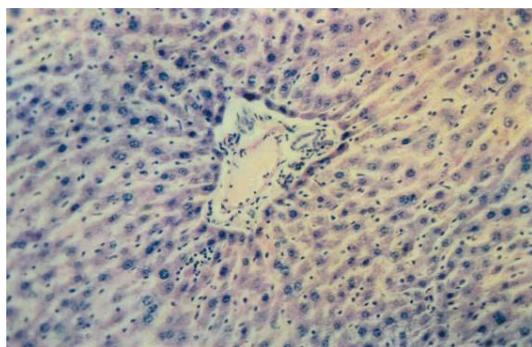


Рис. 3. Центральная вена дольки печени крыс контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото: ок. x10, об. x20.

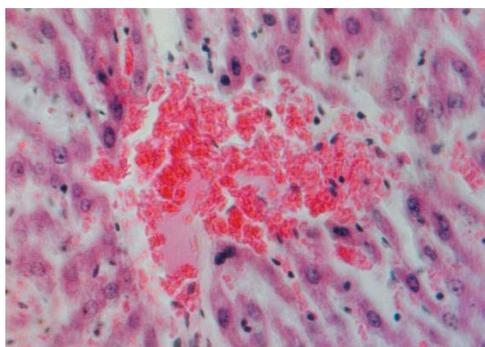


Рис. 4. Полнокровие центральной вены печени после применения тиамазола в дозе 20 мг/100 г МТ. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото: ок. x10, об. x40.

гепатоцитов. Гепатоциты имеют кубическую или полигональную форму. В центре гепатоцитов располагается ядро округлой формы. Внутридольковые синусоидные гемокапилляры умеренного кровенаполнения. Лимфоидная ткань представлена в виде мелких очагов, диффузно расположенных по ходу гемокапилляров.

У 2-й группы животных, получавших тиреостатик в дозе 20,0 мг/100 г МТ в течение 14-ти дней, наблюдаются выраженные деструктивные процессы в печеночной ткани. В кровеносных сосудах долек печени наблюдаются явления застоя; при этом синусоидные капилляры расширены, что создает условия для выхода плазмы крови в периваскулярную зону (рис. 4). Введение крысам такого ксенобиотика как тиамазол вызывает реакцию со стороны иммунокомпетентных клеток. Так, гистоструктура печеночной ткани в данной группе животных характеризуется скоплением лимфоидной ткани вокруг триады печени. Иммунокомпетентные клетки плотно прилегают к стенкам кровеносных сосудов. Аналогичные результаты получены при изучении гистоструктуры печени у крыс в состоянии гипотиреоза, индуцированного по схеме: 10,0 мг/кг МТ животного ежедневно в течение 8-ми недель [7, 9, 10]. Авторы отмечают мелкоочаговый некроз паренхимы печени, усиление фагоцитарной функции печеночных макрофагов, явления гидропической и баллонной дистрофии. Гистоструктура печени через 28 дней после отмены тиамазола характеризовалась продолжающимся некрозом гепатоцитов, который, как указывают авторы, является следствием прямого токсического действия тиреостатика.

Введение тиамазола вызывало у экспериментальных животных снижение уровня тиреоидных гормонов при одновременном повышении концентрации ТТГ в сыворотке крови. Концентрация общего 3,5,3'-трийодтиронина в сыворотке крови гипотиреоидных животных составляла  $1,44 \pm 0,10$  нмоль/л против  $1,88 \pm 0,13$  нмоль/л у контрольных животных ( $p < 0,05$ ), а содержание свободного тироксина ( $cT_4$ ) –  $6,00 \pm 0,23$  пмоль/л и  $16,68 \pm 0,50$  пмоль/л соответственно ( $p < 0,001$ ). При этом уровень ТТГ у крыс экспериментальной группы составил  $0,196 \pm 0,020$  мкМЕ/мл, а в контрольной –  $0,124 \pm 0,010$  мкМЕ/мл ( $p < 0,01$ ). Однако нельзя считать, что в данном случае была получена модель гипотиреоза по типу эндемического эффекта. Животные с подобного рода осложнениями в структуре печени, безусловно, не пригодны для дальнейшего использования в качестве экспериментальной модели исследуемой патологии. Таким образом, вышеуказанная доза антитиреоидного препарата вызывает явление острой интоксикации и глубокие патофизиологические сдвиги у животных исследуемой группы.

Вышеуказанный спектр исследований был проведен и при введении крысам в течение 21-х суток более низких доз тиреостатика (10,0 и 5,0 мг/100 г МТ). Указанные дозы также способствуют развитию симптомов острой интоксикации, вызывая неадекватные природе гипотиреоза выраженные дистрофические процессы, сопровождающиеся венозной гиперемией, стазом, лимфоидно-клеточной инфильтрацией и десинхронизмом в суточных биоритмах терморегуляции. При этом функциональное истощение гипотиреоидно-тире-

оидной системы проявляется отсутствием интрафолликулярного коллоида в центральных и периферических зонах щитовидной железы, снижением уровня тиреоидных гормонов ( $oT_3$ ,  $cT_4$ ) и повышением содержания ТТГ.

Животным 5-й группы вводили исследуемый тиреостатик в разовой дозе 2,5 мг/100 г МТ в течение 3-х недель. Щитовидная железа данной группы животных характеризуется выраженными гистологическими изменениями. Прежде всего, в центральной части железы определяется уменьшенное количество коллоида в фолликулах (рис. 5). При этом коллоид, уменьшаясь в объеме, постепенно отдалается от тироцитов. Между тироцитами и коллоидом образуется свободное пространство. Иногда масса фолликулярного коллоида смещается в одну сторону и прилегает к апикальному концу тироцитов. В некоторых фолликулах коллоид полностью отсутствует, что обусловлено прекращением синтеза тиреоидных гормонов. Одновременно с уменьшением количества интрафолликулярного коллоида в тироцитах отмечаются признаки де-

струкции. Часто уменьшается высота тироцитов, которые приобретают овальную форму и характеризуются плотным хроматином.

Некоторые тироциты, имеющие уплощенную форму и неровную апикальную часть, смещаются в полость фолликулов. Вокруг деструктивно измененных фолликулов с деформированными стенками в виде различной формы складок и выпячиваний наблюдаются отдельные лимфоциты и макрофаги, иногда они могут располагаться в полости фолликулов. Межфолликулярные эпителиоциты – также в состоянии деструкции и постепенно вклиниваются в общую массу измененных клеток. Результаты ИФА свидетельствовали о гиподисфункциональном состоянии тиреоидной системы у крыс 5-й группы: концентрация  $cT_4$  составляла  $6,88 \pm 0,18$  пмоль/л ( $p < 0,001$ ) против  $16,68 \pm 0,50$  пмоль/л у контрольных, а концентрация  $oT_3$  –  $2,10 \pm 0,19$  нмоль/л и  $1,88 \pm 0,13$  нмоль/л соответственно. При этом уровень ТТГ при гипотиреозе составил  $0,169 \pm 0,008$  мкМЕ/мл ( $p < 0,05$ ), в контроле –  $0,124 \pm 0,010$  мкМЕ/мл.

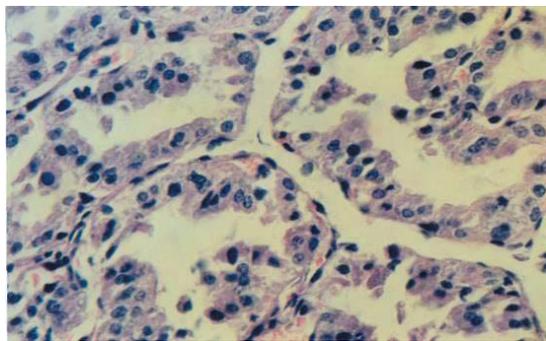


Рис. 5. Отсутствие коллоида в щитовидной железе крыс 5-й группы при гипотиреозе – тиамазол 2,5 мг/100 г МТ. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото: ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ .

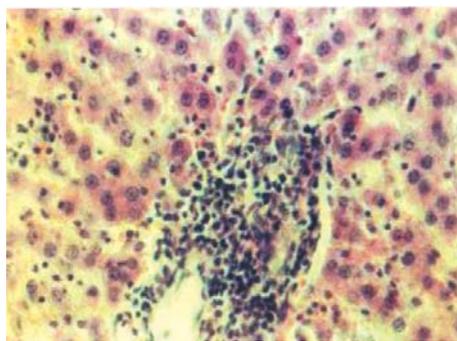


Рис. 6. Лимфоидные скопления в области центральной вены дольки печени крыс при гипотиреозе – тиамазол 2,5 мг/100 г МТ. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото: ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ .

У подопытных животных в гистологических структурах печени существенных изменений определить не удалось (рис. 6). Во всех участках дольки печени гепатоциты окрашиваются равномерно с базофильным оттенком цитоплазмы, что указывает на высокую функциональную активность. В гепатоцитах определяются митозы и полиплоидные ядра. В кровеносных капиллярах в определенной степени выявляются застойные явления, тогда как в большинстве случаев полнокровие не определяется. В различных участках печени наблюдаются лимфоидные клетки. Их количество, особенности расположения и размеры сильно варьируют. Чаще всего, они небольшого размера, образуют лимфоидные скопления, которые могут располагаться внутри дольки между печеночными пластинками, что создает препятствие кровотоку по внутривольковому синусоидным капиллярам. Внут-

ридольковое лимфоидное скопление приходится на 3-5 долек печени одного среза толщиной 7 мкм. Встречаются они около центральной вены дольки печени, достигая значительного размера, сдавливают стенку центральной вены и затрудняют отток крови, деформируют печеночные пластинки и синусоидные капилляры.

Ранее проведенными исследованиями было установлено, что структура, уровень, а также положение акрофазы и батифазы суточных ритмов терморегуляции отражают функциональную активность щитовидной железы, что позволяет использовать хронобиологические методы исследований для диагностики состояний гипо- и гипертиреоза [6]. С целью получения данных, подтверждающих устойчивое снижение температуры тела крыс 5-й группы, во все фазы суточного ритма были реализованы хронобиологические исследова-

Таблица  
Температура тела крыс на 22-е и 23-и сутки при суточной дозе тиамазола 1,0 и 2,5 мг/100 г массы животного (M±m, n=12)

| Время суток (ч)   | 7 <sup>00</sup>          | 11 <sup>00</sup>         | 15 <sup>00</sup>        | 19 <sup>00</sup>         | 23 <sup>00</sup>         | 7 <sup>00</sup>          | 11 <sup>00</sup>         | 15 <sup>00</sup>         | 19 <sup>00</sup>         | 23 <sup>00</sup>         | 7 <sup>00</sup>          |
|---|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Температура тела, °С<br>(контрольная группа)                                  | 37,9<br>±<br>0,09        | 36,9<br>±<br>0,06        | 37,8<br>±<br>0,11       | 38,2<br>±<br>0,08        | 37,2<br>±<br>0,08        | 37,9<br>±<br>0,13        | 36,8<br>±<br>0,10        | 38,1<br>±<br>0,10        | 38,3<br>±<br>0,05        | 37,4<br>±<br>0,12        | 37,0<br>±<br>0,16        |
| Температура тела, °С<br>(экспериментальная группа – тиамазол 1,0 мг/100 г МТ) | ***<br>36,5<br>±<br>0,09 | ***<br>36,4<br>±<br>0,08 | **<br>37,8<br>±<br>0,08 | ***<br>37,2<br>±<br>0,06 | ***<br>35,8<br>±<br>0,07 | ***<br>36,6<br>±<br>0,10 | ***<br>36,3<br>±<br>0,08 | ***<br>37,5<br>±<br>0,07 | ***<br>37,5<br>±<br>0,10 | ***<br>36,3<br>±<br>0,06 | ***<br>35,7<br>±<br>0,06 |
| Температура тела, °С<br>(экспериментальная группа – тиамазол 2,5 мг/100 г МТ) | ***<br>35,6<br>±<br>0,10 | ***<br>35,9<br>±<br>0,08 | **<br>37,3<br>±<br>0,08 | ***<br>37,4<br>±<br>0,05 | ***<br>36,1<br>±<br>0,07 | ***<br>36,5<br>±<br>0,11 | ***<br>35,9<br>±<br>0,09 | ***<br>37,4<br>±<br>0,09 | ***<br>37,8<br>±<br>0,07 | ***<br>36,1<br>±<br>0,09 | ***<br>36,1<br>±<br>0,07 |

Примечание: \*\* и \*\*\* – различие с контролем статистически достоверно при  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  соответственно.

ния. Как видно из данных, приведенных в табл., у крыс в состоянии гипотиреоза, индуцированного разовой дозой тиамазола в 2,5 мг/100 г МТ, среднеарифметические значения температуры тела на 22-е и 23-е сутки от начала введения тиреостатика были ниже относительно контроля во все фазы суточного ритма ( $7^{00}$ ,  $11^{00}$ ,  $15^{00}$ ,  $19^{00}$  и  $23^{00}$ ).

С целью минимизации (уменьшения) побочных эффектов тиреостатика крысам 6-й группы вводили тиамазол из расчета 1,0 мг/100 г МТ. Как и следовало ожидать, крысы сравнительно легко переносили малую дозу тиреостатика: как в общем физическом статусе животных, так и в их поведении не было замечено явных отклонений. При этом в 6-й группе крыс значения температуры тела в отдельные фазы ритма ( $15^{00}$ ) оставались на уровне аналогичных показателей контроля, что свидетельствует о том, что изучаемая доза тиамазола в 1,0 мг/100 г МТ не приводит к устойчивой и выраженной гипотермии (табл.).

При применении тиамазола в дозе 1,0 мг/100 г МТ у крыс на 22-е сутки от начала введения тиреостатика активизировались процессы дейодирования  $T_4$  с образованием более активной формы тиреоидного гормона  $oT_3$ . Так, концентрация  $oT_3$  в сыворотке крови крыс 6-й группы составила  $2,32 \pm 0,07$  нмоль/л ( $p < 0,01$ ),  $cT_4 - 8,19 \pm 0,80$  пмоль/л ( $p < 0,001$ ), ТТГ –  $0,216 \pm 0,010$  мкМЕ/мл ( $p < 0,001$ ) против  $1,88 \pm 0,13$  нмоль/л,  $16,68 \pm 0,50$  пмоль/л и  $0,124 \pm 0,010$  мкМЕ/млв контроле соответственно.

### **Обсуждение результатов**

Результаты наших собственных исследований согласуются с выводами др. авторов, отмечающих, что при экспери-

ментальном гипотиреозе развивается малокровие за счет снижения содержания гемоглобина и числа эритроцитов, выраженная лейкопения. В исследованиях, посвященных изучению влияния экспериментального гипотиреоза на функциональные свойства эритроцитов и ретикулоцитов крыс, установлено, что фармакологическая блокада щитовидной железы мерказолилом угнетает эритропоэз на фоне сдвига ретикулоцитарной формулы в сторону более молодых форм [12]. В свою очередь уменьшение числа эритроцитов и тромбоцитов на фоне снижения содержания в крови альбуминов и повышения уровня глобулинов сопровождается уменьшением величины отрицательного заряда эритроцитов, что приводит к снижению суспензионной стабильности крови, агрегации эритроцитов, вызывающих нарушения микроциркуляции. Наблюдаемые очаговые кровоизлияния в тканях при интоксикации тиамазолом преимущественно обусловлены состоянием свертываемости крови. Такое представление согласуется со сведениями о состоянии свертываемости крови при гипотиреозе. Исследованиями ряда авторов установлено, что гипокоагулемия при гипо- и атиреозе обуславливается снижением концентрации факторов I, V, VII, агрегационной активности тромбоцитов, а также повышением уровня гепарина за счет роста активности тучных клеток [3, 19, 20]. Токсичные дозы тиамазола (20,0; 10,0 и 5,0 мг/100 г МТ) индуцируют синдром полиорганной патологии за счет гемодинамических нарушений, способствующих развитию деструктивно-дистрофических процессов.

Хронобиологические исследования находят все более широкое применение при оценке патофизиологических

сдвигов у лабораторных животных. Измерение теплообразования остается одним из наиболее часто применяемых методов оценки функциональной активности щитовидной железы. Этот метод дает одинаково ценные результаты как при пониженной функции щитовидной железы – гипотиреозе, так и при повышенной гипертиреозе.

Показано, что тиамазол в высоких разовых и курсовых дозах вызывает десинхронизацию суточных ритмов теплопродукции – смещение акро- и батифаз температуры тела гипотиреоидных крыс относительно контроля [11]. Данные по оценке структуры и мезора суточных ритмов теплопродукции позволяют с высокой степенью достоверности судить о развитии экспериментального гипотиреоза в сочетании с определением ТТГ и гормонов щитовидной железы в сыворотке крови.

### Выводы

1. Тиамазол в суточных дозах 20,0; 10,0 и 5,0 мг/100 г МТ индуцирует развитие полиорганной патологии токсичного генеза, не соответствующей процессам, характерным для гипотиреоза.

2. Тиамазол в относительно низких разовых дозах (1,0 мг/100 г МТ) не обеспечивает развитие одного из основных симптомов гипотиреоза – устойчивого и выраженного снижения температуры тела у лабораторных животных во все фазы суточного ритма ( $7^{00}$ ,  $11^{00}$ ,  $15^{00}$ ,  $19^{00}$  и  $23^{00}$  ч).

3. Эффективной для создания модели гипотиреоза может считаться доза тиамазола в 2,5 мг/100 г МТ, вводимая перорально в течение 3-х недель. Тиамазол в вышеуказанной дозе обеспечивает развитие симптомов, характерных для

тиреоидной дисфункции по эндемическому типу, когда на фоне дефицита йода активизируются процессы конверсии  $T_4$  в  $T_3$  с повышением концентрации общего 3,5,3'-трийодтиронина на фоне гиперпродукции ТТГ и дефицита  $sT_4$ . Указанная доза тиреостатика (2,5 мг/100 г МТ) обеспечивает устойчивое снижение мезора суточных ритмов температуры тела животных в состоянии гипотиреоза относительно контроля во все фазы суточного ритма ( $7^{00}$ ,  $11^{00}$ ,  $15^{00}$ ,  $19^{00}$  и  $23^{00}$  ч).

4. При использовании оптимальных схем введения тиамазола (2,5 мг/100 г МТ) в течение 21-х суток в щитовидной железе развиваются характерные для гипотиреоза патоморфологические изменения с уменьшением количества коллоида в фолликулах на фоне незначительных гистологических трансформаций в тканях печени, где отмечались слабовыраженные явления застоя крови в синусоидных гемокapиллярах отдельных долек, очаги скопления лимфоцитов и макрофагов по ходу крупных кровеносных сосудов.

### Список литературы

1. Асланян Н.Л., Багдасарян Р.А., Шухян В.М., Ерицян Г.Ж. Методика исследования биологических ритмов в клинике: методич. реком.– Ереван. 1978. 20 с.
2. Басалаева Н.Л., Стрижиков В.К., Мифтахутдинов Н.Т., Сычугов Г.В., Кузнецова Ю.М., Таужанова Т.В. Особенности влияния йодида калия на функциональные параметры тиреоидной и репродуктивной систем самок-крыс // Вестник ЮУрГУ. 2010. № 19. С. 77-79.
3. Гусакова Е.А., Городецкая И.В. Влияние йодсодержащих гормонов щитовидной железы на систему протеолиза // Вестник ВГМУ. 2012. Т. 11. № 3. С. 42-51.
4. Каде А.Х., Смянова Л.А., Лиева К.А., Занин С.А., Трофименко А.И., Джиджи-

- хия *К.М.* Моделирование гипотиреоидного состояния у крысы посредством коагуляции верхней и нижней щитовидной артерии справа // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 12. С. 116-121.
5. *Козлов В.Н., Мамцев А.Н., Бондарева И.А.* Способ диагностики экспериментального гипотиреоза у лабораторных животных. 2007. Патент РФ № 2290859.
  6. *Колесников С.И., Макарова Н.Г.* Нарушения тиреоидного статуса, процессов липопероксидации и структуры гепатоцитов при экспериментальном гипотиреозе // *Сибирский медицинский журнал*. 2014. № 8. С. 47-50.
  7. *Кузьмак Н.И.* Влияние тиреостатических препаратов и тиреоидэктомии на содержание сиаловых кислот в сыворотке крови и печени крыс // *Вопросы медицинской химии*. 1978. Т. 24. Вып.1. С. 52-56.
  8. *Лобанок Л.М., Лукиа Л.С., Соловьева Н.Г., Крылова И.И.* Роль эндотелия в регуляции сократительных и дилататорных реакций аорты при экспериментальном гипотиреозе у крыс // *Проблемы эндокринологии*. 2002. Т. 48. № 1. С. 41-42.
  9. *Макарова Н.Г., Васильева Л.С., Выборова И.С., Гармаева Д.В.* Структура печени при стрессе у животных с гипотиреозом // *Сибирский медицинский журнал*. 2011. № 2. С. 69-71.
  10. *Макарова Н.Г., Васильева Л.С., Гармаева Д.В.* Структура печени при экспериментальном гипотиреозе // *Сибирский медицинский журнал*. 2010. № 3. С. 70-73.
  11. *Пономарева Л.Ф.* Суточные ритмы терморегуляции у крыс при атиреозе и биологическая активность йод-полисахаридных соединений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Уфа. 2005. 23 с.
  12. *Петрова Н.Б., Турубанова В.С.* Влияние экспериментального гипотиреоза на функциональные свойства эритроцитов и ретикулоциты крыс // *Вестник Сыктывкарского университета*. 2013. № 3. С. 84-100.
  13. *Попова Н.М., Якушева Е.Н., Шулькин А.В., Чумаченко П.А.* Морфофункциональное состояние щитовидной железы при назначении симвастатина на фоне экспериментального гипотиреоза // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. 2010. № 4. С. 46-51.
  14. *Робинсон М.В., Обут Т.А., Мельникова Е.В., Труфакин В.А.* Влияние тироксина и мерказолила на иммунологические показатели лимфоцитов крови и лимфоидных органов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 156. № 8. С. 203-205.
  15. *Симонян Г.А., Хисамутдинов Ф.Ф.* Ветеринарная гематология. – М.:Колос. 1995. 256 с.
  16. *Яглова Н.В., Яглов В.В., Березов Т.Т.* Проблемы экспериментального моделирования гипо- и гипертиреоидных состояний // *Вестник РАМН*. 2009. № 3. С.30-35.
  17. *Broedel O., Eravci M., Fuxius S., et al.* Effect of hyper- and hypothyroidism on thyroid hormone concentration in regions of rat brain // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. No. 285. Pp. 470-480.
  18. *Zbucki R.L., Winnicka M.M., Sawicki B., Szytna B., Andrzejewska A., Puchalski Z.* Alteration of parafollicular (C) cells activity in experimental model of hypothyroidism in rats // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007. No. 45(2). Pp. 115-121.
  19. *Silberbauer K.F., Sinzinger H., Ring F., Willvonseder R., Weissel M.* Platelet retention and hypothyroidism: an investigation in patients with thyroid carcinoma treated by total thyroidectomy // *Wien Klin Wochenschr.* 1977. No. 89(17). Pp. 590-594.
  20. *Masunaga R., Nagasaka A., Nakai A., Kotate M., Sawai Y., Oda N., Mokuno T., Shimazaki K., Hayakawa N., Kato R., Hirano E., Hagiwara M., Hidaka H.* Alteration of platelet aggregation in patients with thyroid disorders // *Metabolism.* 1997. No. 46(10). Pp. 1128-1131.

## References

1. *Aslanyan N.L., Bagdasaryan R.A., Shukhyan V.M., Yeritsyan G.J.* Metodika issledovaniya biologicheskikh ritmov v klinike: metodich. rekom. [Study methodology of biological rhythms in the clinic: guidelines]. Erevan. 1978. 20 p. (In Russian).
2. *Basalayeva N.L., Strizhikov V.K., Miftakhutdinov N.T., Sychugov G.V., Kuznetsova Yu.M., Tauzhanova T.V.* Osobennosti vliyanija jodida kalija na funkcional'nye parametry tireoidnoj i reproduktivnoj sistem samokrysa [Effect of potassium iodide on the functional parameters of the thyroid and reproductive systems of female rats]. *Vestnik YUUrGU [Bulletin of SUSU]*. 2010. No.19. Pp. 77-79. (In Russian).
3. *Gusakova E.A., Gorodetskaya I.V.* Vliyanie jod-soderzhashchih gormonov shhitovidnoj zhelezy

- na sistemu proteoliza [Effect of iodine-containing thyroid hormones on the system of proteolysis]. Vestnik VGMU [Bulletin of VSMU]. 2012. V.11. No. 3. Pp. 42-51. (In Russian).
4. **Kade A.K., Smeyanova L.A., Liyeva K.A., Zanin S.A., Trofimenko A.I., Dzhidzhikhiya K.M.** Modelirovanie gipotireoidnogo sostojanija u krysy posredstvom koaguljicii verhnej i nizhnej shhitovidnoj arterii sprava [Gipotireoid modeling of the condition at the rat by means of coagulation of the top and bottom thyroid artery on the right]. Fundamental'nye issledovanija [Basic research]. 2013. No. 12. Pp. 116-121. (In Russian).
  5. **Kozlov V.N., Mamtsev A.N., Bondareva I.A.** Sposob diagnostiki jeksperimental'nogo gipotireoza u laboratornyh zhivotnyh [A method for diagnosing experimental hypothyroidism in laboratory animals]. 2007. Patent of the Russian Federation No. 2290859. (In Russian).
  6. **Kolesnikov S.I., Makarova N.G.** Narushenija tireoidnogo statusa, processov lipoperoksidacii i struktury gepatocitov pri jeksperimental'nom gipotireoze [Disorders of thyroid status, lipid peroxidation processes and hepatocyte structure in experimental hypothyroidism]. Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian medical Journal]. 2014. No. 8. Pp. 47-50. (In Russian).
  7. **Kuzmak N.I.** Vlijanie tireostaticeskikh preparatov i tireoidjektomii na sodержanie sialovyh kislot v syvorotke krovi i pecheni krysa [Effect of thyreostatic drugs and thyroidectomy on the content of sialic acids in the blood serum and liver of rats]. Voprosy medicinskoj himii [Questions of Medical Chemistry]. 1978. V. 24. Issue 1. Pp. 52-56. (In Russian).
  8. **Lobanok L.M., Luksha L.S., Solov'eva N.G., Krylova I.I.** Rol' jendotelija v reguljaciji sokratitel'nyh i dilatatornyh reakcij aorty pri jeksperimental'nom gipotireoze u krysa [The role of the endothelium in the regulation of contractile and dilator aortic reactions in experimental hypothyroidism in rats]. Problemy jendokrinologii [Problems of endocrinology]. 2002. V. 48. No. 1. Pp. 41-42. (In Russian).
  9. **Makarova N.G., Vasilyeva L.S., Vyborova I.S., Garmayeva D.V.** Struktura pecheni pri stresse u zhivotnyh s gipotireozom [The structure of the liver of animals with hypothyroidism under stress]. Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian medical Journal]. 2011. No. 2. Pp. 69-71. (In Russian).
  10. **Makarova N.G., Vasilyeva L.S., Garmayeva D.V.** Struktura pecheni pri jeksperimental'nom gipotireoze [The structure of the liver in experimental hypothyroidism]. Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian medical Journal]. 2010. No. 3. Pp. 70-73. (In Russian).
  11. **Ponomareva L.F.** Sutochnye ritmy termoreguljicii u krysa pri atireoze i biologicheskaja aktivnost' jod-polisaharidnyh soedinenij: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [Daily rhythms of thermoregulation in rats with athyreosis and bioactivity of iodine-polysaccharide compounds: Diss., Cand. Sc. (Biology)]. Ufa. 2005. 23 p. (In Russian).
  12. **Petrova N.B., Turubanova V.S.** Vlijanie jeksperimental'nogo gipotireoza na funkcional'nye svojstva jerritocitov i retikulocitov krysa [Effect of experimental hypothyroidism on functional properties of erythrocytes and reticulocytes of rats]. Vestnik Syktyvkar'skogo universiteta [Bulletin of Syktyvkar University]. 2013. No. 3. Pp. 84-100. (In Russian).
  13. **Popova N.M., Yakusheva E.N., Shchulkin A.V., Chumachenko P.A.** Morfofunkcional'noe sostojanie shhitovidnoj zhelezy pri naznachenii simvastatina na fone jeksperimental'nogo gipotireoza [Morphofunctional state of the thyroid gland in the administration of simvastatin on the background of experimental hypothyroidism]. Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik im. akad. I.P. Pavlova [Russian medical and biological bulletin named after academician I.P. Pavlov]. 2010. No. 4. Pp. 46-51. (In Russian).
  14. **Robinson M.V., Obut T.A., Melnikova E.V., Trufakin V.A.** Vlijanie tiroksina i merkazolila na immunologicheskie pokazateli limfocitov krovi i limfoidnyh organov [Influence of thyroxin and mercazolil on immunological parameters of lymphocytes of blood and lymphoid organs]. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2013. V. 156. No. 8. Pp. 203-205. (In Russian).
  15. **Simonyan G.A., Khisamutdinov F.F.** Veterinarnaja gematologija [Veterinary Hematology]. Moscow: Kolos. 1995. 256 p. (In Russian).
  16. **Yaglova N.V., Yaglov V.V., Berezov T.T.** Problemy jeksperimental'nogo modelirovanija gipo- i gipertireoidnyh sostojanij [Problems of experimental simulation of hypo- and hyperthyroidism]. Vestnik RAMN [Bulletin of the Russian Academy of Medical Science]. 2009.No. 3. Pp. 30-35. (In Russian).
  17. **Broedel O., Eravci M., Fuxius S., et al.** Effect of hyper- and hypothyroidism on thyroid hor-

- more concentration in regions of rat brain. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. No. 285. Pp. 470-480.
18. *Zbucki R.L., Winnicka M.M., Sawicki B., Szynaka B., Andrzejewska A., Puchalski Z.* Alteration of parafollicular (C) cells activity in experimental model of hypothyroidism in rats. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007. No. 45(2). Pp. 115-121.
19. *Silberbauer K.F., Sinzinger H., Ring F., Willvonseder R., Weissel M.* Platelet retention and hypothyroidism: an investigation in patients with thyroid carcinoma treated by total thyroidectomy. *Wien Klin Wochenschr.* 1977. No. 89 (17). Pp. 590-594.
20. *Masunaga R., Nagasaka A., Nakai A., Kotate M., Sawai Y., Oda N., Mokuno T., Shimazaki K., Hayakawa N., Kato R., Hirano E., Hagiwara M., Hidaka H.* Alteration of platelet aggregation in patients with thyroid disorders. *Metabolism.* 1997. No. 46(10). Pp. 1128-1131.

## The choice of a method of application and dosage of thiamazole for modeling hypothyroidism in laboratory rats

F.Kh. Kamilov, T.I. Ganeyev, V.N. Kozlov, E.V. Kuznetsova,  
R.R. Maksyutov

The effect of thiamazole in daily doses of 20; 10; 5; 2,5 and 1 mg / 100 g of body weight on thyroid, liver and hormone levels of the pituitary-thyroid system (free thyroxine, total 3,5,3'-triiodothyronine and thyroid-stimulating hormone) has been studied. The study has shown that high doses of thyrostatics (20; 10 and 5 mg / 100 g of body weight) induced symptoms of a multi-organ pathology of toxic origin and do not reflect the processes characteristic of hypothyroidism. In order to simulate thyroid dysfunction by the type of endemic effect, it is recommended that thiamazole at a dose of 2,5 mg / 100 g of body weight ensure a steady decrease in the mesic circadian rhythms of body temperature and the functional activity of the thyroid system against the background of micromorphological transformations in the thyroid and liver. Relatively low doses of thiamazole (1 mg / 100 g of body weight) at the same time of administration do not provide a steady decrease of body temperature in all phases of the circadian rhythm (7 am, 11 am, 15 pm, 19 pm, 23 pm).

**Key words:** experimental hypothyroidism, thiamazole, microcirculation disorders, circadian biorhythms, rats.



## Влияние социальной изоляции на стрессоустойчивость и резорбцию костной ткани крыс при термическом стрессе

Д.Г. Иванов, Н.В. Александровская

ФГУП «НЦ «Сигнал», Москва

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

Изучалось влияние социальной изоляции на стрессоустойчивость и резорбцию костной ткани крыс при термическом стрессе. Животные в возрасте 2-2,5 мес. помещались на 30 сут в условия социальной изоляции. Эффект ежедневного семисуточного термического стресса исследовался на животных, содержащихся в социальной изоляции или в группе. Социальная изоляция снижала тревожность крыс в «открытом поле», уменьшала количество 11-оксикортикостероидов в крови и левом надпочечнике, содержание норадреналина в мозге, увеличивала содержание адреналина в правом надпочечнике, уровень кальция в крови и плотность бедренной кости. У крыс, содержащихся в группе, термическое воздействие активировало гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую и симпато-адреналовую системы, стимулировало резорбцию костной ткани в виде увеличения свободного оксипролина и активности кислой фосфатазы в крови, снижало уровень кальция и увеличивало уровень фосфора в сыворотке, уменьшало плотность бедренной кости. У крыс, подвергавшихся социальной изоляции, термическое воздействие не вызывало сдвигов биохимических показателей гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и костной резорбции, хотя увеличивало относительную массу левого надпочечника и снижало плотность бедренной кости. Полученный результат указывает на положительный эффект социальной изоляции на стрессоустойчивость и резорбцию костной ткани при стрессе.

**Ключевые слова:** крыса, социальная изоляция, стресс, костная резорбция.

### Введение

Стресс является неспецифической стереотипной генерализованной реакцией организма, возникающей в условиях, угрожающих нарушению гомеостаза [6], и направленной на его поддержание [24]. Физиологические реакции, осуществляющие «перестройку» гомеостаза, включают эффекты нервной и гуморальной регуляции [25]. Ведущую роль в ответе организма при стрессе отводят симпатоадреналовой системе (САС),

регулирующей быстрый ответ и анатомически состоящей из симпатической части автономной нервной системы и хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), регулирующей долгосрочный ответ и включающей в свой состав гипоталамус, гипофиз и кору надпочечников [4]. Долгосрочное нахождение организма в условиях стресса может приводить к развитию заболеваний внутренних ор-

ганов и выражаться в дезинтеграции поведения вплоть до нервно-психического срыва [2, 10].

Успешность адаптации индивида к условиям стресса зависит от его внутреннего состояния и характеристик фактора, вызывающего стресс. При этом одним из ключевых индивидуальных факторов стрессоустойчивости является тревожность [16]. У высокотревожных людей выполнение деятельности в стрессогенных условиях сопровождается, как правило, развитием значительного нервно-психического перенапряжения [21]. Аналогично, в модельных экспериментах у крыс, обнаруживающих низкую тревожность в «открытом поле» в виде коротких латентных периодов начала движения и первого захода в центр, а также большую двигательную активность и низкие значения показателя вегетативного баланса, наблюдается большая стрессоустойчивость, чем у высокотревожных животных, поведение которых в «открытом поле» характеризуется низкой двигательной активностью и высокими значениями показателя вегетативного баланса [11, 19].

Совместное содержание крыс ведет к конкуренции животных за жизненные ресурсы и установлению иерархии посредством агрессивного поведения [7], в результате чего возрастает социальное давление на каждую особь в клетке. Крысы низкого социального ранга, как правило, обнаруживают более тревожное поведение по сравнению с доминантными животными [9]. Изоляция животных снимает социальное давление, и изолированное животное не отличается по физиологическим показателям от доминантной особи в группе, демонстрирует низкую тревожность [23]. Это даёт основания считать, что социальная изоляция животных

моделирует состояния низкой тревожности у человека и позволяет использовать её в качестве метода при исследовании реакции организма на стресс.

Многочисленное ежедневное воздействие горячим (70°C) воздухом в течение семи суток вызывает стрессовую реакцию, обозначаемую как термический стресс, и повышает резорбцию костной ткани [15]. Несмотря на то, что стресс до сих пор не внесён в число факторов риска системных заболеваний костной ткани, стресс-индуцированную костную резорбцию важно учитывать, т.к. остеопороз выявляется клинически часто только после переломов костей. В связи с этим для диагностики, профилактики и определения тактики лечения крайне необходимо выявление факторов риска заболевания [14].

Указанный эффект термического воздействия на костную ткань предотвращается введением феназепам [8], что свидетельствует об участии эмоциогенных структур в реализации механизма развития костной резорбции при стрессе. Эти данные позволяют предположить влияние социальной изоляции на функциональную активность систем, обеспечивающих адаптацию, и резорбцию костной ткани крыс при термическом воздействии, поэтому **целью** данной работы было исследовать влияние социальной изоляции на стрессоустойчивость и резорбцию костной ткани крыс при стрессе.

### **Материалы и методы**

Экспериментальная часть работы выполнена на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 2-2,5 мес. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали приказу Минздрава России от 01.04.2016 г.

№ 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и директиве ЕП и СЕС от 22.09.2010 г. «По охране животных, используемых в научных целях». Животные содержались при температуре воздуха 20-22°C, относительной влажности 40-60%, естественном световом режиме, со свободным доступом к воде и пище. Депривация корма осуществлялась за 12 ч до выведения крыс из эксперимента.

До начала эксперимента животные содержались в пластиковых клетках размером 490×370×215 мм в группах по 6-7 особей. Площадь, приходящаяся на одну крысу, составляла 302-259 см<sup>2</sup>. После этого животные опытной группы подвергались 30-суточной изоляции. Условия социальной изоляции создавали, помещая животных в пластиковые клетки размером 385×300×230 мм, разделенные стеклянной перегородкой на два равных отсека. Площадь, приходящаяся на одну крысу в условиях изоляции, составляла 578 см<sup>2</sup>. Перегородка прилегала ко дну и крышке клетки неплотно, так что животные, находящиеся в разных отсеках, могли ощущать присутствие друг друга, но не могли осуществлять зоосоциальный контакт, что исключало возможность установления социальной иерархии. Животные контрольной группы после введения в эксперимент опытных крыс оставались в своих клетках в группах по 3-4 особи, что соответствовало площади 604-453 см<sup>2</sup> на крысу.

**В первой** серии исследовали влияние социальной изоляции на тревожность крыс, функциональное состояние систем, обеспечивающих адаптацию, и морфофункциональное состояние костной ткани. Животных делили на две группы: «Изоляция», крысы которой

подвергались 30-суточной социальной изоляции, и «Контроль», животные которой в течение 30-ти суток содержались в стабильных группах по 3-4 особи, как описано выше. На следующий день по истечении сроков изоляции часть животных из каждой группы тестировали в «открытом поле». Остальных – выводили из эксперимента путём декапитации.

«Открытое поле» представляло собой камеру из белого пластика размером 1×1×0,5 м с дном, расчерченным на 25 равных квадратов, которая освещалась лампой мощностью 100 Вт. Перед проведением теста животных в течение 1 мин держали в затемненной картонной камере размером 30×15×10 см с отверстиями для доступа воздуха. Тестирование животных проводилось с 16:00 до 19:30 час. Крыс помещали в центр «открытого поля» и в течение 3 мин регистрировали время выхода из центрального квадрата, число пересеченных квадратов, число вертикальных стоек, число дефекаций и уринаций, длительность реакций замирания, обнюхивания и груминга.

У декапитированных животных определяли относительную массу стрессочувствительных органов – левого надпочечника и тимуса. Регистрировали относительную массу, а также абсолютные значения длины и вентродорсального диаметра середины правой бедренной кости. Определяли объём бедренной кости [1] и рассчитывали её плотность. Плазму получали, смешивая кровь с 5% р-ром натрия этилендиаминтетраацетата. Для приготовления сыворотки кровь без антикоагулянта выдерживали 30 мин при комнатной температуре. После центрифугирования в течение 15 мин при 2800 об./мин образцы сыворотки и плазмы замораживали и хранили при -20°C.

В плазме, гомогенатах левого надпочечника и печени, приготовленных с 30% р-ром этанола, определяли содержание 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) флюориметрическим методом Ю.П. Панкова, И.Я. Усватовой в модификации В.Г. Подковкина [20]. В гомогенатах правого надпочечника, приготовленных с 10% р-ром трихлоруксусной кислоты, определяли содержание адреналина флюориметрическим методом Э.Ш. Матлиной в модификации В.Г. Подковкина [20]. В гомогенатах головного мозга, приготовленных с 10% р-ром ТХУ, флюориметрически определяли содержание норадреналина по методу Э.Ш. Матлиной в модификации В.Г. Подковкина [20] и серотонина по методу Г.Я. Прошиной в модификации В.Г. Подковкина [20]. В гомогенатах печени, приготовленных с 0,1 М фосфатным буфером pH 7,2, определяли содержание гликогена по реакции с антроновым реактивом после щелочного гидролиза [18] и малонового диальдегида (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой [17]. Концентрацию свободного и белковосвязанного оксипролина в плазме определяли по реакции с *n*-диметиламинобензальдегидом [17]. Содержание кальция в сыворотке измеряли на пламенном анализаторе жидкости (ПАЖ-2) согласно руководству по эксплуатации. Уровень фосфора в сыворотке анализировали по реакции с молибденовым реактивом [13]. Общую активность щелочной (ЩФ) и кислой фосфатаз (КФ), а также магния в сыворотке определяли наборами Bio-latest («Лахема», Чехия).

**Во второй** экспериментальной серии исследовали влияние термического стресса на морфофункциональное состояние костной ткани у крыс, содержавшихся в группе и в социальной изоляции. Экспе-

риментальных животных делили на три группы: «ТС» (крысы подвергались термическому воздействию и содержались в группе), «ТС+Изоляция» (животные подвергались термическому воздействию и содержались в изоляции) и «Контроль» (крысы, содержащиеся в группе и не подвергавшиеся термическому воздействию).

Термический стресс у крыс воспроизводили, помещая животных по одному в камеру из фанеры размером 0,6×0,4×0,22 м, накрывающуюся крышкой из оргстекла. Воздух, нагретый электрокалорифером, подавался через множество отверстий диаметром 5 мм в полу камеры. В верхней части стенок камеры были сделаны по 6 закрывающихся отверстий диаметром 20 мм для регуляции скорости прохождения воздуха. Температура регулировалась с помощью реле с контактным термометром, к которому был подключен источник тепла. Во всех частях камеры температура воздуха была одинакова и составляла 70°C. Термическое воздействие проводили ежедневно с 9:00 до 12:00 в течение 7-ми сут, начиная с 31-го дня эксперимента, через 30 сут изоляции. В течение стрессового воздействия условия содержания животных сохранялись. Длительность первого термического воздействия составляла 10 мин, затем увеличивалась на 15 с каждый день для препятствия адаптации крыс. На следующий день по истечении срока экспериментального воздействия животных декапитировали. Кровь и органы декапитированных животных анализировали по схеме, описанной выше.

Результаты исследования представляли в виде средней арифметической и ошибки средней. Сравнение средних значений проводили методом дисперсионного анализа ANOVA. При множествен-

ных сравнениях использовали post hoc сравнение Бонферрони. В случае статистически значимого отличия дисперсий в группах по критерию Ливена средние сравнивали по критерию Манна-Уитни. Отличия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследований

**Влияние социальной изоляции на тревожность, функцию систем, обеспечивающих адаптацию, и состояние костной ткани крыс**

Результаты тестирования животных, содержащихся в 30-суточной социальной изоляции, в «открытом поле» обнаружили меньшее ( $p=0,039$ ), чем в контроле, латентное время выхода из центра ( $9,0 \pm 1,1$  с,  $n=18$

против  $13,8 \pm 1,6$  с,  $n=8$ ), а также меньшую ( $p=0,014$ ) относительно контроля длительность груминга ( $3,4 \pm 0,9$  с,  $n=18$  против  $15,5 \pm 4,5$  с,  $n=8$ ). Число пересечённых квадратов, вертикальных стоек, длительность замиранья, обнюхивания, количество дефекаций и уринаций у крыс группы «Изоляция» не отличались от контроля.

У животных, подвергавшихся изоляции, прирост массы тела в течение 30-ти сут составил  $62,8 \pm 4,1\%$  ( $n=12$ ) и по критерию Манна-Уитни был больше ( $p=0,007$ ), чем у крыс контрольной группы ( $43,7 \pm 4,9\%$ ,  $n=8$ ).

Относительные массы левого надпочечника и тимуса у крыс группы «Изоляция» не отличались от контроля (табл. 1).

Таблица 1

**Показатели функциональной активности систем, обеспечивающих адаптацию, и морфофункционального состояния костной ткани крыс, содержащихся в социальной изоляции**

| Показатель  | «Контроль»,<br>n=8 | «Изоляция»,<br>n=12       |
|---|--------------------|---------------------------|
| <i>Относительная масса стресс-чувствительных органов</i>            |                    |                           |
| Левый надпочечник, %  | 0,019±0,001        | 0,018±0,001               |
| Тимус, %  | 0,216±0,008        | 0,198±0,006               |
| <i>Показатели функциональной активности ГГНС</i>                    |                    |                           |
| 11-ОКС в надпочечнике, мкг/г  | 53,74±2,65         | 45,40±1,71 <sup>a</sup>   |
| 11-ОКС в плазме, мкг/мл   | 0,634±0,053        | 0,489±0,023 <sup>a</sup>  |
| 11-ОКС в печени, мкг/г  | 13,13±2,27         | 10,49±1,33                |
| <i>Показатели функциональной активности САС</i>                     |                    |                           |
| Норадреналин в мозге, мкмоль/г                                      | 0,56±0,05          | 0,44±0,03 <sup>a</sup>    |
| Адреналин в надпочечнике, мкг/г                                     | 0,98±0,09          | 1,20±0,06 <sup>a</sup>    |
| Гликоген в печени, мг/г   | 44,37±1,80         | 49,79±1,44 <sup>a</sup>   |
| МДА в печени, нмоль/г   | 205,18±16,28       | 156,88±11,35 <sup>a</sup> |
| <i>Биометрические показатели правой бедренной кости</i>             |                    |                           |
| Относительная масса, %  | 0,335±0,011        | 0,372±0,013               |
| Длина кости, мм   | 27,87±0,63         | 28,53±0,44                |
| Диаметр диафиза, мм   | 2,52±0,04          | 2,58±0,03                 |
| Плотность, г/см <sup>3</sup>  | 1,41±0,02          | 1,49±0,03 <sup>a</sup>    |
| <i>Показатели обмена органического компонента костного матрикса</i> |                    |                           |
| Свободный оксипролин, мг/мл   | 2,46±0,26          | 2,72±0,16                 |
| Белковосвязанный оксипролин, мг/мл                                  | 23,75±2,29         | 28,65±2,27                |
| <i>Показатели обмена минерального компонента костного матрикса</i>  |                    |                           |
| Кальций, ммоль/мл   | 2,19±0,04          | 2,36±0,05 <sup>a</sup>    |
| Фосфор, мг/мл   | 16,83±0,37         | 16,06±0,25                |
| Магний, ммоль/мл  | 1,19±0,06          | 1,03±0,07                 |
| Щелочная фосфатаза, Ед/л  | 229,3±41,6         | 228,6±28,8                |
| Кислая фосфатаза, Ед/л  | 12,5±0,8           | 12,9±0,7                  |

Примечание: <sup>a</sup> – отличие от группы «Контроль» статистически значимо,  $p < 0,05$ .

Через 30 сут изоляции у крыс (табл. 1) наблюдались меньшие по сравнению с контролем уровень 11-ОКС в плазме (-22,9%,  $p=0,011$ ) и содержание 11-ОКС в надпочечнике (-15,5%,  $p=0,012$ ). Содержание 11-ОКС в печени крыс, подвергавшихся изоляции, не отличалось от контроля.

У животных, содержащихся в изоляции, обнаружено (табл. 1) меньшее, чем в контроле, содержание норадреналина в головном мозге (-21,4%,  $p=0,027$ ) и МДА в печени (-23,5%,  $p=0,022$ ), а также большее содержание адреналина в надпочечнике (+23,1%,  $p=0,043$ ) и гликогена в печени (+12,2%,  $p=0,030$ ).

Через 30 сут социальной изоляции содержание серотонина в головном мозге крыс не отличалось от сходных значений в контроле ( $1,97 \pm 0,23$  мкг/г против  $2,06 \pm 0,16$  мкг/г,  $p=0,769$ ).

Относительная масса, абсолютная длина и диаметр диафиза правой бедренной кости у изолированных и групповых крыс не отличались статистически значимо (табл. 1), хотя плотность правой бедренной кости у крыс группы «Изоляция» была больше, чем в контроле (+5,7%,  $p=0,049$ ).

У крыс группы «Изоляция» зарегистрирован больший, чем в контроле, уровень кальция в сыворотке (+7,8%,  $p=0,030$ ). Средние значения уровня фосфора, магния, активности ЩФ и КФ в сыворотке, свободного и белковосвязанного оксипролина в плазме животных группы «Изоляция» не отличались от контроля (табл. 1).

**Влияние термического стресса на состояние костной ткани крыс, содержащихся в социальной изоляции**

Средняя масса тела животных групп «ТС» и «ТС+Изоляция» в течение экс-

перимента не отличалась от контроля. Прирост массы тела по окончании эксперимента у крыс группы «Контроль» ( $26,6 \pm 2,8\%$ ,  $n=10$ ) был больше, чем у крыс групп «ТС» ( $18,8 \pm 2,0\%$ ,  $n=10$ ,  $p=0,037$ ) и «ТС+Изоляция» ( $19,4 \pm 1,2\%$ ,  $n=12$ ,  $p=0,047$ ). Отличий в значениях показателя между группами «ТС» и «ТС+Изоляция» обнаружено не было.

Через 7 сут термического воздействия значения относительной массы левого надпочечника у крыс групп «ТС» (+16,7%,  $p=0,035$ ) и «ТС+Изоляция» (+16,7%,  $p=0,012$ ) были больше, чем в контроле (табл. 2), но не отличались между собой. Относительная масса тимуса у животных групп «ТС» и «ТС+Изоляция» была меньше, чем в контроле, на 15,4% ( $p=0,015$ ) и 14,4% ( $p=0,017$ ), хотя не отличалась между группами.

В группе «ТС» наблюдался больший, чем в контроле, уровень 11-ОКС в плазме (+64,6%,  $p=0,032$ ) и содержание 11-ОКС в надпочечнике (+36,3 %  $p=0,033$ ). У животных группы «ТС+Изоляция» значения уровня 11-ОКС в крови и содержание 11-ОКС в надпочечнике не отличались от контроля. При этом отмечено меньшее, чем в группе «ТС» (-34,2%,  $p=0,003$ ), содержание 11-ОКС в надпочечнике. Содержание 11-ОКС в печени у крыс групп «ТС» и «ТС+Изоляция» не отличалось от контроля и между группами (табл. 2).

Содержание норадреналина в головном мозге животных группы «ТС+Изоляция» и «ТС» не отличалось от контроля, хотя у животных группы «ТС+Изоляция» содержание норадреналина в головном мозге было больше (+38,9%,  $p=0,043$ ), чем у крыс группы «ТС». Содержание адреналина в над-

почечнике у животных групп «ТС» (-29,6%,  $p=0,001$ ) и «ТС+Изоляция» (-24,7%,  $p=0,005$ ) было меньше контрольных значений показателя, но не отличалось между группами (табл. 2).

Содержание гликогена в печени крыс группы «ТС» было меньше, чем у контрольных животных (-28,2%,  $p=0,044$ ). У крыс группы «ТС+Изоляция» содер-

жание гликогена в печени не отличалось от контроля и животных группы «ТС».

Ежедневное термическое воздействие в течение 7-ми сут приводило к активации перекисного окисления мембран печени у крыс в виде большего (+42,3%,  $p=0,010$ ) содержания МДА в печени крыс группы «ТС» по сравнению с контролем. У крыс группы

Таблица 2

**Показатели функциональной активности систем, обеспечивающих адаптацию, и морфофункционального состояния костной ткани крыс, содержащихся в группе или в условиях социальной изоляции и подвергавшихся термическому воздействию**

| Показатель  | «Контроль»,<br>n=10 | «ТС»,<br>n=10            | «ТС+Изоляция»,<br>n=12   |
|---|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Относительная масса стресс-чувствительных органов</i>            |                     |                          |                          |
| Левый надпочечник, %  | 0,018±0,001         | 0,021±0,001 <sup>a</sup> | 0,021±0,001 <sup>a</sup> |
| Тимус, %  | 0,208±0,005         | 0,176±0,008 <sup>a</sup> | 0,178±0,008 <sup>a</sup> |
| <i>Показатели функциональной активности ГГНС</i>                    |                     |                          |                          |
| 11-ОКС в надпочечнике, мкг/г  | 47,04±3,21          | 64,11±4,68 <sup>a</sup>  | 42,19±4,64 <sup>b</sup>  |
| 11-ОКС в плазме, мкг/мл   | 0,628±0,083         | 1,034±0,119 <sup>a</sup> | 0,769±0,099              |
| 11-ОКС в печени, мкг/г  | 3,46±0,45           | 4,03±0,37                | 4,00±0,41                |
| <i>Показатели функциональной активности САС</i>                     |                     |                          |                          |
| Норадреналин в мозге, мкмоль/г                                      | 0,573±0,037         | 0,478±0,049              | 0,664±0,060 <sup>b</sup> |
| Адреналин в надпочечнике, мкг/г                                     | 0,807±0,042         | 0,568±0,047 <sup>a</sup> | 0,608±0,035 <sup>a</sup> |
| Гликоген в печени, мг/г   | 49,86±3,87          | 35,78±2,59 <sup>a</sup>  | 44,00±4,17               |
| МДА в печени, нмоль/г   | 247,8±16,4          | 352,6±21,4 <sup>a</sup>  | 258,7±26,1 <sup>b</sup>  |
| <i>Биометрические показатели правой бедренной кости</i>             |                     |                          |                          |
| Относительная масса, %  | 0,259±0,009         | 0,248±0,009              | 0,252±0,008              |
| Длина кости, мм   | 30,21±0,35          | 29,96±0,41               | 29,28±0,52               |
| Диаметр диафиза, мм   | 2,64±0,04           | 2,59±0,05                | 2,57±0,06                |
| Плотность, г/см <sup>3</sup>  | 1,60±0,06           | 1,24±0,05 <sup>a</sup>   | 1,36±0,08 <sup>a</sup>   |
| <i>Показатели обмена органического компонента костного матрикса</i> |                     |                          |                          |
| Свободный оксипролин, мг/мл   | 2,16±0,09           | 2,79±0,11 <sup>a</sup>   | 2,29±0,10 <sup>b</sup>   |
| Белковосвязанный оксипролин, мг/мл                                  | 40,10±1,62          | 41,72±1,99               | 37,20±1,16               |
| <i>Показатели обмена минерального компонента костного матрикса</i>  |                     |                          |                          |
| Кальций, ммоль/мл   | 2,17±0,10           | 1,75±0,14 <sup>a</sup>   | 1,96±0,06                |
| Фосфор, мг/мл   | 16,76±1,01          | 21,92±1,85 <sup>a</sup>  | 18,11±1,20               |
| Магний, ммоль/мл  | 1,18±0,04           | 1,29±0,04                | 1,22±0,03                |
| Щелочная фосфатаза, Ед/л  | 230,6±27,4          | 131,3±20,4 <sup>a</sup>  | 197,8±26,1               |
| Кислая фосфатаза, Ед/л  | 9,15±0,96           | 14,25±1,45 <sup>a</sup>  | 12,23±5,11               |

Примечания: <sup>a</sup> – отличие от группы «Контроль» статистически значимо; <sup>b</sup> – отличие от группы «ТС» статистически значимо,  $p<0,050$ .

«ТС+Изоляция» содержание МДА в печени не отличалось от контроля и было меньше (-26,6%,  $p=0,017$ ), чем у животных группы «ТС».

У животных группы «ТС» содержание серотонина в мозге ( $3,77 \pm 0,30$  мкг/г) было меньше ( $p=0,001$ ), чем в контроле ( $2,13 \pm 0,26$  мкг/г) и у крыс группы «ТС+Изоляция» ( $2,60 \pm 0,27$  мкг/г,  $p=0,016$ ). Содержание серотонина в мозге крыс групп «ТС+Изоляция» и «Контроль» не отличалось.

Относительная масса, абсолютные значения длины и диаметра правой бедренной кости у крыс групп «Контроль», «ТС» и «ТС+Изоляция» не отличались. Плотность правой бедренной кости у крыс групп «ТС» (-22,2%,  $p=0,002$ ) и «ТС+Изоляция» была (-15,0%,  $p=0,038$ ) меньше, чем у контрольных животных. Отличий по плотности правой бедренной кости у животных групп «ТС» и «ТС+Изоляция» обнаружено не было.

Уровень свободного оксипролина в плазме крыс группы «ТС» был выше, чем в контроле (+29,2%,  $p=0,001$ ) и в группе «ТС+Изоляция» (+21,8%,  $p=0,004$ ), что указывало на активное протекание процессов костной резорбции (табл. 2). У животных группы «ТС+Изоляция» уровень свободного оксипролина в плазме не отличался от контрольных значений. Уровень белковосвязанного оксипролина в плазме крыс групп «Контроль», «ТС» и «ТС+Изоляция» не отличался.

У крыс группы «ТС» зарегистрированы меньшие, чем в контроле, уровень кальция (-19,4%,  $p=0,022$ ) и активность ЩФ (-43,1%,  $p=0,023$ ) в сыворотке, и большие относительно контроля уровень фосфора (+30,8%,  $p=0,049$ ) и активность КФ (+55,7%,  $p=0,044$ ) в сыворотке. У крыс группы «ТС+Изоляция»

уровень кальция и фосфора в сыворотке, а также активности ЩФ и КФ в сыворотке не отличались от контроля и значений показателей в группе «ТС». Уровень магния в крови крыс групп «Контроль» «ТС» и «ТС+Изоляция» не отличался.

### Обсуждение результатов

В проведённом исследовании 30-суточная социальная изоляция не оказывала стрессующего эффекта, определяющегося по относительным массам левого надпочечника и тимуса, уровню 11-ОКС в плазме и содержанию адреналина в надпочечнике. Это обусловлено тем, что эффект социальной изоляции у крыс зависит от возраста, в котором животное подвергается воздействию. Так, социальная изоляция животных в возрасте 21-го дня после рождения приводит к нарушению поведения и может рассматриваться в качестве экспериментальной модели повышенной агрессивности с признаками когнитивного дефицита [12]. Начиная с 30-го дня после рождения, социальная изоляция снижает тревожность и ослабляет реакцию животных в условиях стресса [32].

В настоящем эксперименте социальная изоляция снижала тревожность животных в виде уменьшения латентного периода выхода из центра «открытого поля» и уменьшения длительности груминга. Длительность груминга рассматривается как показатель смещённой активности у грызунов [27], поэтому снижение этого показателя может свидетельствовать об уменьшении дезадаптации животных в условиях эмоционального стресса, вызванного помещением в «открытое поле».

На уровне регуляторных систем социальная изоляция снижала активность

ГГНС в виде уменьшения уровня 11-ОКС в крови и содержания гормонов в надпочечнике. Изменение обоих показателей свидетельствует о снижении синтеза и секреции гормонов, т.к. глюкокортикоиды синтезируются и секретуются клетками пучковой зоны коры надпочечников, но не депонируются в них [29]. Вместе с этим социальная изоляция снижала активность САС, о чем свидетельствовало увеличение содержания адреналина в надпочечниках и гликогена в печени, снижение содержания МДА в печени. Уменьшение тревожности, а также снижение функциональной активности ГГНС и САС животных, содержащихся в социальной изоляции, было ассоциировано со снижением содержания норадреналина в головном мозге. По-видимому, социальная изоляция снижала активность клеток голубого пятна и др. групп норадренергических нейронов мозга, регулирующих активность ГГНС и САС [28] и влияющих на тревожность [22].

Снижение функциональной активности ГГНС и САС у крыс, подвергавшихся социальной изоляции, усиливало пластический обмен животных, что проявлялось в увеличении содержания гликогена в печени, а также в увеличении прироста массы тела животных опытной группы по сравнению с контролем. Вероятно, усилением пластического обмена объясняется увеличение плотности бедренной кости крыс, подвергавшихся изоляции. В совокупности изменения, обусловленные социальной изоляцией у животных, можно рассматривать как увеличение резерва адаптации [5].

Многokратное термическое воздействие вызывало стрессовую реакцию, обнаруживающуюся по увеличению от-

носительной массы левого надпочечника и снижению относительной массы тимуса у животных. Вместе с этим у крыс наблюдались увеличение содержания 11-ОКС в крови и надпочечнике, снижение уровня адреналина в надпочечнике, содержания гликогена в печени, увеличение содержания МДА в печени, свидетельствующие об активации ГГНС и САС. На фоне термического стресса у животных обнаруживалась повышенная резорбция костной ткани, о чём свидетельствовало увеличение уровня свободного оксипролина в плазме – маркера деградации коллагена первого типа [3]; повышение активности КФ, увеличение уровня фосфора и снижение уровня кальция в сыворотке. При этом активность процессов синтеза костного матрикса, по-видимому, не повышалась, т.к. у крыс, подвергавшихся термическому стрессу, уровень белковосвязанного оксипролина в плазме – маркера синтеза коллагена первого типа [3] – не отличался от контроля, а активность ЩФ в сыворотке была даже меньше, чем в контроле. На органном уровне описанные процессы снижали плотность бедренной кости. Эти результаты согласуются с данными, полученными нами ранее [8, 15], а также данными др. авторов [31] и, вероятно, объясняются влиянием глюкокортикоидов [26] и катехоламинов [30] на клетки костной ткани.

У крыс, содержащихся в изоляции, термическое воздействие вызывало стрессовую реакцию в виде увеличения относительной массы левого надпочечника и уменьшения тимуса. В то же время содержание в изоляции снижало реактивность ГГНС при термическом воздействии, а также периферические эффекты катехоламинов, оцениваемые

по содержанию гликогена и МДА в печени, хотя содержание животных в социальной изоляции не влияло на активацию САС в виде снижения адреналина в надпочечнике при термическом стрессе. У животных, содержащихся в изоляции, при термическом стрессе не было обнаружено изменения биохимических маркеров метаболизма костной ткани, тем не менее, термическое воздействие снижало плотность бедренной кости. Отсутствие сдвигов биохимических маркеров метаболизма костной ткани, по-видимому, указывает на более быстрое торможение костной резорбции после прекращения действия стрессора и вместе со снижением тревожности может рассматриваться в качестве благоприятного эффекта социальной изоляции.

### Выводы

По результатам проведённого исследования можно заключить, что социальная изоляция крыс в возрасте 2-2,5 мес. приводила к снижению тревожности, активировала пластический обмен и увеличивала резерв адаптации. Многократное термическое воздействие вызывало стрессовую реакцию у крыс и усиливало резорбцию костной ткани. У животных, содержащихся в изоляции, наблюдались меньшая по сравнению с животными группового содержания активация систем, обеспечивающих адаптацию, и отсутствие сдвигов показателей метаболизма костной ткани в крови при термическом стрессе. Хотя социальная изоляция не влияла на увеличение относительной массы левого надпочечника, снижение относительной массы тимуса и уменьшение плотности бедренной кости при стрессе.

### Список литературы

1. *Автандилов Г.Г.* Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 238 с.
2. *Воробьева О.В.* Стресс-индуцированные психовегетативные реакции // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13. – № 12. – С. 798-801.
3. *Герасимов А.М., Фурцева Л.Н.* Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
4. *Гриневич В.В., Акмаев И.Г., Волкова О.В.* Основы взаимодействия нервной эндокринной и иммунной систем. – СПб: Symposium, 2004. – 159 с.
5. *Давиденко Д.Н.* Проблема резервов адаптации организма спортсмена // Ученые записки университета им. П.Ф. Лесгафта. – 2005. – № 18. – С. 15-24.
6. *Еникеев Д.А., Порядин Г.В.* Патофизиология экстремальных и терминальных состояний // В кн.: Патофизиология. Т. 3. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 302 с.
7. *Жуков Д.А.* Биологические основы поведения. Гуморальные механизмы. – СПб: Издательство Р.Асланова «Юридический центр Пресс», 2004. – 457 с.
8. *Иванов Д.Г., Подковкин В.Г.* Влияние феназепема на метаболизм коллагена у крыс при тепловой нагрузке // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2. – С. 282-283.
9. *Иванов Д.Г., Семенов А.Н., Зайцева М.С.* Методика определения социального статуса самцов крыс в триадах // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 9. – С. 43-46.
10. *Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б.* Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции / Под ред. Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба. – М., СПб: Айсинг, 2013. – 288 с.
11. *Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В.* Тест открытого поля как прогностический критерий устойчивости к эмоциональному стрессу у крыс линии Вистар // Журнал высшей нервной деятельности. – 1995. – Т. 45. – Вып. 4. – С. 775-781.
12. *Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Орлова И.Н.* Ранняя социальная изоляция увеличивает агрессивность и нарушает кратковременное привыкание у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – Т. 59. – № 4. – С. 4-15.

13. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Миньшикова. – М., 1987. – 226 с.
14. Остеопороз / Под ред. О.М. Лесняк, Л.И. Беневоленской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 272 с.
15. Подковкин В.Г., Иванов Д.Г. Состояние коры надпочечников и динамика содержания оксипролина у крыс при термическом воздействии // Вестник Самарского государственного университета. – 2006. – № 9. – С. 237-242.
16. Реан А.А., Кудашев А.Р., Баранов А.А. Психология адаптации личности. Анализ. Теория. Практика. – СПб: Прайм-Еврознак, 2006. – 479 с.
17. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
18. Соловьева Г.А., Зайцева Н.Н., Теленёва В.И. Углеводы и липиды // Практ. по биохимии. – М.: Издательство Московского университета, 1989. – С. 5-78.
19. Судаков К.В., Умрюхин П.Е. Системные механизмы эмоционального стресса. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 112 с.
20. Узлова М.В., Подковкин В.Г., Суздальцева Т.В., Лимарева Л.В., Захарова Е.М. Биохимические и иммунологические методы оценки регулирующих систем организма. – Куйбышев, 1989. – 32 с.
21. Фейнгерберг И.М. Мозг. Психика. Здоровье. – М.: Наука, 1972. – 112 с.
22. Borges G., Neto F., Mico J.A., Berrocoso E. Reversal of monoarthritis-induced affective disorders by diclofenac in rats // Anesthesiology. – 2014. – V. 120. – Pp. 1476-1490.
23. Brain P.F., Benton D. Conditions of housing, hormones and aggressive behavior // Hormones and aggressive behavior. – NY: Plenum Press, 1983. – Pp. 351-373.
24. Chrousos G.P. Stress and disorders of the stress system // Nat. Rev. Endocrinol. – 2009. – V. 5. – Pp. 374-381.
25. Everds N.E., Snyder P.W., Bailey K.L., Bolton B., Creasy D.M., Foley G.L., Rosol T.J., Sellers T. Interpreting Stress Responses during Routine Toxicity Studies: A Review of the Biology, Impact, and Assessment // Toxicologic Pathology. – 2013. – V. 41. – Pp. 560-614.
26. Frenkel B., White W., Tuckermann J. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis // Glucocorticoid Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology 872. – NY: Springer Science+Business Media, 2015. – Pp. 179-215.
27. Kalueff A.V., Stewart A.M., Song C., Berridge K.C., Graybiel A.M., Fentress J.C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience // Nature Reviews: Neuroscience. – 2016. – V. 17. – Pp. 45-59.
28. Sawchenko P.E., Li H.Y., Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms // Prog. Brain Res. – 2000. – V. 122. – Pp. 61-78.
29. Stocco D.M., Clark B.J. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis // Biochem Pharmacol. – 1996. – V. 51. – No. 3. – Pp. 197-205.
30. Togari A., Arai M. Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption // J. Pharmacol. Sci. – 2008. – No. 106. – Pp. 542-546.
31. Valente F.L., Ferreira A.P.B.R., Costa L.D., Louzada M.J.Q., Patarroyo J.H., Vargas M.I. Effects of chronic mild stress on parameters of bone assessment in adult male and female rats // Pesquisa Veterinária Brasileira. – 2016. – V. 36. – Pp. 106-112.
32. Weintraub A., Singaravelu J., Bhatnagar S. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity // Brain Research. – 2010. – V. 1343. – Pp. 83-92.

## References

1. Avtandilov G.G. Osnovy kolichestvennoi patologicheskoi anatomii [The basis of quantitative pathologic anatomy]. Moscow: Medicine. 2002. 238 p. (In Russian).
2. Vorobeva O.V. Stress-indutsirovannye psikovegetativnye reaktsii [Stress induced psychovegetative reactions]. Russkij medicinskij zhurnal [Russian Medical Journal]. 2005. V. 13. No. 12. Pp. 798-801. (In Russian).
3. Gerasimov A.M., Furtseva L.N. Biokhimicheskaya diagnostika v travmatologii i ortopedii [Biochemical diagnostic in traumatology and orthopedy]. Moscow: Medicine, 1986. 240 p. (In Russian).
4. Grinevich V.V., Akmaev I.G., Volkova O.V. Osnovy vzaimodeystviya nervnoy endokrinnoy i immunoy sistem [The basis of interaction nerve, endocrine and immune systems]. Saint-Petersburg: Symposium. 2004. 159 p. (In Russian).
5. Davidenko D.N. Problema rezervov adaptatsii organizma sportsmena [The problem of adaptation reserves of an athlete]. Uchenye zapiski universiteta im. P.F. Lesgafta [Scientific notes

- of the university of P.F. Lesgaft]. 2005. No. 18. P. 15-24. (In Russian).
6. **Yenikeev D.A., Poryadin G.V.** Patofiziologiya ekstremalnykh i terminalnykh sostoyaniy [Pathophysiology of extremal and terminal states]. V knige: Patofiziologiya. T. 3 [In the book: Pathophysiology. V. 3]. Moscow: Izdatel'skij centr «Akademija», 2006. 302 p. (In Russian).
  7. **Zhukov D.A.** Biologicheskie osnovy povedeniya. Gumoralnye mekhanizmy [Biological basis of behavior. Humoral mechanisms]. Saint-Petersburg: Izdatel'stvo R.Aslanova «Juridicheskij centr Press», 2004. 457 p. (In Russian).
  8. **Ivanov D.G., Podkovkin V.G.** Vliyanie fenazepama na metabolizm kollagena u krys pri teplovoj nagruzke [The phenazepam effect on collagen metabolism in rat under thermal load]. Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki [Journal of Ural Medical Academic Science]. 2009. No. 2. Pp. 282-283. (In Russian).
  9. **Ivanov D.G., Semenov A.N., Zaytseva M.S.** Metodika opredeleniya sotsialnogo statusa samtsov krys v triadakh [The method of mail rat social status determination in triads]. Uspehi sovremennogo estestvoznaniya [Advances in current natural sciences]. 2014. No. 9. P. 43-46. (In Russian).
  10. **Karkischenko N.N., Uyba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B.** Ocherki sportivnoy farmakologii. T. 1. Vektory ekstrapolyatsii [Essays of sport pharmacology. V. 1. The vectors of extrapolation]. Ed. by N.N. Karkischenko, V.V. Uyba. Moscow, Saint-Petersburg: Aysing, 2013. 288 p. (In Russian).
  11. **Koplik E.V., Salieva R.M., Gorbunova A.V.** Test otkrytogo polya kak prognosticheskij kriteriy ustoychivosti k emotsionalnomu stressu u krys linii Vistar [The open-field test as a prognostic criterion of resistance to emotional stress in Wistar rats]. Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti [J. of Higher Nervous Activity]. 1995. V. 45. No. 4. Pp. 775-781. (In Russian).
  12. **Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Orlova I.N.** Rannaya sotsialnaya izolyatsiya uvelichivaet agressivnost i narushaet kratkovremennoe privykanie u krys [Early social isolation increases aggression and impairs a short-term habituation in acoustic startle reflex in rats]. Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija [J. of Pathophysiology and Experimental Therapy]. 2015. V. 59. No. 4. Pp. 4-15. (In Russian).
  13. **Laboratornye metody issledovaniya v klinike.** Spravochnik [The laboratory methods of investigation in clinic. Directory]. Ed. by V.V. Menshikov. Moscow. 1987. 226 p. (In Russian)
  14. **Osteoporoz [Osteoporosis].** Ed. by O.M. Lesnyak, L.I. Benevolenskaya. Moscow: GEOTAR-Media. 2009. 272 p. (In Russian).
  15. **Podkovkin V.G., Ivanov D.G.** Sostoyanie kory nadpochechnikov i dinamika sodержaniya oksiprolina u krys pri termicheskom vozdeystvii [Adrenals state and oxiprolin content dynamics of rats under temperature effect]. Vestnik Samarskogo gosudarstvennogo universiteta [Bulletin of Samara State University]. 2006. No. 9. Pp. 237-242. (In Russian).
  16. **Rean A.A., Kudashev A.R., Baranov A.A.** Psihologiya adaptatsii lichnosti. Analiz. Teoriya. Praktika [The psychology of personality adaptation. Analysis. Theory. Practice]. Saint-Petersburg: Praym-Yevroznak. 2006. 479 p. (In Russian).
  17. **Sovremennye metody v biokhimii [Current methods in biochemistry].** Ed. by V.N. Orekhovich. Moscow: Medicine, 1977. 392 p. (In Russian).
  18. **Soloveva G.A., Zaytseva N.N., Telepneva V.I.** Uglevody i lipidy [Carbohydrates and lipids]. Prakt. po biokhimii [Biochemical practicum]. Moscow: Izdatelstvo Moskovskogo universiteta. 1989. Pp. 5-78. (In Russian).
  19. **Sudakov K.V., Umryukhin P.E.** Sistemnye mekhanizmy emotsionalnogo stressa [The systemic mechanisms of emotional stress]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 112 p. (In Russian).
  20. **Uglova M.V., Podkovkin V.G., Suzdaltseva T.V., Limareva L.V., Zakharova E.M.** Biokhimicheskie i immunologicheskie metody otsenki reguliruyushchikh sistem organizma [The biochemical and immunological methods of organism regulatory systems assessment]. Kuybyshev. 1989. 32 p. (In Russian).
  21. **Feyngerberg I.M.** Mozg. Psikhika. Zdorove [Braine. Psyche. Healph]. Moscow: Nauka. 1972. 112 p. (In Russian).
  22. **Borges G., Neto F., Mico J.A., Berrocoso E.** Reversal of monoarthritis-induced affective disorders by diclofenac in rats. Anesthesiology. 2014. V. 120. Pp. 1476-1490.
  23. **Brain P.F., Benton D.** Conditions of housing, hormons and aggressive behavior. Hormons and aggressive behavior. NY: Plenum Press, 1983. Pp. 351-373.
  24. **Chrousos G.P.** Stress and disorders of the stress system. Nat. Rev. Endocrinol. 2009. V. 5. Pp. 374-381.

25. *Everds N.E., Snyder P.W., Bailey K.L., Bolton B., Creasy D.M., Foley G.L., Rosol T.J., Sellers T.* Interpreting Stress Responses during Routine Toxicity Studies: A Review of the Biology, Impact, and Assessment. *Toxicologic Pathology*. 2013. V. 41. Pp. 560-614.
26. *Frenkel B., White W., Tuckermann J.* Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Glucocorticoid Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology* 872. NY: Springer Science+Business Media, 2015. Pp. 179-215.
27. *Kalueff A.V., Stewart A.M., Song C., Beridge K.C., Graybiel A.M., Fentress J.C.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews: Neuroscience*. 2016. V. 17. Pp. 45-59.
28. *Sawchenko P.E., Li H.Y., Ericsson A.* Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog. Brain Res*. 2000. V. 122. Pp. 61-78.
29. *Stocco D.M., Clark B.J.* Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol*. 1996. V. 51. No. 3. Pp. 197-205.
30. *Togari A., Arai M.* Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption. *J. Pharmacol. Sci*. 2008. No. 106. Pp. 542-546.
31. *Valente F.L., Ferreira A.P.B.R., Costa L.D., Louzada M.J.Q., Patarroyo J.H., Vargas M.I.* Effects of chronic mild stress on parameters of bone assessment in adult male and female rats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2016. V. 36. Pp. 106-112.
32. *Weintraub A., Singaravelu J., Bhatnagar S.* Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Research*. 2010. V. 1343. Pp. 83-92.

## **The social isolation effect on endurance to stress and bone resorption in rat under thermal stress**

**D.G. Ivanov, N.V. Alexandrovskaya**

The social isolation effect on endurance to stress and bone resorption in rat under thermal stress was investigated. The rats 2-2.5 months old were placed in social isolation for 30 days. The influence of daily thermal stress for 7 day on rats that were being in social isolation or in group was studied. The social isolation decreased of rat anxiety in open field, declined of blood and adrenal 11-oxycorticosteroids level, brain norepinephrine level and elevated adrenal epinephrine level, blood calcium level and femur density. In group being rat thermal load activated hypothalamo-pituitary-adrenal axis and sympathoadrenal system, elevated bone resorption, that were observed in increase of blood free hydroxyproline level, alkaline phosphatase activity and blood phosphorus level, reduction of blood calcium level and femur density. In rats that were underwent social isolation thermal load induced no changes of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and bone resorption biochemical parameters, but elevated left adrenal relative mass and decreased femur density. This result suggest of positive social isolation effect on endurance to stress and bone resorption in rat under thermal stress.

**Key words:** rat, social isolation, stress, bone resorption.

## Влияние транскраниальной электростимуляции на выносливость крыс с разной устойчивостью к стрессу

А.С. Липатова, П.П. Поляков, А.Х. Каде, А.И. Трофименко,  
С.В. Кравченко

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
Краснодар

Контактная информация: к.м.н. Трофименко Артем Иванович, [artemtrofimenko@mail.ru](mailto:artemtrofimenko@mail.ru)

---

Транскраниальная электростимуляция (ТЭС-терапия) является современным неинвазивным методом физиотерапии, селективно активирующим опиоидергическую систему. В работе приводятся данные о влиянии ТЭС-терапии на выносливость крыс с разной устойчивостью к стрессу по результатам теста вынужденного плавания с грузом. В первом тесте вынужденного плавания проведено разделение крыс на группы низкой, средней и высокой стрессоустойчивости. После пяти сеансов ТЭС-терапии проводилась повторная оценка выносливости животных в тесте вынужденного плавания с грузом. Анализ времени плавания показал положительное влияние ТЭС-терапии на выносливость крыс, особенно выраженный эффект наблюдался в группах животных с низкой и высокой устойчивостью к стрессу.

**Ключевые слова:** ТЭС-терапия, стресс, крыса, выносливость,  $\beta$ -эндорфин, опиоидные пептиды, тест вынужденного плавания.

---

### Введение

Поиск новых, безопасных методов повышения физической выносливости, работоспособности и устойчивости организма к воздействию экстремальных факторов является одним из актуальных вопросов современного здравоохранения [2, 4, 11]. С этой позиции особую значимость приобретают методы транскраниальной стимуляции структур головного мозга, т.к. они практически лишены побочных эффектов, характерных для медикаментозной терапии, и при этом просты в применении.

История применения слабого постоянного тока для стимуляции структур головного мозга начинается с XIX века и связана с именами таких корифеев медицинской науки, как Верно Б.Ф.,

Пфлюгер Э.Ф., Введенский Н.Е., Ухтомский А.А., Бехтерев В.М. [1].

В литературе для обозначения процедур неинвазивной электростимуляции структур головного мозга постоянным током с плотностью 0,01-0,3 мА/см<sup>2</sup> используются такие термины, как гальванизация, микрополяризация, транскраниальная микрополяризация, транскраниальная электростимуляция, transcranial direct current stimulation, cranial electrotherapy, non-invasive neurostimulation, brain stimulation [1, 12].

В СССР изучение психофизиологических эффектов транскраниальной электростимуляции началось с конца 70-х гг. прошлого века, а одним из первых зарубежных исследований по данной теме является опубликованная в 1966 г. статья

D. Albert [9]. Одним из первых зарубежных обзоров по исследованию психофизиологических эффектов транскраниальной электростимуляции при лечении депрессии является вышедшая в 2002 г. статья М.А. Nitsche [14].

Прорывом в развитии методов транскраниальной электростимуляции является открытие селективной активации структур антиноцицептивной системы ствола головного мозга под влиянием тока особых характеристик, сделанное в начале 80-х гг. прошлого века на базе Института физиологии им. И.П. Павлова РАН коллективом исследователей под руководством д.м.н., проф. В.П. Лебедева. Так «родился» метод транскраниальной электростимуляции эндорфинергических механизмов мозга (ТЭС-терапия) [4, 5].

Дальнейшие исследования показали связь эффектов стимуляции ствола головного мозга через покровы черепа с активацией эндогенной опиоидергической системы, подтвердили строгую зависимость лечебного эффекта от способа наложения электродов (фронтально-мастоидальное), параметров используемого тока (чередование постоянного тока силой 3 мА, плотностью 0,01 мА/см<sup>2</sup> и импульсного тока силой 1,5-2 мА, частотой 77 Гц, при длительности импульса  $3,75 \pm 0,25$  мс, в соотношении 2-5:1), направления тока, выделения эндогенных опиоидных пептидов (прежде всего,  $\beta$ -эндорфина) [4]. При проведении клинических испытаний ТЭС-терапия показала эффективность при разных видах патологии, что обусловлено наличием анальгетического, иммуностропного, онкостатического, органопротективного, стресс-протекторного, гомеостатического эффектов. Метод ТЭС-терапии

вошел в клиническую практику России и стран СНГ, промышленностью освоен выпуск ряда модификаций приборов для ее проведения (ЭТРАНС, ТРАНСАИР) [2].

За рубежом бум исследований методик транскраниальной электростимуляции начался в двухтысячных годах и связан с интересом Агентства по разработке перспективных вооружений США (DARPA) к ее использованию с целью улучшения и коррекции нарушений психофизиологического состояния военнослужащих [10, 12, 16].

В 2013 г. на территории США зарегистрирована компания «Halo Neuroscience», которая стала массово производить электростимулятор «Halo Sport System» для проведения транскраниальной микрополяризации (tDCS). Знаковым событием в популяризации метода стало использование данного аппарата командой олимпийской сборной США на Олимпиаде 2016 г. в Бразилии [15].

В настоящее время интенсивность исследований, проводящихся в мире по данному направлению, наглядно демонстрирует наличие около пятисот обзорных статей, вышедших за последние 5 лет, индексируемых по базе PubMed Национального Института Здоровья США.

**Цель** исследования – изучить влияние ТЭС-терапии на результаты теста вынужденного плавания у крыс с разной устойчивостью к стрессу.

### **Материалы и методы**

Исследование выполнено в лаборатории кафедры общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Экспе-

рименты проведены на 176-ти трехмесячных самцах белых нелинейных крыс средней массой  $195 \pm 15$  г. Содержание животных и постановка экспериментов проводились на базе вивария, в условиях 12-часового светового дня, размещение по 5 особей в клетке, в условиях свободного доступа к воде и корму в соответствии с требованиями приказа Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Для оценки физической выносливости крыс в условиях стресса мы использовали тест вынужденного плавания в модификации ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [7]. Перед началом эксперимента животное взвешивали, затем к основанию хвоста прикрепляли груз, составляющий 10% от массы тела. Для этого на резиновое кольцо (резиновые тяги для брекетов «Бурундук») завязывали капроновую нить длиной 10 см, другой конец нити привязывали к грузу (болты с накрученными на них гайками). Затем животное аккуратно помещали в квадратный в сечении стеклянный сосуд  $25 \times 25 \times 60$  см с высотой столба воды 45 см и температурой воды  $28^\circ\text{C}$  [3, 7]. Оценку физической выносливости крыс осуществляли путем определения времени плавания до полного утомления, критериями которого служили: погружение на дно сосуда, нарушение координации, вращение вокруг своей оси и пускание пузырей, невозможность всплыть на поверхность и адинамиа более 10 сек. После проведения исследования животных извлекали из воды, обсушивали полотенцем и помещали в клетку, подогретую термоодеялом.

По результатам первого теста вынужденного плавания крысы поделены на следующие группы: группа 1 – низкой стрессоустойчивости (время плавания до полного утомления – до 25-го перцентиля), группа 2 – средней стрессоустойчивости (время плавания – между 25-м и 75-м перцентилями), группа 3 – высокой стрессоустойчивости (выше 75-го перцентиля).

Далее животные каждой из групп случайным образом были поделены на две подгруппы: сравнения (без ТЭС-терапии) и опытную (с ТЭС-терапией). Крысы из опытной группы в течение пяти дней получали сеансы ТЭС-терапии. На 7-е сутки эксперимента проводили тест вынужденного плавания повторно.

Продолжительность первого сеанса ТЭС-терапии составляла 15 мин, последующих – по 30 мин. ТЭС-терапию проводили с помощью модифицированного двухпрограммного электростимулятора «ТРАНСАИР-03» (ООО «Центр транскраниальной электростимуляции», Санкт-Петербург) в собственной модификации. Использованы следующие параметры ТЭС-терапии: частота тока  $70 \pm 2$  Гц, длительность импульса  $3,75 \pm 0,25$  мс, величина суммарного тока 1 мА [5, 6].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакетов программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0. Для проверки гипотезы о гауссовом (нормальном) распределении показателей в исследуемых группах использовали критерий Шапиро-Уилка. В связи с тем, что распределение значений исследуемых показателей в группах отличалось от нормального закона, применялись методы непараметрической

статистики. Полученные результаты исследуемых групп после статистической обработки выражали в виде медианы (Me) с использованием 25-го и 75-го перцентилей (P25 и P75). Для проверки нулевой гипотезы об отсутствии статистически значимых различий при парных сравнениях зависимых групп использовали критерий Вилкоксона (W-test), а для оценки межгрупповых различий независимых групп применяли критерий Краскера-Уоллиса (K-W-tets), в обоих случаях – с установлением критического уровня значимости  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

При анализе длительности первого теста вынужденного плавания крысы были распределены на следующие группы: группа 1 (низкой стрессоустойчивости) – 24,4%, группа 2 (средней стрессоустойчивости) – 51,7% и группа 3 (высокой стрессоустойчивости) – 23,9% (табл. 1).

Подобное распределение согласуется с данными литературы: так, при исследовании физической выносливости крыс в условиях стресса и запредельных нагрузок по 25% животных приходится на группы низкой и высокой устойчивости к стрессу [3, 7].

При анализе времени плавания в группе 1 (животные с низкой стрессоустойчивостью) статистически значимых различий между подгруппами сравнения и опытной по результатам 1-го теста, а также подгруппой сравнения по результатам 2-го теста нет ( $p > 0,05$ ). В опытной подгруппе наблюдается статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) увеличение времени плавания на 25,3%, в отличие от подгруппы сравнения и исходных данных (табл. 2). Позитивное эрготропное влияние ТЭС-терапии связано с активацией эндогенной опиоидергической системы и увеличением продукции  $\beta$ -эндорфина [5, 8].

Таблица 1

#### Показатели крыс по результатам первого теста вынужденного плавания

| Показатель      | Общее | Группа 1 | Группа 2 | Группа 3 |
|-----------------|-------|----------|----------|----------|
| Кол-во животных | 176   | 43       | 91       | 42       |
| Me              | 234   | 161      | 235      | 2843     |
| P25             | 184   | 145      | 208      | 486      |
| P75             | 371   | 171      | 266      | 6082     |

Таблица 2

#### Время плавания крыс группы 1 (с низкой устойчивостью к стрессу), сек.

| Время, сек. | 1-й тест         |                | 2-й тест         |                |
|-------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
|             | группа сравнения | опытная группа | группа сравнения | опытная группа |
| N крыс      | 16               | 17             | 16               | 17             |
| Me          | 161,5            | 151,0          | 166,5            | 223,0          |
| P25         | 146,5            | 122,0          | 160,0            | 168,0          |
| P75         | 171,5            | 166,0          | 215,5            | 274,0          |
| W-test      | -----            | -----          | 0,051            | 0,001          |

Известно, что  $\beta$ -эндорфин – важнейший медиатор центральной антиноцицептивной системы – играет ключевую роль в коррекции стресс-зависимых психофизиологических нарушений, в т.ч., за счет воздействия на систему вознаграждения [13].

При анализе времени плавания в группе 2 (животные со средней устойчивостью к стрессу) статистически значимых ( $p > 0,05$ ) различий между подгруппами сравнения и опытной по результатам 1-го теста, а также подгруппой сравнения по результатам 2-го теста вынужденного плавания нет. В подгруппе крыс, получавших сеансы ТЭС-терапии, наблюдается статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) увеличение времени плавания на 23% в сравнении с подгруппой без ТЭС-терапии и исходными данными (табл. 3).

Оценка межгрупповых корреляций с помощью критерия Краскера-Уоллиса при попарном сравнении между подгруппами показывает статистически значимое различие между группами с низкой и средней устойчивостью к стрессу ( $p_{1,2} = 0,045$ ). В опытных подгруппах различия статистически высоко значимы ( $p < 0,001$ ) между группами с низкой и средней устойчивостью ( $p_{1,2} = 0,016$ ).

Таким образом, помимо имеющихся в литературе данных о модулирующей роли опиоидных пептидов исключительно при патологии, мы обнаружили, что стимуляция эндогенной опиоидергической системы значительно повышает выносливость крыс и со средней устойчивостью к стрессу.

При анализе продолжительности теста в группе 3 (животные с высокой устойчивостью к стрессу) обнаружено, что статистически значимых различий результатам 1-го теста вынужденного плавания между подгруппами нет ( $p > 0,05$ ). При сравнении результатов в подгруппе без ТЭС-терапии по результатам 1-го и 2-го теста наблюдается статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) снижение выносливости в 11,7 раза, что свидетельствует о срыве адаптации у животных с высокой устойчивостью к стрессу.

По данным литературы, описанные изменения в виде резкого снижения выносливости при повторном проведении плавательного теста у высокоустойчивых к стрессу животных в значительной степени определяются сопутствующими дистрессу изменениями в симпатoadреналовой системе, обусловленными ее гиперактивацией [17].

Таблица 3

Время плавания крыс группы 2 (со средней устойчивостью к стрессу), сек.

| Время, сек. | 1-й тест         |                | 2-й тест         |                |
|-------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
|             | группа сравнения | опытная группа | группа сравнения | опытная группа |
| N крыс      | 34               | 33             | 34               | 33             |
| Me          | 243              | 232            | 227              | 296            |
| P25         | 216              | 201            | 181              | 229            |
| P75         | 264              | 266            | 274              | 479            |
| W-test      | ----             | ----           | 0,5670           | 0,0005         |

Время плавания крыс группы 3 (с высокой устойчивостью к стрессу), сек.

| Время, сек. | 1-й тест         |                | 2-й тест         |                |
|-------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
|             | группа сравнения | опытная группа | группа сравнения | опытная группа |
| N крыс      | 17               | 15             | 17               | 15             |
| Me          | 2954             | 3720           | 253              | 6694           |
| P25         | 486              | 478            | 193              | 2438           |
| P75         | 5851             | 6932           | 402              | 8790           |
| W-test      | -----            | -----          | 0,010            | 0,002          |

В подгруппе крыс, получавших сеансы ТЭС-терапии, отмечено статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) увеличение времени плавания в 2 раза в сравнении с исходными показателями и в 26,5 раз – в сравнении с подгруппой без ТЭС (табл. 4).

Оценка данных по подгруппам сравнения с помощью критерия Краскера-Уоллиса показывает наличие статистически значимого различия между группами с низкой и средней устойчивостью к стрессу ( $p_{1,2} = 0,045$ ), тогда как между группами со средней и высокой устойчивостью ( $p_{2,3} = 0,2$ ) и низкой и высокой устойчивостью ( $p_{1,3} = 0,08$ ) их нет. В опытных подгруппах различия статистически значимы ( $p < 0,001$ ) между исследуемыми группами: с низкой и средней устойчивостью ( $p_{1,2} = 0,0162$ ), средней и высокой устойчивостью ( $p_{2,3} = 0,0007$ ), низкой и высокой устойчивостью ( $p_{1,3} = 0,0001$ ).

Причиной, объясняющей положительные эффекты ТЭС-терапии, может являться модулирующее влияние  $\beta$ -эндорфина на адренергические механизмы стресса, за счет чего предупреждается их гиперактивация и предотвращается развитие дистресса.

### Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что ТЭС-терапия является перспективным методом повышения выносливости к стрессу вне зависимости от исходного уровня устойчивости и может быть рекомендована в качестве метода повышения выносливости при адаптации к экстремальным нагрузкам.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Бехтерева Н.П. Лечебная электростимуляция мозга и нервов человека. – СПб: Сова, 2008. – 378 с.
2. Занин С.А., Каде А.Х., Кадомцев Д.В., Пасечникова Е.А., Голубев В.Г., Плотникова В.В., Шаров М.А., Азаркин Е.В., Кочарян В.Э. ТЭС-терапия. Современное состояние проблемы // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 1.
3. Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Денгына С.Е., Станкова Н.В. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 72-74.
4. Лебедев В.П., Малыгин А.В., Трусов С.В. Применение ТЭС-терапии в оздоровитель-

- ных учреждениях // В сб.: Актуальные вопросы оздоровления детей и подростков. – СПб: ООО «ИнформМед». – 2014. – С. 220-223.
5. *Лебедев В.П., Савченко А.Б., Петряевская Н.В.* Об опиатном механизме транскраниальной электроанальгезии у крыс и мышей // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. – 1988. – Т. 74. – № 9. – С. 1249-1256.
6. *Липатова А.С., Поляков П.П., Каде А.Х., Занин С.А., Трофименко А.И., Малышева Т.В.* Модификация методики ТЭС-терапии для ее применения у мелких лабораторных грызунов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. – 358 с.
8. *Трофименко А.И., Каде А.Х., Мясникова В.В., Пирогова Н.П., Занин С.А.* β-эндорфин и цитокиновый профиль в динамике экспериментального ишемического инсульта // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6.
9. *Albert D.J.* The effect of spreading depression on the consolidation of learning // *Neuropsychologia*. – 1966. – Vol. 4. – Pp. 49-64.
10. *Fox D.* Neuroscience: brain buzz // *Nature News*. – 2011. – V. 472. – No. 7342. – Pp. 156-159.
11. *Greenwood B.N., Fleshner M.* Exercise, stress resistance, and central serotonergic systems // *Exercise and sport sciences reviews*. – 2011. – V. 39(3). – Pp. 140-149.
12. *Jansen J.M., Daams J.G., Koeter M.W.J., Veltman D.J., van den Brink W., Goudriaan A.E.* Effects of non-invasive neurostimulation on craving: a meta-analysis // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2013. – V. 37(10). – Pp. 2472-2480.
13. *Merenlender-Wagner A., Dikshtein Y., Yadid G.* The β-endorphin role in stress-related psychiatric disorders // *Current Drug Targets*. – 2009. – V. 10. – Pp. 1096-1108.
14. *Nitsche M.A.* Transcranial direct current stimulation: a new treatment for depression? // *Bipolar Disord.* – 2002. – V. 4(Suppl. 1). – Pp. 98-99.
15. *Reardon S.* Performance boost paves way for 'brain doping': electrical stimulation seems to boost endurance in preliminary studies // *Nature*. – 2016. – V. 531. – No. 7594. – Pp. 283-285.
16. *Volz M.S., Volz T.S., Brunoni A.R., de Oliveira J.P., Fregni F.* Analgesic effects of non-invasive brain stimulation in rodent animal models: a systematic review of translational findings // *Neuromodulation*. – 2012. – V. 15. – Pp. 283-295.
17. *Wong D.L., Tai T.C., Wong-Faull D.C., Claycomb R., Meloni E.G., Myers K.M., Kvetmanský R.* Epinephrine: A short-and long-term regulator of stress and development of illness // *Cellular and molecular neurobiology*. – 2012. – V. 32. – No. 5. – Pp. 737-748.

## References

1. *Behtereva N.P.* Lechebnaja jelektrostimuljacija mozga i nervov cheloveka [Therapeutic electrostimulation of the brain and nerves]. Saint Petersburg: Sova. 2008. 378 p. (In Russian).
2. *Zanin S.A., Kade A.H., Kadomcev D.V., Pasechnikova E.A., Golubev V.G., Plotnikova V.V., Sharov M.A., Azarkin E.V., Kocharjan V.Je.* TJeS-terapija. Sovremennoe sostojanie problemy [TEBS-therapy. Current state of the problem]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija* [Modern problems of science and education]. 2017. No. 1. (In Russian).
3. *Karkischenko V.N., Kapanadze G.D., Den'gina S.E., Stankova N.V.* Razrabotka metodiki ocenki fizicheskoj vynoslivosti melkih laboratornyh zhivotnyh dlja izuchenija adaptogennoj aktivnosti nekotoryh lekarstvennyh preparatov [Working out of a technique for physical endurance of small laboratory animals for studying of different medicine]. *Biomedicine*. 2011. No. 1. Pp. 72-74. (In Russian).
4. *Lebedev V.P., Malygin A.V., Trusov S.V.* Primenenie TJeS-terapii v ozdorovitel'nyh uchrezhdenijah [Application of TES-therapy in health facilities]. V sb.: Aktual'nye voprosy ozdorovlenija detej i podrostkov [In the book: Actual issues of health improvement for children and adolescents]. Saint Petersburg: ООО «ИнформМед». 2014. Pp. 220-223. (In Russian).
5. *Lebedev V.P., Savchenko A.B., Petryaevskaja N.V.* Ob opiatnom mehanizme transkranial'noj jelektroanal'gezii u krys i myshej [About the opiate mechanism of transcranial electroanalgesia in rats and mice]. *Fiziol. zhurn. SSSR im. I.M. Sechenova* [Sechenov Physiological J. of the USSR]. 1988. V. 74. No. 9. Pp. 1249-1256. (In Russian).
6. *Lipatova A.S., Poljakov P.P., Kade A.H., Zанин S.A., Trofimenko A.I., Malysheva T.V.* Modifikacija metodiki TJeS-terapii dlja ee primenenija u melkih laboratornyh gryzunov

- [Modification of the procedure TES-therapy for its use in small laboratory rodents]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2015. No. 5. (In Russian)
7. *Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomedicinskih issledovaniyah* [Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil'-2S. 2010. 358 p. (In Russian).
  8. *Trofimenko A.I., Kade A.H., Mjasnikova V.V., Pirogova N.P., Zanin S.A.*  $\beta$ -jendorfin i citokinovyj profil' v dinamike jeksperimental'nogo ishemičeskogo insul'ta [ $\beta$ -endorphin and cytokine profile in the dynamics of experimental ischemic stroke]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2014. No. 6. (In Russian).
  9. *Albert D.J.* The effect of spreading depression on the consolidation of learning. *Neuropsychologia*. 1966. Vol. 4. Pp. 49-64.
  10. *Fox D.* Neuroscience: brain buzz. *Nature News*. 2011. V. 472. No. 7342. Pp. 156-159.
  11. *Greenwood B.N., Fleshner M.* Exercise, stress resistance, and central serotonergic systems. *Exercise and sport sciences reviews*. 2011. V. 39(3). Pp. 140-149.
  12. *Jansen J.M., Daams J.G., Koeter M.W.J., Veltman D.J., van den Brink W., Goudriaan A.E.* Effects of non-invasive neurostimulation on craving: a meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2013. V. 37(10). Pp. 2472-2480.
  13. *Merenlender-Wagner A., Dikshstein Y., Yadid G.* The  $\beta$ -endorphin role in stress-related psychiatric disorders. *Current Drug Targets*. 2009. V. 10. Pp. 1096-1108.
  14. *Nitsche M.A.* Transcranial direct current stimulation: a new treatment for depression? *Bipolar Disord*. 2002. V. 4(Suppl. 1). Pp. 98-99.
  15. *Reardon S.* Performance boost paves way for 'brain doping': electrical stimulation seems to boost endurance in preliminary studies. *Nature*. 2016. V. 531. No. 7594. Pp. 283-285.
  16. *Volz M.S., Volz T.S., Brunoni A.R., de Oliveira J.P., Fregni F.* Analgesic effects of noninvasive brain stimulation in rodent animal models: a systematic review of translational findings. *Neuromodulation*. 2012. V. 15. Pp. 283-295.
  17. *Wong D.L., Tai T.C., Wong-Faull D.C., Claycomb R., Meloni E.G., Myers K.M., Kvetnansky R.* Epinephrine: A short-and long-term regulator of stress and development of illness. *Cellular and molecular neurobiology*. 2012. V. 32. No. 5. Pp. 737-748.

## The influence of transcranial direct current stimulation on the endurance of rats with different stress vulnerability

A.S. Lipatova, P.P. Poljakov, A.H. Kade, A.I. Trofimenko, S.V. Kravchenko

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a modern non-invasive method of physiotherapy leading to the selective activation of the opioidergic system. This article presents data of tDCS's influence on the endurance of rats with different vulnerability to stress. The level of vulnerability was researched by the test of a coercive swimming with freight. In the first test the division of rats into three groups of low, medium and high stress vulnerability took place. After 5 sessions of tDCS there was a reassessment of animals' vulnerability in the test of the coercive swimming with freight. Analysis of the swimming time showed a positive effect of tDCS on the endurance of rats. An especially expressed effect was observed in groups of animals with low and high stress vulnerability.

**Key words:** tDCS, stress, rat, endurance,  $\beta$ -endorphin, opioid peptides, test of a coercive swimming.

## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» принимает для публикации рукописи оригинальных научных работ обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях.

Приоритетные области и задачи научных исследований:

- разработка и внедрение новых биомедицинских технологий;
- биологическое, математическое и релевантное моделирование живых систем;
- генетическая, микробиологическая, экологическая стандартизация лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами;
- доклинические, клинические испытания и экспертиза лекарственных и иммунобиологических средств;
- создание ДНК-конструкций и новых методов генетической модификации с целью получения трансгенных, нокаутных и гуманизированных видов животных-моделей;
- проблемы репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах.

С марта 2010 года журнал «Биомедицина» включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и ученой степени кандидата наук (Перечень ВАК при Минобрнауки России).

В соответствии с решением ВАК от 15 июня 2017 года № 1-пл/1 (Приложение 2) предпочтение при публикации в журнале имеют научные труды, выполненные по специальностям *медико-биологические науки, физиология, фармацевтические науки, ветеринария и зоотехния*.

Рубрикация журнала, актуальные разделы, требования к оформлению представляемых рукописей, порядок рецензирования и сроки опубликования работ отражены в Правилах направления, рецензирования и опубликования рукописей научных работ в журнале «Биомедицина».

Во исполнение вышеуказанного решения ВАК при Минобрнауки России учредитель научного журнала «Биомедицина» – ФГБУН НЦБМТ

ФМБА России обеспечивает проверку представляемых к опубликованию рукописей на наличие неправомерных заимствований путем получения от авторов и организаций, направляющих рукопись научной работы в редакцию, информации в сопроводительных документах о нижеследующем:

- подтверждают, что работа нигде ранее не была опубликована, не направлялась и не будет направляться для опубликования в другие научные издания;
- гарантируют соблюдение авторских прав;
- несут ответственность за неправомерное использование в научной статье объектов интеллектуальной собственности, объектов авторского права в полном объеме в соответствии с действующим законодательством РФ;
- передают на неограниченный срок учредителю журнала неисключительные права на использование научной статьи путем размещения полнотекстовых сетевых версий номеров на сайте журнала в информационно-телекоммуникационной сети Интернет;
- гарантируют возможность опубликования результатов работы в открытой печати;
- выражают безусловное согласие с правилами подготовки рукописи к изданию, утвержденными редакцией журнала «Биомедицина», опубликованными и размещенными на официальном сайте журнала.

В случае обнаружения нарушений данных гарантий и обязательств наступает полное прекращение дальнейшего сотрудничества, а также иная ответственность, предусмотренная законами РФ.

Рукописи, не отвечающие перечисленным требованиям, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другой раздел или номер журнала.

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

Полная информация по журналу представлена на сайте <http://www.scbmt.ru> (раздел “Журнал «Биомедицина»”).

# Лабораторкорм

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

## Реализуем:

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



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

Доставка в любой регион России

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

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

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

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

на правах рекламы

## Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в **ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование»**, которая будет проводиться **22-23 мая 2018 г.** в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:

**143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, владение 1,**  
**тел.: (495) 561-52-64, факс: (495) 561-52-73,**  
**e-mail: scbmt@yandex.ru**

Предполагаемые темы для формирования программы Конференции:

1. **Лабораторные животные** (модели животных в биомедицинских исследованиях, биоэтические нормы и принципы в экспериментальной работе, новые методы оценки функциональных состояний животных, лабораторные животные в современных фармакологических и токсикологических исследованиях, животные-модели и модели животных в сравнительных биологических исследованиях, новые технологии содержания, требования GLP).
2. **Альтернативное и биологическое моделирование в биомедицинских исследованиях** (биологические и клеточные, математические, физико-химические модели, животные-модели).
3. **Биомедицинская безопасность** (безопасность нанобиотехнологических средств, клеточных технологий, иммунобиологических препаратов, лекарственная токсикология и безопасность фармакологических средств и фармацевтических субстанций).
4. **Новые биомедицинские технологии.**
5. **Методы биомедицинских исследований.**
6. **Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.**
7. **Биомоделирование в интересах клинической фармакологии.**

Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин, на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов. Просьба к участникам выслать материалы докладов с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения и названия доклада до 1 мая 2018 года.

### СХЕМА ПРОЕЗДА:

Адрес: **143442, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые горы, владение 1.**

Проезд по Пятницкому шоссе от станции метро «Тушинская» на автобусе 575 или маршрутном такси 460 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

От станции метро «Митино» или «Пятницкое шоссе» на автобусе 575, маршрутном такси 575, 460, 707 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок, на автобусе 32 до остановки Светлые горы.

На автомобиле: по Пятницкому шоссе (6 км от МКАД) до поворота на Светлые горы, мимо пруда, до магазина, после него поворот налево между двух прудов по дамбе прямо до Центра.

