

2

2018

MEDICINE

ISSN 2074-5982

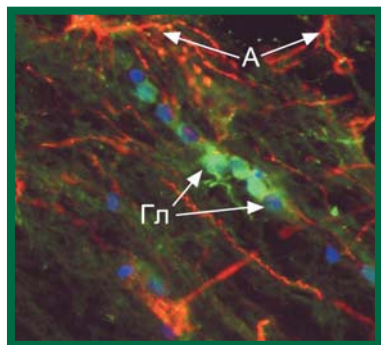
2018

2

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

22-23 мая 2018 года в Научном центре биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства состоялась **XIV ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование»**. Конференция проходила на трех площадках: в пос. Светлые горы Московской обл. – заседания симпозиума «Биомоделирование и лабораторные животные» и симпозиума «Новые биомедицинские технологии», а также пленарные заседания и «круглый стол» «Перспективы развития лабораторного животноводства», в Санкт-Петербурге на базе Химико-фармацевтической академии прошло заседание симпозиума «Прикладные биомедицинские исследования в токсикологии, фармакологии и фармации», в Москве на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) – заседание симпозиума «Современные направления повышения безопасности фармакотерапии», в Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева работала школа молодых ученых: «Человек и животные. Роль животных в природе и жизни человека».

Открыл конференцию научный руководитель ФГБУН НЦБМТ ФМБА России д.м.н., проф. Н.Н. Каркищенко с докладом «Перспективы и трудности на путях конструирования гуманизированных животных-биомоделей».

На конференцию прибыли представители Института токсикологии ФМБА России, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ, ФГАУ «ЛРЦ» Минздрава России, ФГБНУ «Научный центр неврологии», ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, НИЦ «Курчатовский Институт», Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России и др. организаций.

В работе приняло участие более 100 человек с устными и стендовыми докладами, в дискуссиях, обсуждениях на «круглом столе». Всего на симпозиумах было заслушано 35 докладов с презентациями, их последующим обсуждением и рецензированием. В школе молодых ученых выступили 18 ораторов.



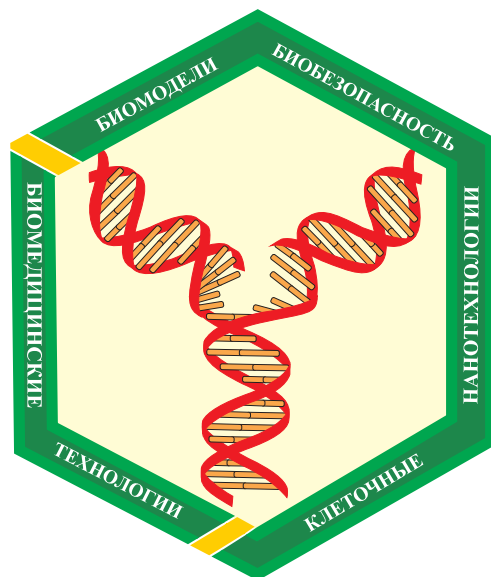
Научный журнал.

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

М.Т. Гасанов, Светлые горы МО, 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. Зефирин, Казань, Р.С. Кузденбаева, Алматы, Казахстан, В.Г. Кулес, 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 16.06.2018

Тираж 3 000 экз.

Содержание

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Е.Б. Шустов, М.Т. Гасанов, Г.Д. Капанадзе, Ю.В. Фокин, В.С. Новиков, Е.Л. Матвеевко, Х.Х. Семенов	
Пептидная биорегуляция резистентности к экстремальным воздействиям.....	4

А.Г. Берзина, Л.И. Ульянова, Н.Б. Гамалей, Н.В. Станкова, Г.Д. Капанадзе	
Изучение иммунного ответа у мини-свиней светлогорской популяции к двум производным морфина.....	15

Д.Н. Воронков, О.В. Сальникова, Р.М. Худоерков	
Локализация общего и фосфорилированного α -синуклеина в периферической нервной системе интактных крыс (тестирование антител разных клонов).....	22

Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев, В.О. Ступин, Д.Л. Тёплый	
Адрено- и холинореактивность эритроцитов и анализ их сопряжённости с показателями сердечного ритма у крыс.....	33

А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.Ю. Краснова, Д.В. Янин, А.Г. Галка, А.В. Костров	
Влияние холодной гелиевой плазмы на метаболические и физико-химические параметры крови человека <i>in vitro</i>	47

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович	
Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга.....	59

П.П. Золин, В.М. Лебедев, В.Д. Конвай	
Математическое моделирование реутилизации гипоксантина	72

А.Е. Кательникова, К.Л. Крышень, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, В.В. Воробьева, А.Н. Шиков	
Изучение специфической фармакологической активности комплекса гликозилированных полипептидов, выделенного из морских ежей вида <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> на модели острого бронхита у крыс.....	85

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ю.И. Сысоев, С.В. Оковитый, Б. Узугбунам	
Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы	95

Content

BIOMEDICAL METHODS

E.B. Shustov, M.T. Gasanov, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, V.S. Novikov, E.L. Matveyenko, Kh.Kh. Semenov Peptide bioregulation of resistance to extreme influences.....	4
---	---

A.G. Berzina, L.I. Ul'yanova, N.B. Gamaleya, N.V. Stankova, G.D. Kapanadze The study of the immune response in mini-pigs of the Svetlogorsk population to two morphine derivatives.....	15
---	----

D.N. Voronkov, O.V. Salnikova, R.M. Khudoerkov Localization of total and Ser 129 phosphorylated α -synuclein in the rat peripheral nervous system (testing of different antibodies).....	22
---	----

E.V. Kuryanova, A.V. Tryasuchev, V.O. Stupin, D.L. Tepliy Adreno- and cholinoreactivity of erythrocytes and analysis of their conjugation with heart rate in rats.....	33
--	----

A.K. Martusevich, A.G. Soloveva, S.Yu. Krasnova, D.V. Yanin, A.G. Galka, A.V. Kostrov The influence of helium cold plasma on metabolic and physical-chemical parameters of human blood <i>in vitro</i>	47
--	----

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

E.I. Bon', N.E. Maksimovich Methods of modeling and morphofunctional markers of cerebral ischemia.....	59
--	----

P.P. Zolin, V.M. Lebedev, V.D. Conway Mathematical modeling of the salvage pathway of hypoxanthine.....	72
---	----

A.E. Katelnikova, K.L. Kryshen, M.N. Makarova, V.G. Makarov, V.V. Vorobieva, A.N. Shikov Specific pharmacological activity study of glycosylated polypeptide complex extracted from sea urchin <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> in the model of acute bronchitis in rats	85
--	----

NON-CLINICAL RESEARCHES

Y.I. Sysoev, S.V. Okovityi, B. Uzuegbunam The influence of new diethylaminoethanol compound on the neurologic deficit in rats after traumatic brain injury.....	95
---	----



Пептидная биорегуляция резистентности к экстремальным воздействиям

Е.Б. Шустов^{1,4}, М.Т. Гасанов², Г.Д. Капанадзе², Ю.В. Фокин²,
В.С. Новиков³, Е.Л. Матвеев², Х.Х. Семенов²

¹ – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

³ – Секция междисциплинарных проблем науки и образования РАЕН, Санкт-Петербург

⁴ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

Контактная информация: д.м.н. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru;
к.м.н. Гасанов Мелик Тофикович, gasanovmark@yandex.ru

Рассмотрены особенности влияния пептидных биорегуляторов – тималина, тимогена, кортексина, эпителина и простатилена – на резистентность мелких лабораторных животных к экстремальному воздействию гипоксии, высоких и низких температур внешней среды. Показано, что пептидные препараты в широком диапазоне доз оказывают разной степени выраженности позитивное влияние на уровень устойчивости организма животных к экстремальным воздействиям. Наиболее универсальной активностью обладают эпителин и тимоген.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, гипоксия, гипертермия, гипотермия, экстремальные факторы, резистентность, пептидные биорегуляторы, кортексин, простатилен, тималин, тимоген, эпителин.

Введение

В настоящее время доказано, что весь спектр фармакологических эффектов пептидных биорегуляторов, получаемых из тканей животных, обусловлен наличием в их составе регуляторных пептидов (РП).

На данный момент идентифицировано более 1500 РП, которые синтезируются клетками-апудоцитами, являющимися структурно-функциональными единицами APUD-системы (по первым буквам английских слов Amine Precursor

Uptake and Decarboxylating system – система захвата и декарбоксилирования предшественников аминов) [9]. Формирование данной системы в процессе эмбриогенеза происходит за счет миграции клеток из единого источника (нервного гребешка) в ЦНС и в различные органы и системы организма. Синтез РП происходит путём сложного многоступенчатого отщепления от пептида-предшественника, на NH₂-конце которого расположен сигнальный пептид, позволяющий ему перемещаться по нейрону

к месту секреции. Эволюционно и онтогенетически APUD-система образуется раньше эндокринной, и кодируются данные системы различными участками генома.

Основными характеристиками РП являются полифункциональность и высокий аффинитет к определенным рецепторам. Многие РП оказывают вторичные эффекты, т.е. регулируют выход др. РП. Отличием РП от «классических» нейромедиаторов является пролонгированность их действия (1-90 мин против 1-180 сек у нейромедиаторов). Также для РП характерно формирование сложных каскадов в результате образования из них функционально активных метаболитов, чем объясняется продолжительность эффектов короткоживущих РП [1].

Основные механизмы, посредством которых реализуются эффекты РП, классифицируются на синаптические и внесинаптические. В первом случае РП выполняют нейромедиаторную или нейромодуляторную функции. Нейромодулятор в отличие от нейромедиатора не вызывает самостоятельного физиологического эффекта в постсинаптической мембране, но модифицирует реакцию клетки на нейротрансмиттер. Внесинаптическое действие РП представлено следующими механизмами: паракринное действие (паракриния), производимое РП в зонах межклеточных контактов, нейроэндокринное действие осуществляется через секрецию пептида в кровь и его воздействия на клетку-эффектор, и эндокринное действие, при котором РП выделяются в системный кровоток и действуют как дистантные регуляторы [6].

Поскольку в предыдущих наших исследованиях и ряде литературных

источников [2, 3, 7, 8] обнаружены общие механизмы и проявления РП, приведем их в качестве основных функций РП в организме.

Боль. Целый ряд РП влияет на формирование боли как сложного психофизиологического состояния организма, включающего само болевое ощущение, а также эмоциональные, волевые, двигательные и вегетативные компоненты. При этом РП включены как в ноцицептивную, так и в антиноцицептивную систему.

Память, обучение, поведение. Получены данные о том, что фрагменты АКТГ (АКТГ 4-7 и АКТГ 4-10), лишённые гормональных эффектов, и меланостимулирующий гормон улучшают кратковременную память, а вазопрессин вовлечен в формирование долговременной памяти.

Вегетативные функции. Целый ряд РП участвует в контроле уровня артериального давления.

Стресс. Заслуживает большого внимания тот факт, что ряд РП (опиоидные, пролактин, РП эпифиза) относят к антистрессорной системе, поскольку они ограничивают развитие стрессорных реакций.

Влияние на иммунную систему. Установлены двусторонние связи между системой регуляторных пептидов и иммунной системой. С одной стороны, в настоящее время достаточно изучена способность многих РП модулировать иммунные ответы. С другой стороны, РП влияют на обмен и выделение гипоталамических нейротрансмиттеров и рилизинг-гормонов. Таким образом, РП выполняют интегративную функцию между нейроэндокринной и иммунной системами.

В проведенных ранее исследованиях было продемонстрировано, что воздействие экстремальных факторов профессиональной деятельности – таких, как гипобарическая гипоксия, гипертермия и гипотермия – запускает в организме неспецифические механизмы дезадаптации (рис. 1), проявляющиеся дефицитом функциональных резервов нейроэндокринной системы, нарушениями антигенно-структурного гомеостаза и др. [4, 5].



Рис. 1. Схема формирования экстремальных состояний (по [5]).

Суммируя вышеизложенное, мы сочли целесообразным изучить пептидные биорегуляторы, зарегистрированные в РФ: тималин, тимоген, кортексин, эпителиамин и простатилеин, на предмет наличия у них адаптогенного и актопротекторного эффектов.

Цель исследования – доказать наличие адаптогенного и актопротекторного эффектов, проявляющихся повышением резистентности организма к действию различных физических экстремальных воздействий (гипоксия, гипо- и гипертермия), у пептидных биорегуляторов, выпускаемых российской фармацевтической промышленностью (тималин, тимоген, кортексин, эпителиамин, простатилеин).

Материалы и методы

Исследование проводилось на белых беспородных мышах-самцах массой 18-21 г и крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в вентилируемых клетках при температуре воздуха 20-22°C, относительной влажности 40-60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8⁰⁰. Использовался полнорационный корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм») при свободном доступе к водопроводной питьевой воде.

Гипобарическая гипоксия создавалась в проточной барокамере «подъемом» белых мышей на кри-

стическую для этого вида животных «высоту» 10000 м при температуре +20°C. Подъем осуществлялся со скоростью 50 м/с в соответствии с Методическими рекомендациями по биомедицинскому (доклиническому) изучению антигипоксической активности лекарственных средств [1]. Оценка эффективности антигипоксического действия пептидных биорегуляторов осуществлялась по максимальной продолжительности пребывания животных на «высоте», проценту прироста выживаемости животных и среднего времени жизни на «высоте».

Исследуемые препараты в широком диапазоне доз вводились лабораторным животным внутривентриально за час до начала «подъема». Контрольные животные получали эквивалентное количество физ. р-ра. Группы животных формировались так, чтобы на каждую исследованную дозу приходилось 8-10 животных. Введение пептидных биорегуляторов лабораторным животным проводилось за 1 ч до воздействия.

Гипертермия моделировалась в климатической термокамере для животных «ILKA», в которой поддерживались параметры температуры (+40°C) и влажности (30%). Исследовалась зависимость термопротекторного эффекта препаратов от дозы. Белым мышам внутривентриально в течение трех дней 1 раз в сутки за 60 мин до начала пребывания животных в термокамере вводились тималин, кортексин, простатилеин, тимоген и эпителиамин в дозах от 0,001 мг/кг до 10,0 мг/кг в зависимости от препарата. Переносимость температурного воздействия оценивалась по максимальному времени пребывания животных в термокамере, проценту прироста пребывания

в экстремальных условиях и выживаемости животных по сравнению с контрольной группой.

Резистентность к гипотермии исследовалась на белых беспородных крысах-самцах массой 180-230 г по динамике ректальной температуры в условиях воздушного охлаждения (помещением фиксированных животных в ограничивающих подвижность пластиковых пеналах в климатическую камеру, поддерживающую температуру воздуха $5 \pm 1^\circ\text{C}$ при влажности воздуха 75-80%) и в тесте предельного плавания в десатурированной воде температурой $10-12^\circ\text{C}$ с грузом 5% от массы тела в соответствии с ранее описанной методикой [7]. Динамика теплового состояния при воздушной гипотермии определялась ректальным электротермометром для лабораторных животных «Corelle D-10» (Италия) с фиксацией показаний каждые 10 мин. Время плавания животных измерялось от начала погружения до полного прекращения двигательной активности (гибели).

В отдельных сериях исследований оценивалось влияние короткого курсового применения пептидных биорегуляторов на уровень резистентности животных к конкретному экстремальному воздействию. С этой целью препараты вводились животным внутривенно 1 раз в день на протяжении 3-х сут. Тестирование резистентности к воздействию осуществлялось через 1 сут после последнего введения препарата.

В каждой серии исследований по 60 животных составляли контрольную группу, им вводилось плацебо в виде физ. р-ра в тех же объемах.

Поскольку время жизни в экстремальных условиях имеет вид распределения, далекого от нормального (рис. 2) [8], достоверность отличий от контроля оценивалась по непараметрическому методу Вилкоксона-Манна-Уитни.

По каждому препарату строилась кривая «доза-эффект». В контрольных группах и в группах оптимального дозового эффекта при применении пептидных биорегуляторов методом

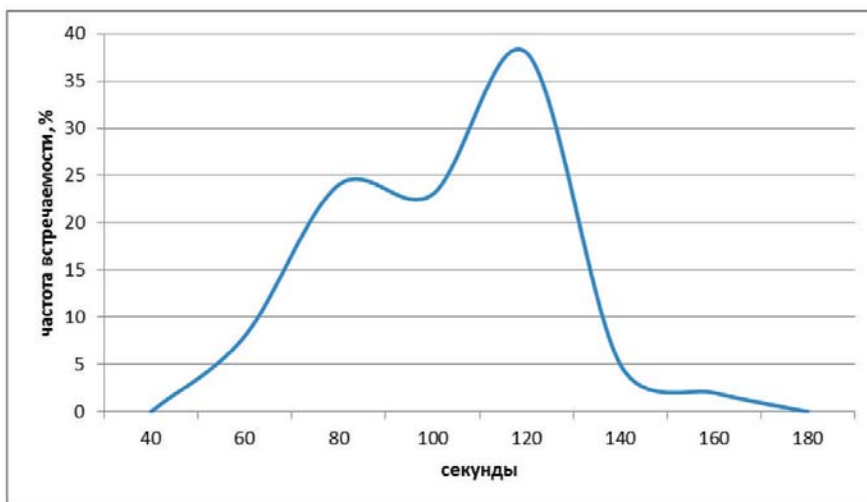


Рис. 2. Распределение значений показателя времени жизни животных контрольной группы на критической высоте 10000 м (по [6]).

S-образного шкалирования определялись границы диапазонов устойчивости животных к конкретному экстремальному воздействию, что позволило оценить влияние препаратов на популяционную структуру резистентности.

Результаты и их обсуждение

Изучение антигипоксической активности пептидных биорегуляторов показало, что в среднем терапевтическом диапазоне разовых доз (до 1 мг/кг) выраженным антигипоксическим эффектом обладают простатилен и эпیتالамин, а также тимоген, который в аналогичной дозе 0,01 мг/кг более чем в 3,5 раза увеличивал среднее время жизни мышей на «высоте» 10000 м (рис. 3). Биорегуляторы тималин и кортексин при разовом введении в терапевтических дозах не ухудшали переносимость экстремальной гипоксии, а в более высоких дозах проявляли антигипоксическое действие.

При анализе зависимости «доза-эффект» обращает внимание характерный для пептидов куполообразный (тимоген, простатилен, тималин) или двугор-

бый (эпیتالамин, кортексин) характер зависимости, свидетельствующий о регуляторном влиянии малых доз цитомединов. В то же время антигипоксический эффект высоких доз тималина, эпیتالамин и кортексин может отражать опосредованное действие за счет активации механизмов регуляции на системном уровне. Антигипоксическое действие простатилена и эпیتالамин сопровождается улучшением структуры выживаемости животных, что свидетельствует о преимущественном влиянии препаратов при низкой и средней устойчивости животных к гипоксии. В контрольной группе 67% животных относились к низкоустойчивым, 28% – к среднеустойчивым и только 5% – к высокоустойчивым. При применении простатилена в дозе 0,1 мг/кг почти все животные относились к группе с высокой устойчивостью к гипоксии.

Для обоснования применения пептидных биорегуляторов в целях предупреждения возможных негативных отклонений в состоянии здоровья при экстремальных воздействиях, а также

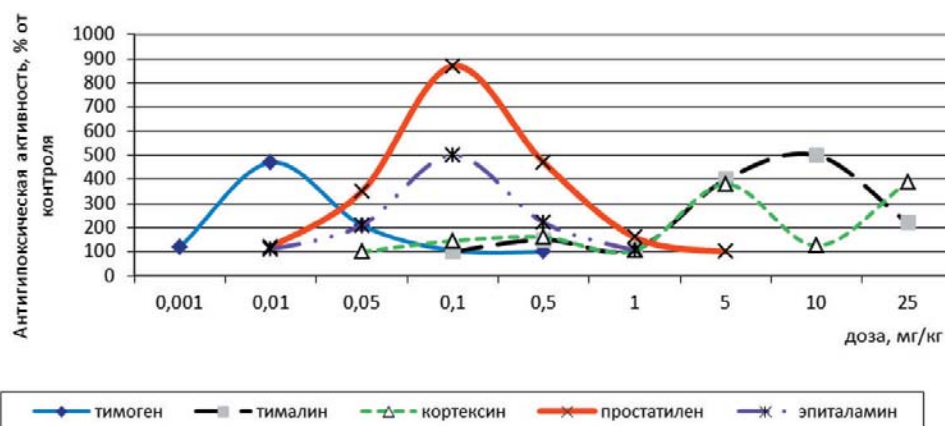


Рис. 3. Кривые «доза – антигипоксический эффект» при однократном введении пептидных биорегуляторов лабораторным животным.

на этапе реабилитации для ускорения регрессии синдромов дезадаптационного состояния дополнительно проведена оценка эффективности курсового применения цитомединов на переносимость экстремальной гипоксии. Лабораторным животным (белым крысам-самцам массой 180-210 г) 1 раз в день в течение трех дней подряд внутрибрюшинно вводились пептидные биорегуляторы. Тестирование высотной устойчивости животных проводилось на следующий день после завершения курса по показателю времени жизни на критической «высоте» 11500 м. В ходе предварительного исследования было установлено, что через сутки после однократного введения пептидов их антигипоксический эффект не определяется. Поэтому повышение времени жизни животных на

«высоте» через сутки после курсового применения пептидных биорегуляторов будет свидетельствовать не о прямом антигипоксическом действии, а об их влиянии на уровень неспецифической резистентности организма.

Полученные результаты показывают, что из всех пептидов только тимоген в широком диапазоне доз повышал при курсовом применении уровень устойчивости животных к экстремальной гипоксии (табл. 1). Для тималина и простатилена этот эффект определялся только в одной из исследованных доз и существенно уступал эффекту тимогена. Кортексин и эпиталамин, увеличивая среднее время пребывания животных на «высоте», практически не влияют на их распределение по уровню устойчивости. Следовательно, эффект кортексина и эпиталамина в основ-

Таблица 1
Влияние курсового применения пептидных биорегуляторов на устойчивость лабораторных животных к экстремальной гипоксической гипоксии ($M \pm m$)

Препарат	Доза, мг/кг	Время пребывания на «высоте» 11500 м, мин	Прирост времени пребывания на «высоте», %	Прирост доли устойчивых животных, %
Физ. р-р	1,0	2,2±0,1	0	0
Тималин	0,1	7,1±2,6*	238	38
	0,5	3,7±1,0	76	16
	1,0	4,4±2,2*	110	16
Кортексин	0,1	3,9±1,4	86	5
	0,5	3,8±0,4*	81	16
	1,0	5,2±3,2*	148	5
Простатилен	0,1	7,0±5,6**	233	0
	0,5	4,2±0,7*	100	66*
	1,0	2,4±1,0	14	16
Эпиталамин	0,1	2,7±0,6	22	15
	1,0	1,8±0,5	0	0
	10,0	7,4±4,5*	236	33
Тимоген	0,001	10,6±3,2*	405	48*
	0,01	20,1±11,1**	857	60*
	0,1	28,6±11,8**	1262	80**

Примечание: отличия от показателей плацебо-контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

ном проявляется у более устойчивых к гипоксии животных. Важно отметить, что ни один из пептидных биорегуляторов не снижает при курсовом применении уровень высотной устойчивости животных. Последнее свидетельствует об отсутствии у данных пептидных биорегуляторов противопоказаний к применению, связанных с выполнением задач профессиональной деятельности в условиях гипоксической гипоксии.

Влияние пептидов на переносимость гипертермии было разнонаправленным (табл. 2). Тималин и кортексин в основном снижали время переносимости животными предельного теплового воздействия, в то время как тимоген, эпیتالламин и простатилен – повышали.

Дополнительное исследование эффективности тимогена и эпیتالламина на переносимость животными гипертермии в модели плавания с грузом 5% от

массы тела в воде температурой +40°C показало, что курсовое введение данных препаратов ведет к повышению тепловой устойчивости и сохранению работоспособности при различных дозах.

В частности, трехдневное введение тимогена в дозах от 0,001 до 0,1 мг/кг приводило к увеличению времени переносимости экстремальной тепловой нагрузки на 80-86%, а доля высокоустойчивых животных увеличивалась на 60-70%. Эпیتالламин при применении в дозах от 0,1 до 10,0 мг/кг увеличивал время переносимости гипертермии на 92-122%, а доля высокоустойчивых животных достигала 100%. При этом необходимо отметить, что увеличение дозы эпیتالламина несколько снижало его эффективность при нагрузках в условиях гипертермии, поэтому оптимальной следует считать дозу 0,1 мг/кг. Эффект простатилена при курсовом применении

Таблица 2

Влияние пептидных биорегуляторов на переносимость животными гипертермии ($M \pm m$)

Препарат	Доза, мг/кг	Длительность переносимости гипертермии, мин	Прирост длительности, %	Прирост доли термоустойчивых животных, %
Плацебо		96,5±5,2		
Тималин	1,0	78,5±3,6*	0	0
	5,0	83,3±2,7*	0	0
Кортексин	1,0	89,4±2,2	0	0
	5,0	88,6±2,4*	0	0
Простатилен	0,5	126,5±11,2*	30	50*
	1,0	110,3±10,4	14	31
Эпیتالламин	0,1	110,5±10,2	14	25
	1,0	114,3±9,3*	18	30
	10,0	125,2±10,7*	29	30
Тимоген	0,001	75,2±8,2	0	0
	0,01	107,5±10,4	11	10
	0,1	114,2±11,1*	18	30

Примечание: различия с группой плацебо: * – $p < 0,05$.

был менее выраженным (увеличение времени переносимости гипертермии на 40-50%), а при применении тималина и кортексина не достигал уровня статистической достоверности.

В исследованиях на модели иммерсионной гипотермии установлено, что только эпиталамин и кортексин обладают умеренной способностью поддерживать работоспособность животных в условиях охлаждения (рис. 4). Для остальных пептидных препаратов (тималин, простатилен, тимоген) не выявлено достоверного отличия от группы контрольных животных.

Для оценки влияния пептидных биорегуляторов на уровень холодовой резистентности животных тестировалась динамика теплового состояния животных в условиях воздушного охлаждения после 3-дневного курсового применения препаратов в оптимальной дозе. Установлено, что только эпиталамин и кортексин способствовали статистически достоверному, но умеренному по интенсивности повышению холодовой резистентности (табл. 3). Тимоген оказывал слабый эффект, не достигающий уровня статистической достоверности.

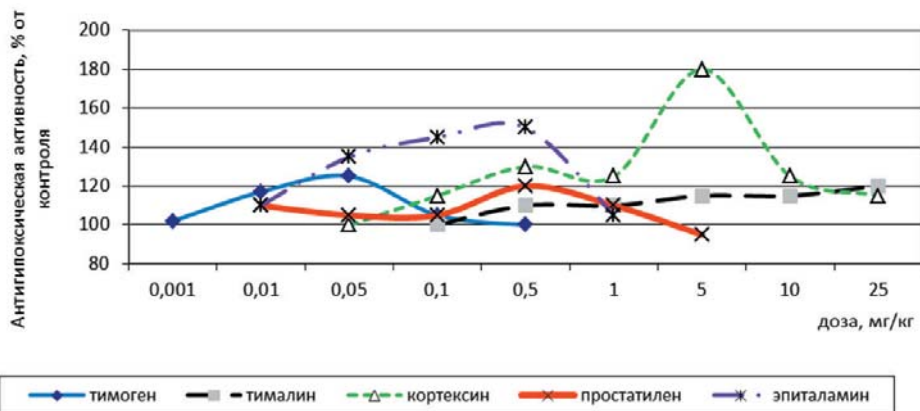


Рис. 4. Кривые «доза-эффект» при однократном введении пептидных биорегуляторов лабораторным животным перед иммерсионной гипотермией.

Таблица 3

Влияние пептидных биорегуляторов на тепловое состояние животных в условиях воздушной гипотермии ($M \pm m$)

Препарат	Оптимальная доза, мг/кг	D Тр, °C/ч	L35, мин
Контроль		0,77±0,11	168±12
Тимоген	0,05	0,74±0,06	185±25
Эпиталамин	0,5	0,52±0,08*	194±22*
Кортексин	5	0,63±0,05	207±18*
Тималин	25	0,73±0,11	178±14
Простатилен	0,5	0,79±0,06	163±20

Примечание: D Тр – скорость снижения ректальной температуры, L35 – продолжительность холодового воздействия до достижения ректальной температуры 35°C. Отличия от контроля достоверны: * – $p < 0,05$.

Таблица 4

Интегральная оценка универсальности влияния пептидных биорегуляторов в оптимальных дозах на переносимость экстремальных воздействий

Препарат	Гипоксия		Гипертермия		Гипотермия		Суммарно
	острая	резистентность	острая	резистентность	иммерсионная	воздушная	
Тимоген	++	+++	++	+++	0	+	11
Тималин	++	+	-	+	0	0	3
Кортексин	+	+	-	+	++	++	6
Простатилен	+++	++	++	++	0	0	9
Эпиталамин	++	+	++	+++	+	++	11

Обобщение полученных результатов по группе экстремальных факторов представлено в табл. 4. Более отчетливое влияние пептидные биорегуляторы проявляют в отношении переносимости гипоксического воздействия. Влияние препаратов на переносимость температурных факторов менее однозначно. Так, однократное воздействие тималина и кортексина снижало переносимость острой гипертермии, в то время как короткое курсовое применение препаратов способствовало повышению резистентности организма животных к гипертермии. Тималин и простатилен не оказывали влияние на переносимость как иммерсионной, так и воздушной гипотермии. Необходимо отметить, что наиболее универсальное действие при всех трех видах экстремальных воздействий присуще эпиталамину и тимогену (кроме иммерсионной гипотермии).

Выводы

1. Пептидные биорегуляторы (тималин, тимоген, кортексин, простатилен и эпиталамин), независимо от источника их получения, оказывают актопротекторное и адаптогенное действия.

2. Данные лекарственные препараты при профилактическом введении в широком диапазоне доз повышают пере-

носимость экстремальных воздействий при их однократном воздействии.

3. Тималин, тимоген, кортексин, простатилен и эпиталамин при коротком курсовом введении увеличивают резистентность организма к воздействию экстремальных факторов внешней среды.

4. Наиболее универсальным протекторным эффектом в отношении переносимости экстремальных воздействий обладают эпиталамин и тимоген (последний – кроме иммерсионной гипотермии).

Список литературы

1. Ашмарин И.П., Ещенко Н.Д., Каразеева Е.П. Нейрохимия в таблицах и схемах. – М.: Экзамен, 2007. – 143 с.
2. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Семенов Х.Х., Болотова В.Ц., Дуля М.С. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств: методич. реком. МР 21.44-2017. – М.: ФМБА России, 2017. – 96 с.
3. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Люблинский С.Л. Очерки спортивной фармакологии. Т. 3. Векторы фармакорегулирования / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. – М., СПб: Айсинг, 2014. – 356 с.
4. Новиков В.С., Сороко С.И. Физиологические основы жизнедеятельности человека в экстремальных условиях. – СПб: Политехника-принт, 2017. – 476 с.
5. Новиков В.С., Шустов Е.Б., Горанчук В.В. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. – СПб: Наука, 1998. – 544 с.

6. Розен В.Б. Основы эндокринологии: учеб. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 384 с.
7. Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Фокин Ю.В., Матвеев Е.Л. Методические особенности биомедицинских исследований влияния фармакологических средств на устойчивость организма к острой общей гипотермии // Биомедицина. – 2017. – № 3. – С. 4-15.
8. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 149-157.
9. http://бмэ.опр/index.php/РЕГУЛЯТОРНЫЕ_ПЕПТИДЫ
4. Novikov V.S., Soroko S.I. Fiziologicheskie osnovy zhiznedejatel'nosti cheloveka v ekstremal'nyh usloviyah [Physiological basis of human life in extreme conditions]. St. Petersburg: Politehnika-print, 2017. 476 p. (In Russian).
5. Novikov V.S., Shustov E.B., Goranchuk V.V. Korrekciya funkcional'nyh sostoyanij pri ekstremal'nyh vozdeystviyah [Correction of functional states under extreme influences]. St. Petersburg: Nauka, 1998. 544 p. (In Russian).
6. Rozen V.B. Osnovy endokrinologii: ucheb. 3-e izd., pererab. i dop. [Fundamentals of endocrinology: textbook. 3rd edition, revised and enlarged]. Moscow: Izd-vo MGU, 1994. 384 p. (In Russian).
7. Shustov E.B., Kapanadze G.D., Fokin Yu.V., Matveyenko E.L. Metodicheskie osobennosti biomeditsinskih issledovanij vliyaniya farmakologicheskikh sredstv na ustojchivost' organizma k ostroj obshhej gipotermii [Methodical features of biomedical research of the influence of pharmacological agents on the resistance of the organism to acute general hypothermia]. Biomedicine. 2017. No. 3. Pp. 4-15. (In Russian).
8. Shustov E.B., Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Semenov Kh.Kh. Analiz parametrov individual'noj ustojchivosti laboratornykh zhivotnykh k gipoksii v interesah biologicheskogo modelirovaniya nejroprotektornogo i anti-gipoksicheskogo deystviya lekarstvennykh sredstv [Analysis of the parameters of individual resistance of laboratory animals to hypoxia in the interests of biological modeling of neuroprotective and antihypoxic effects of drugs]. Biomedicine. 2013. No. 4. Pp. 149-157. (In Russian).
9. http://бмэ.опр/index.php/РЕГУЛЯТОРНЫЕ_ПЕПТИДЫ

References

1. Ashmarin I.P., Eshhenko N.D., Karazeeva E.P. Nejrohimiya v tablitsah i shemah [Neurochemistry in tables and schemes]. Moscow: Ekzamen, 2007. 143 p. (In Russian).
2. Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Semenov Kh.Kh., Bolotova V.Ts., Dulya M.S. Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antigipoksicheskoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv: metodich. rekom. [Biomedical (preclinical) study of antihypoxic activity of drugs: guidelines]. MP 21.44-2017. Moscow: FMBA of Russia, 2017. 96 p. (In Russian).
3. Karkischenko N.N., Ujba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kotenko K.V., Lyubinskij S.L. Oчерки sportivnoy farmakologii. T. 3. Vektory farmakoregulirovaniya [Sketches of sports pharmacology. Volume 3. Vectors of pharmacoregulation]. Ed. by N.N. Karkischenko, V.V. Ujba. Moscow, St. Petersburg: Ajsing, 2014. 356 p. (In Russian).

Peptide bioregulation of resistance to extreme influences

E.B. Shustov, M.T. Gasanov, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, V.S. Novikov,
E.L. Matveyenko, Kh.Kh. Semenov

The peculiarities of the influence of peptide bioregulators of thymalin, thymogen, cortexin, epithalamin and prostatylen on the resistance of small laboratory animals to extreme hypoxia influences, high and low temperatures of the external environment are considered. It is shown that peptide preparations in a wide range of doses exert a different degree of positive influence on the level of resistance of the animal organism to extreme influences. The most universal activity is possessed by epithalamin and thymogen.

Key words: regulatory peptides, hypoxia, hyperthermia, hypothermia, extreme factors, resistance, peptide bioregulators, cortexin, prostatylen, thymalin, thymogen, epithalamin.

Изучение иммунного ответа у мини-свиней светлогорской популяции к двум производным морфина

А.Г. Берзина¹, Л.И. Ульянова¹, Н.Б. Гамалея¹, Н.В. Станкова²,
Г.Д. Капанадзе²

¹ – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва

² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: д.м.н. Гамалея Наталья Борисовна, natgam@mail.ru,
к.б.н. Станкова Наталья Владимировна, sinayva@yandex.ru

Предложена схема иммунизации мини-свиней светлогорской популяции производными морфина, конъюгированными с бычьим сывороточным альбумином. Показана специфичность к морфину выделенных из иммунной сыворотки антител. Антитела в крови испытуемого животного сохранялись в течение года. Наблюдения за состоянием животного, иммунизированного производными морфина, не выявили отклонений в его развитии и психоэмоциональном состоянии.

Ключевые слова: антитела, биомодель, иммунный ответ, мини-свиньи, производные морфина.

Введение

В свете современных представлений в наркологической практике актуальными остаются усилия, направленные на поиск методов, средств лечения и профилактики наркомании. Важными целями в борьбе с наркотической зависимостью является достижение стойкой стабильной ремиссии и предупреждение рецидивов заболевания. Последние достижения зарубежных исследователей в этой области показали, что значительного эффекта в лечении и профилактике наркозависимости можно достичь иммунотерапевтическими методами с применением вакцин, представляющих собой иммуногены – конъюгированные с белками производные морфина, способствующие выработке антител, нейтрализующих наркотик. Та-

кие антитела могут быть получены при иммунизации лабораторных животных этими иммуногенами. Ряд исследований в этой области проводили на грызунах с целью понимания того, каким образом наличие антиморфиновых антител в крови животных может влиять на снижение зависимости от опиатов [3, 6]. Ранее было показано, что катаболизм антител (иммуноглобулинов класса G) у грызунов значительно отличается по длительности от катаболизма антител у человека – 3-4 дня у крысы и 21 день у человека [5].

В последние годы в нашей стране в качестве биомодели человека для изучения необходимых состояний и тонких метаболических сдвигов стали успешно применяться лабораторные мини-свиньи светлогорской популяции. В связи

с этим нами было принято решение изучить динамику накопления антител к производным морфина на этой модели.

Цель работы – изучить иммунный ответ у мини-свиней на введение антигена, представляющего собой смесь двух производных морфина, конъюгированных с белком, а также получить антитела к этим производным для дальнейшего изучения их биологических свойств и проследить динамику накопления антител в крови мини-свиньи после одного цикла иммунизации в течение одного года.

Материалы и методы

Для получения антител к морфину в работе были использованы ранее выделенные нами антигены – конъюгаты производных морфина с бычьим сывороточным альбумином (БСА): 6-гемисукцинильным (ГСМ) и 3-О-карбоксиметильным (КММ) эфирами. При постановке иммуноферментного анализа (ИФА) использовали 2-фенил-азо-производное морфина (ФАМ), конъюгированное с гетерологичным бел-

ком-лизоцимом, методика синтеза описана в патенте [3]. Работа по изучению влияния дозы антигена на титр иммунных сывороток к производным морфина проводилась путем иммунизации 2-х мини-свиней светлогорской популяции по предложенной нами схеме (табл.).

Забор крови для тестирования на наличие антител осуществляли из краниальной поллой вены. Сыворотки крови тестировали непрямой методом ИФА, используя в качестве антигена на твердой фазе ФАМ-лизоцим. Очистку IgG из иммунной сыворотки, истощенной от антител к БСА, проводили с помощью аффинной хроматографии с использованием протеин А-агарозы “Sigma” [2, 4]. В качестве элюирующего буфера использовали 0,1 М глицин – HCl буфер, pH 3,0; pH р-ра сошедших с колонки аффинных антител доводили до нейтрального добавлением 0,2 М Na₂CO₃ и диализовали в течение ночи при +4°C против забуференного физ. р-ра (ЗФР). Полученные препараты IgG тестировали с помощью непрямого метода ИФА [1] для сравнения их антительной активности в реакции с антигеном

Таблица

Схема иммунизации мини-свиней

Пол, возраст, масса	Вводимый антиген	Доза, мг/мл	Способ введения антигена		
			1-я инъекция*	2-я инъекция*	3-я инъекция*
1. Мини-свинья (№ 109, самец, 5 мес., 9 кг) 2. Мини-свинья (№ 689, самец, 5 мес., 10 кг)	КММ-БСА + ГСМ-БСА	1 0,3	Внутримышечно в 2 точки задних конечностей в физ. р-ре с ПАФ (1:1)	Подкожно в 2 точки в область шейных лимфоузлов в физ. р-ре с НАФ (1:1)	Подкожно в 2 точки в область шейных лимфоузлов в физ. р-ре с НАФ (1:1)

Примечание: * – инъекции проводили с интервалом 14 дней; ПАФ – полный адъювант Фрейнда, НАФ – неполный адъювант Фрейнда.

ФАМ-лизозим. В качестве антивидового конъюгата использовали антисвиной иммунопероксидазный конъюгат “Sigma” в разведении 1:4000. Субстратом для ферментативной реакции служила смесь ортофенилендиамина – ОФД “Sigma” с концентрацией 4 мг/мл и 0,02% H_2O_2 . Постановку ИФА проводили в планшетах фирмы «Nunc». Определение титра антител в сыворотке крови свиней осуществляли на 9-й, 14-й и 21-й день от последней инъекции. У мини-свиньи № 689 с целью изучения динамики антител заборы крови проводили на протяжении года – через 2, 4, 7, 9 и 12 мес. от начала иммунизации, после чего животному была сделана одна бустерная инъекция антигена в дозе 0,1 мг/кг.

Физиологическое состояние животных оценивали визуально, проводили взвешивание в начале эксперимента и через каждые 6 мес., а также измеряли ректальную температуру.

Результаты и их обсуждение

В ходе выполнения работы были подобраны оптимальные условия определения свиных антител к производным морфина методом ИФА (концентрация антигена – ФАМ-лизозим для адсорбции на твердой фазе составила 5 мкг/мл, разведение антивидового конъюгата – 1:4000, концентрация субстрата ОФД – 4 мг/мл). Определение титра специфических антител к морфину в сыворотках мини-свиней №№ 109 и 689 после одного цикла иммунизации (на 9-й день от последней инъекции) показало, что антитела обнаруживаются в сыворотках в одинаковых разведениях 1:25600 (рис. 1), несмотря на то, что животные получали разные дозы антигена.

Дальнейшее изучение содержания антител к морфину, проводимое на мини-свинье № 689, показало, что через 4 мес. от начала иммунизации титр антиморфиновых антител достиг максимума – 1:102400. Ранее нами было

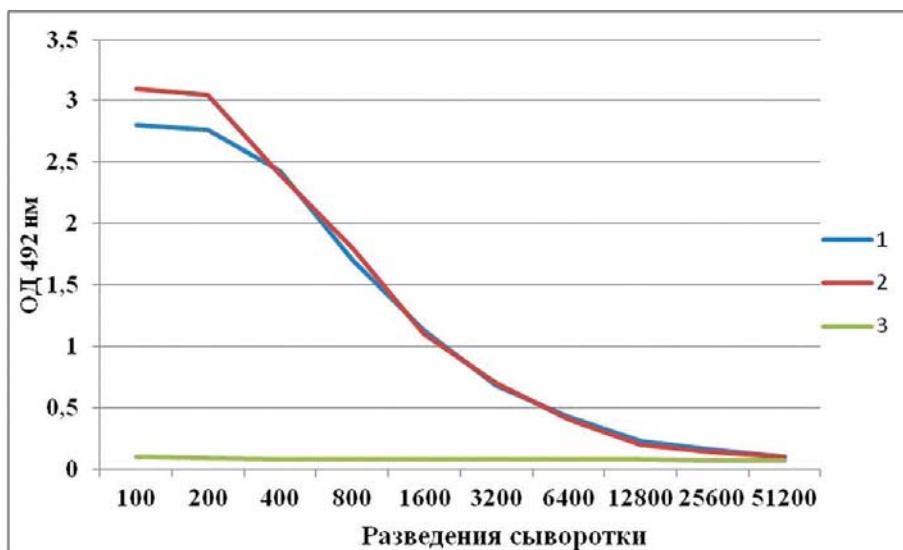


Рис. 1. Титры антисывороток мини-свиней, иммунизированных суммарным антигеном КММ-БСА + ГСМ-БСА: 1 – доза антигена 1 мг/кг; 2 – доза антигена 0,3 мг/кг; 3 – сыворотка неиммунной свиньи.

показано [2], что в результате курса иммунизации кроликов конъюгатами производных морфина с БСА (доза антигена 0,5 мг/кг) можно получить сыворотки с титрами 1:51200 – 1:102400. Иммунизация мини-свиней по предложенной нами схеме позволяет получить иммунные сыворотки к производным морфина с аналогичными титрами.

Из сывороток с максимальными титрами были выделены иммуноглобулины класса G. Проверка выделенных IgG на наличие антительной активности к производным морфина с помощью непрямого метода ИФА показала положительную реакцию с ФАМ-лизоцимом, что свидетельствует о том, что антитела, присутствующие во фракции IgG, специфичны к морфину.

Результаты сравнения препаратов IgG, выделенных до и после очистки, представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, оптическая плотность при определении антител во фракции IgG после очистки повышается, что свидетельствует о повышении специфичности выделенного препарата.

Результаты тестирования сывороток мини-свиньи № 689 на присутствие антител к производным морфина, полученных на протяжении одного года, представлены на рис. 3. При определении антител с помощью непрямого метода ИФА оптическая плотность (OP_{492}) окрашенного продукта ферментативной реакции зависит от концентрации антител в образце (см. рис. 2). При анализе сывороток (рис. 1) на основании величины оптической плотности в результате реакции также можно судить о количественном содержании антител. Ввиду того, что кривая титрования сывороток имеет S-образный

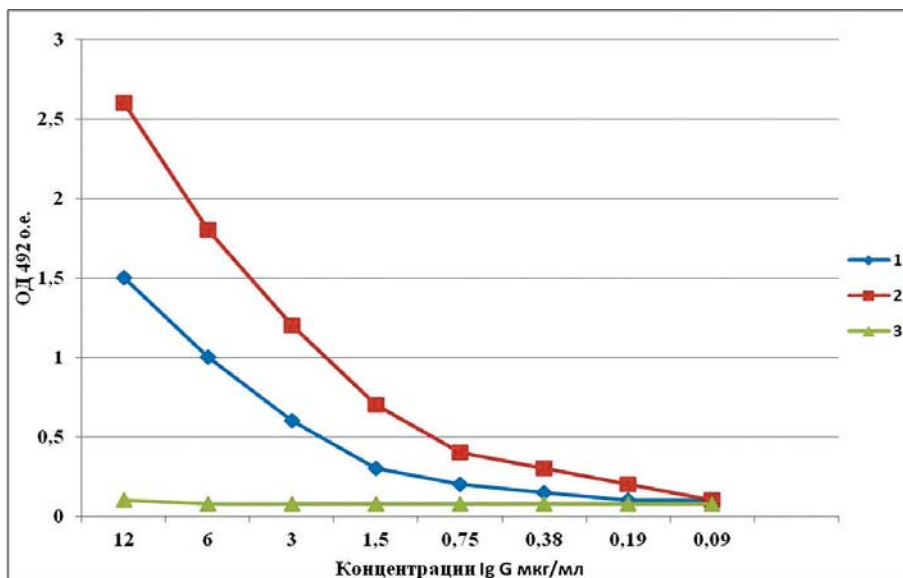


Рис. 2. Антительная активность препаратов IgG, выделенных с помощью аффинной хроматографии на протеин А – агарозе: 1 – суммарная фракция Ig после осаждения полиэтиленгликолем-6000 (до аффинной очистки), 2 – фракция IgG после очистки, 3 – IgG неиммунизированной свиньи.

характер, проводить сравнение сывороток по количественному содержанию антител можно лишь в тех разведениях, при которых на кривой имеется линейная зависимость. В связи с этим для сравнения сывороток, полученных от мини-свиньи № 689 в различные интервалы времени, нами использовалось разведение сыворотки 1:2000.

Из рис. 3 видно, что оптическая плотность продукта реакции при анализе сывороток, взятых в одном и том же разведении (1:2000), достигает максимума на 4-й мес. от начала иммунизации мини-свиньи. Далее концентрация антител в пробах постепенно снижается. Согласно результатам исследований, присутствие антиморфиновых антител сохраняется до 12-ти мес. Определение титров антител в иммунных сыворотках также показало, что после одного цикла иммуниза-

ции титр антител достигает максимума (1:102400) на 4-й мес. от начала иммунизации, далее титр антиморфиновых антител постепенно снижается до 1:25600 (через 7 мес.) и до 1:6800 (через 12 мес.). При введении всего одной бустерной инъекции поросенку № 689 через 1 год (в дозе 0,1 мг/кг) концентрация антител в его крови повысилась, о чем свидетельствует повышение ОП почти в 2 раза (рис. 3). Титр антител также увеличился (до 1:25600).

По наблюдениям за состоянием и поведением животного № 689 в течение года видимых изменений не обнаружено. Хряк имел хороший аппетит, нормально общался со сверстниками. Состояние по живой массе и температуре тела было без отклонений. Вид бодрый, кожа чистая, щетина ровная, блестящая, походка твердая, глаза ясные. Сердцебиение и дыхание были нормальными. В

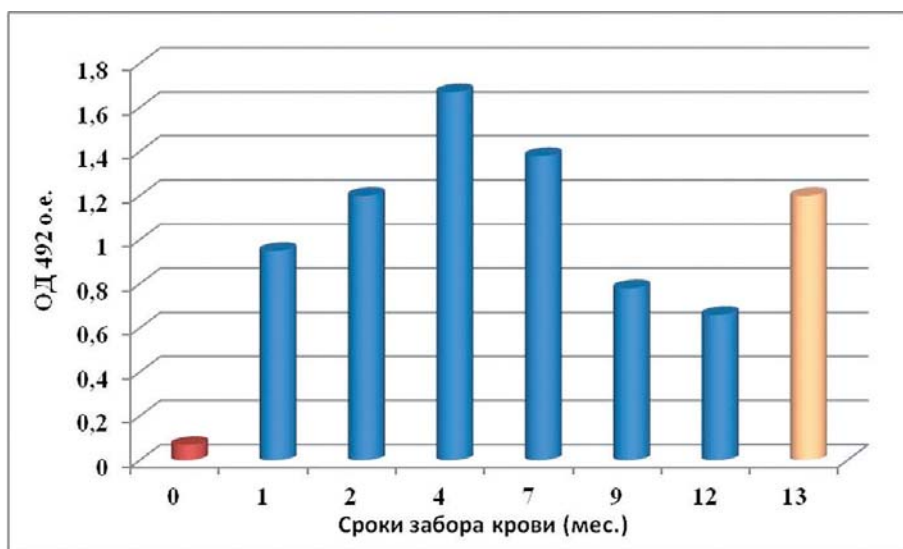


Рис. 3. Изменение значений ОП₄₉₂ при тестировании иммунной сыворотки мини-свиньи:

- — до начала иммунизации,
- — после иммунизации на протяжении года,
- — через год после одной бустерной инъекции.



Рис. 4. Хряк № 689.

психоэмоциональном состоянии изменений также не выявлено, хряк не проявлял агрессию и не впадал в депрессию (рис. 4).

Заключение

Таким образом, полученные нами результаты по иммунизации мини-свиней светлогорской популяции двумя производными морфина, конъюгированными с БСА, свидетельствуют о высокой иммуногенности данных антигенов. Уменьшение дозы от 1 до 0,3 мг/кг не влияло на результаты иммунизации. После одного цикла иммунизации, состоящего из трех инъекций, титр специфических антител к производным морфина в сыворотках составил 1:100000. Содержание антител у иммунного животного сохранялось высоким до полугода, затем титр антител постепенно снижался (к концу года – до 1:6400). Однократная бустерная инъекция антигена в дозе 0,1 мг/кг позволила повысить содержание антител в крови мини-свиньи почти в 4 раза (если судить по титрам антител). Наличие антиморфиновых антител не отражалось негативным образом на самочувствии животного.

Список литературы

1. Берзина А.Г., Станкова Н.В., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Капанадзе Г.Д. Использование мини-свиней светлогорской популяции в качестве биомодели для изучения иммунного ответа на введение IgG лошади // Биомедицина. – 2016. – № 4. – С. 47-53.
2. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина // Вопр. наркологии. – 2016. – № 11-12. – С. 39-53.
3. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов. Патент на изобретение RU 2 548 802 от 28.11.2013.
4. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. Аффинная хроматография. – М.: Мир, 1988. – 278 с.
5. Кульберг А.Я. Регуляция иммунного ответа. – М.: Медицина, 1986. – 224 с.
6. Q.-Q. Li, Y.-X. Luo, C.-Y. Sun, Y.-X. Xue, et al. A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats // J. of Neurochemistry. – 2011. – No. 119. – Pp. 1271-1281.

References

1. Berzina A.G., Stankova N.V., Ulyanova L.I., Gamaleya N.B., Kapanadze G.D. Ispol'zovanie mini-svinej svetlogorskoj populjacji v kachestve biomodeli dlya izucheniya immunnogo otveta na vvedenie IgG loshadi [Use of mini pigs of the Svetlogorsk population as a biomodel for studying the immune response to the

- introduction of IgG horses]. Biomedicine. 2016. No. 4. Pp. 47-53. (In Russian).
2. **Berzina A.G., Gamaleya N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Ul'yanova L.I.** Poluchenie poliklonal'nyh i monoklonal'nyh antitel k dvum proizvodnym morfina [Preparation of polyclonal and monoclonal antibodies to two derivatives of morphine]. Vopr. narkologii [Narcology questions]. 2016. No. 11-12. Pp. 39-53. (In Russian).
 3. **Gamaleya N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V.** Immunogen dlya lecheniya i profilaktiki zavisimosti ot opiatov [Immunogen for the treatment and prevention of dependence on opiates]. Patent for invention RU 2 548 802 of 28.11.2013. (In Russian).
 4. **Din P., Dzhonson U., Midl F.** Affinnaya khromatografiya [Affine chromatography]. Moscow: Mir, 1988. 278 p. (In Russian).
 5. **Kul'berg A.Ya.** Regulyaciya immunnogo otveta [Regulation of the immune response]. Moscow: Medicina, 1986. 224 p. (In Russian).
 6. **Q.-Q. Li, Y.-X. Luo, C.-Y. Sun, Y.-X. Xue, et al.** A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats. J. of Neurochemistry. 2011. No. 119. Pp. 1271-1281.

The study of the immune response in mini-pigs of the Svetlogorsk population to two morphine derivatives

**A.G. Berzina, L.I. Ul'yanova, N.B. Gamaleya, N.V. Stankova,
G.D. Kapanadze**

A scheme for immunizing mini-pigs of the Svetlogorsk population with morphine derivatives conjugated to bovine serum albumin is proposed. Morphine specificity of antibodies isolated from the immune serum is shown to be specific. Antibodies in the blood of the test animal persisted for a year. Observations of the condition of the animal immunized with morphine derivatives did not reveal any deviations in its development and psychoemotional state.

Key words: antibodies, biomodel, immune response, mini-pigs, morphine derivatives.

Локализация общего и фосфорилированного α -синуклеина в периферической нервной системе интактных крыс (тестирование антител разных клонов)

Д.Н. Воронков, О.В. Сальникова, Р.М. Худоерков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва

Контактная информация: Воронков Дмитрий Николаевич, voronkovdm@gmail.com

Развитию двигательных симптомов при болезни Паркинсона предшествует накопление α -синуклеина в периферической нервной системе, что позволяет рассматривать α -синуклеин как биомаркер этой патологии. Вместе с тем, для совершенствования экспериментальных моделей и разработки эффективных диагностических тестов требуются более точные знания о локализации α -синуклеина в норме. Иммуногистохимически в периферической нервной системе интактных крыс исследовали локализацию α -синуклеина и вариант его формы, фосфорилированной по остатку серина 129, с помощью панели антител разных производителей и обнаружили его локализацию в пресинаптических нервных окончаниях дорсальных рогов спинного мозга, в телах нейронов превертебральных ганглиев, сплетениях стенок сосудов и GFAP-негативных глиальных клетках. Разные антитела к фосфорилированному α -синуклеину давали неоднозначную реакцию: у отдельных нейронов спинального ганглия окрашивались тела клеток, их отростки и ядра, но ни одно из изучаемых антител не давало реакцию связывания в мелких ноцицептивных неопептидергических нейронах. Неоднозначность результатов может быть обусловлена как разной доступностью эпитопов, выявляемых антителами при взаимодействиях α -синуклеина с другими белками, так и в результате неспецифического связывания антител с неидентифицированными мишенями.

Ключевые слова: α -синуклеин, периферическая нервная система, спинальный ганглий, крыса, иммуногистохимия.

Введение

Альфа-синуклеин (α -Syn) – белок, широко распространенный в нервной системе. Внимание исследователей к роли α -Syn в патогенезе нейродегенеративных заболеваний привлекло обнаружение его фрагмента в составе амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера [21] и выявление фосфорилированного α -Syn как основного компонента телесцев Леви – нейрональных включений, характерных для болезни Паркинсона (БП) [5]. Мутации гена α -Syn (SNCA) ассоциированы с БП, а его нокаут приводит к синаптической дисфункции в

нигростриатной системе, нарастающей с возрастом [3]. В связи со способностью α -Syn к формированию токсических олигомерных форм и образованию внутриклеточных нерастворимых агрегатов, считается, что прионоподобное распространение патологических форм белка от нейрона к нейрону может являться причиной прогрессирования нейродегенеративного процесса при БП, мультисистемной атрофии и др. заболеваниях, относимых к синуклеинопатиям [5, 21].

Функции α -Syn и характер его молекулярных взаимодействий до настоя-

щего времени полностью не выяснены. Обнаружены сплайсинговые варианты белка и посттрансляционные модификации С-концевого фрагмента, в т.ч. и его фосфорилированная форма [8, 17, 18]. Показано взаимодействие α -Syn с белками, ассоциированными с микротрубочками, синаптическими везикулами и митохондриальными мембранами [8, 21]. При этом данные о его внутриклеточной локализации разнятся: наряду с пресинаптической, описывают ядерную, перинуклеарную и митохондриальную, в зависимости от используемых антител [12, 14, 18, 22, 24]. Медиаторные характеристики нейронов, содержащих α -Syn, могут быть различными, что указывает на его локализацию в катехоламинергических, холинергических и ГАМК-ергических нервных окончаниях [21, 22].

Повышенное содержание в нейронах α -Syn, фосфорилированного по остатку серина 129 (Ser-129), обнаруживается в патологических условиях [19, 21]. Предполагается, что фосфорилирование служит сигналом для протеасомного расщепления α -Syn и снижает образование его нерастворимых агрегатов [4, 8], но увеличивает формирование его токсических олигомерных форм [16]. В нормальных условиях содержание α -Syn в фосфорилированной форме составляет в мозге около 4-5%, и наблюдается динамическое равновесие процесса фосфорилирования и дефосфорилирования белка, по-видимому, имеющее значение для его связывания с мембранами [4, 17]. В целом функциональное значение фосфорилирования α -Syn остается предметом дискуссии [19, 21].

Вероятно, накопление α -Syn при идиопатической БП начинается в структу-

рах периферической нервной системы, в особенности – в энтеральных сплетениях [6], также выявлено образование его агрегатов и в чувствительных нервных окончаниях кожи [11]. В связи с этим предпринимаются попытки клинико-морфологических исследований на биопсийном материале больных [1, 2, 11] для обоснования возможности ранней патоморфологической диагностики БП.

Учитывая необходимость совершенствования подходов к анализу патологической агрегации α -Syn в эксперименте и особенности его различной локализации, выявленные разными исследователями, **целью** настоящей работы стало охарактеризовать и уточнить локализацию α -синуклеина и его фосфорилированной формы в спинальных ганглиях и сопоставить результаты, полученные с помощью антител разных производителей.

Материалы и методы

Исследовали интактных самцов крыс Wistar (n=5, масса 280-300 г), полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в условиях свободного доступа к воде и корму с 12-часовым циклом освещения. Эксперименты выполняли в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными (директива Совета Европейского Союза от 24.11.1986 г., 86/609/ЕЕС, Национальный стандарт РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Крыс наркотизировали хлоралгидратом («Sigma», 350 мг/кг), декапитировали гильотиной и выделяли тройничный ганглий, спинной мозг со спинальными ганглиями на уровне CVII - ThIII и

чрежное сплетение. Образцы нервной ткани фиксировали 24 ч в 4% нейтральном формалине, промывали проточной водой и проводили через изопропанол для заливки в парафин или пропитывали средой Tissue Tek O.C.T для изготовления замороженных срезов. Срезы толщиной 10-15 мкм готовили на санном микротоме SR2000 («Leica», ФРГ) или криостате Tissue Tek Cryo3 («Sakura», США) и раскладывали на покрытые желатином стекла.

Антигены в срезах демаскировали, помещая их в цитратный буфер, с помощью тепловой обработки на протяжении 5-ти мин в микроволновой печи при температуре 90-95°C или в концентрированной муравьиной кислоте. Характер окрашивания, полученного при разных методах демаскировки, не различался. Для выявления нефосфорилированного α -Syn применяли поликлональные кроличьи антитела Sigma (S3062). Для выявления α -Syn, фосфорилированного по Ser-129, использовали моноклональные антитела разных производителей:

1) мышинные Abcam (кат. № ab184674) и Biolegend (кат. № 825701), относящиеся к одному клону P-syn/81A;

2) мышинные Wako (кат. № 015-25191), обозначаемые производителем как P-syn #64;

3) кроличьи Abcam (кат. № ab51253), клон EP1536Y.

Для всех антител производителями было указано специфическое связывание как с крысиным, так и с человеческим α -Syn. Астроциты выявляли при помощи антител к кислому глиофибрилярному белку (GFAP, мышинные, моноклональные, конъюгированные с флуорохромом Cy3, «Sigma»). Субпопуляцию ноцицептивных, непепти-

дергических нейронов локализовали по связыванию с биотинилированным лектином IB4 («Sigma»). Растворы антител и лектина готовили на фосфатном солевом буфере (0,01 М, pH=7,2), содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X100. Продукт иммуногистохимической реакции визуализировали посредством соответствующих вторичных антител (1:150, «Sigma»), меченых флуорохромами CF448 или CF555, а связывание лектина выявляли при помощи стрептавидина, конъюгированного с Texas Red («Sigma»). Все иммуногистохимические реакции проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител, часть срезов докрашивали диамидинофенилиндолом (DAPI), после чего заключали в среду FluoroShield («Immunobioscience corp.»). При выполнении негативного контроля на срезы наносили только вторичные антитела. Позитивный контроль для антител к α -Syn проводили на аутопсийных срезах черной субстанции мозга человека с БП: все использованные антитела выявляли агрегированный α -Syn в тельцах и нейритах Леви [2]. Препараты исследовали и документировали под микроскопом «Nikon Eclipse Ni-u», оснащенным цифровой фотокамерой «Nikon Ds-Qi1» (1,5 Мп), при увеличении объектива x40 и x100.

Результаты и их обсуждение

Поликлональные антитела Sigma на общий α -Syn выявили его преимущественно в телах малых и средних размеров нейронов тройничного и спинального ганглиев (рис. 1А). Наиболее интенсивно окрашивалась цитоплазма в телах и отростках норадренергических нейро-

нов чревного сплетения. Также α -Syn обнаружили в нервных сплетениях стенок сосудов, в цитоплазме сателлитной глии и в глиальных клетках нервных пучков. При этом совместную локализацию GFAP и α -Syn не выявили (рис. 1Г).

В спинном мозге локализация α -Syn соответствовала пресинаптическим

окончаниям сенсорных нейронов спинального ганглия дорсальных рогов спинного мозга: окрашивались нервные окончания в I-II пластинах Рекседа (рис. 2). При совместном окрашивании на α -Syn и лектин IB4 выявили, что области окрашивания перекрывались лишь частично (рис. 2Г-Е). Согласно

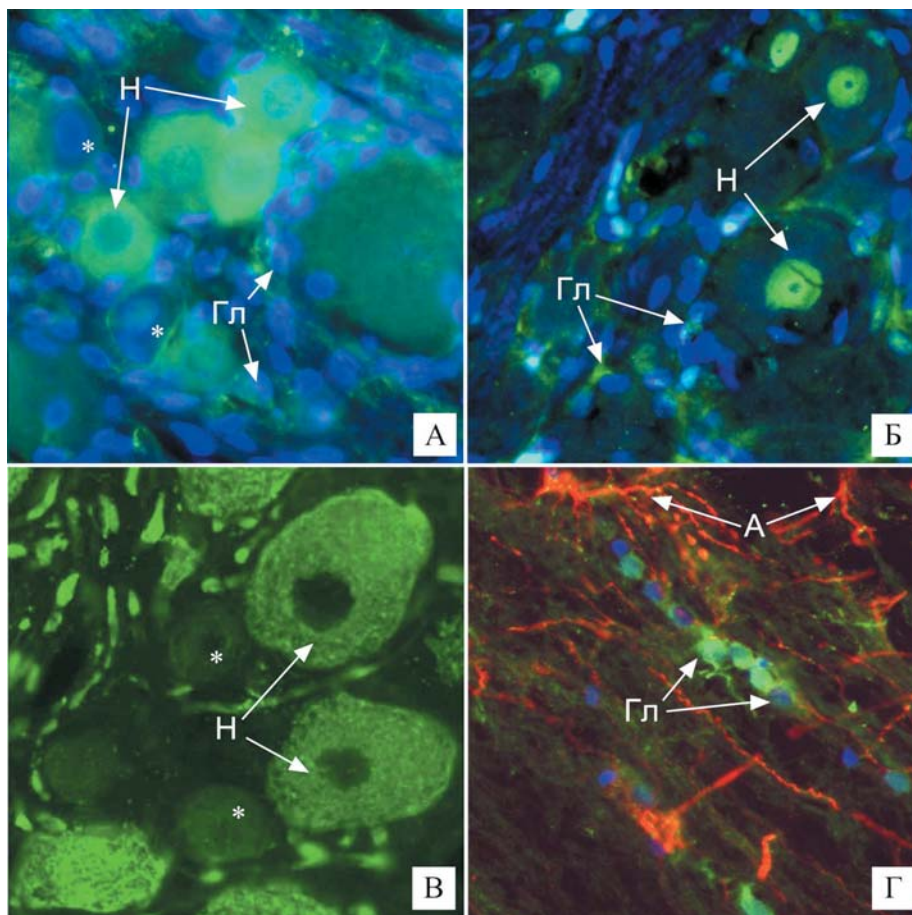


Рис. 1. Различия внутриклеточной локализации α -Syn и его фосфорилированной формы, выявляемой разными антителами в спинальном ганглии: А – перинуклеарное окрашивание, реакция с антителами к общему α -Syn; Б – ядерное окрашивание, реакция с антителами SynP#64 к фосфорилированному α -Syn; В – перинуклеарное окрашивание, реакция с антителами P-syn/81A к фосфорилированному α -Syn; Г – окрашивание GFAP-негативных глиоцитов, реакция с антителами к общему α -Syn (зеленым), GFAP (красным).

Обозначения: Н – α -Syn позитивные нейроны; * – α -Syn негативные нейроны; Гл – α -Syn позитивные глиоциты; А – отростки GFAP-позитивной глии; стрелками показаны α -Syn негативные нейроны. Ядра клеток на А, Б, Г докрашены DAPI (синим). Ув. $\times 40$.

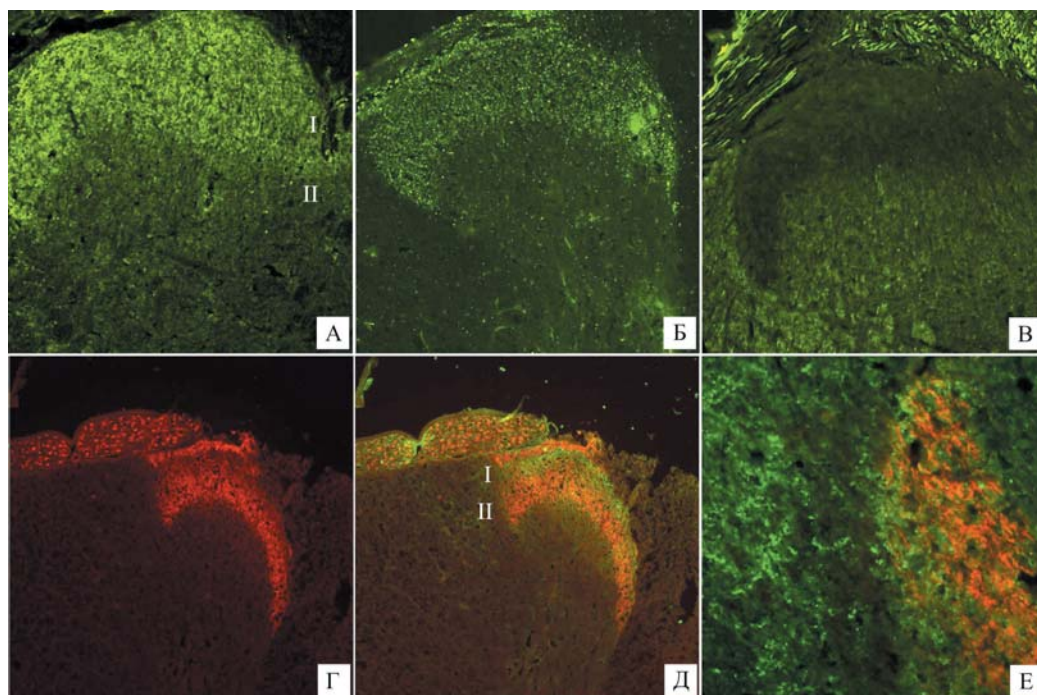


Рис. 2. Пресинаптическая локализация α -Syn и его фосфорилированной формы, выявляемая в дорсальных рогах спинного мозга: А – реакция с антителами к нефосфорилированному α -Syn; Б – реакция с антителами EP1536Y к фосфорилированному α -Syn; В – реакция с антителами P-syn/81A к фосфорилированному α -Syn; Г, Д, Е – локализация IB4-позитивных окончаний и α -Syn в дорсальных рогах спинного мозга (Г – красный канал, лектин IB4, Д – совмещенное изображение, зеленый канал – нефосфорилированный α -Syn, Е – фрагмент рис. Д, ув. $\times 100$). Обозначения: I, II – пластины по Рекседу. А, Б, В, Г, Д – ув. $\times 40$.

нашим результатам, отростки нейронов, связывающих IB4, в основном приходят во внутреннюю часть пластины II дорсальных рогов спинного мозга, тогда как распределение α -Syn преимущественно соответствует IB4-негативным окончаниям, приходящим во внешнюю часть пластины II и первую пластину Рекседа, что, по данным литературы, согласуется с проекциями пептидергических нейронов [7]. Следовательно, окончания большинства пептидергических (IB4-негативных) нейронов, по-видимому, характеризуются высоким содержанием α -Syn, тогда как в популяции

непептидергических нейронов его экспрессия незначительна или отсутствует.

Использованные нами моноклональные антитела к фосфорилированному α -Syn не всегда давали однотипную реакцию (рис. 1). Сходную локализацию с общим α -Syn наблюдали при применении антител EP1536Y, однако интенсивность окрашивания пресинаптических окончаний (рис. 2Б) и тел сенсорных нейронов при этом была более слабой, хотя тела глиальных клеток выявлялись отчетливо. У части нейронов спинального ганглия антитела EP1536Y и P-syn#64 давали однотипную реакцию

с компонентами клеточных ядер, но в др. структурах ПНС антитела P-syn#64 при исследовании сходных разведений реакции связывания не выявляли. В то же время антитела P-syn/81A (рис. 3) разных фирм («Abcam» и «Biolegend») не связывались с пресинаптическими окончаниями в дорсальных рогах спинного мозга (рис. 1) и ядрами нейронов, но выявляли часть IB4-негативных нейронов спинального ганглия с отростками (рис. 3), причем окрашивались нейроны разных размеров. Следовательно, наиболее близкие результаты по сравнению с окрашиванием на общий α -Syn показали антитела EP1536Y, тогда как характер окрашивания антителами P-syn/81A предполагает наличие неспецифического связывания, кроме того, все использованные антитела демонстрировали избирательное связывание с популяцией IB4-негативных нейронов.

Таким образом, локализация α -Syn в ПНС intactных животных различа-

ется в зависимости от типа нейронов и может быть как пресинаптической, так и цитоплазматической (табл.). В спинальном ганглии и спинном мозге распределение α -Syn соответствовало пептидергическим (IB4-негативным) ноцицептивным нейронам и их окончаниям. Антитела к фосфорилированному α -Syn также продемонстрировали разный характер связывания, но, как и антитела к общему α -Syn, избирательно выявляли клеточные структуры IB4-негативных сенсорных нейронов спинального ганглия. За исключением клона P-syn/81A, все антитела связывались с периферическими GFAP-негативными глиальными клетками.

В целом наши результаты продемонстрировали широкое распределение α -Syn и его фосфорилированной формы в ПНС и согласуются с результатами др. работ, показавших их наличие в нейронах спинального ганглия и их отростках, приходящих в наружные пластины дор-

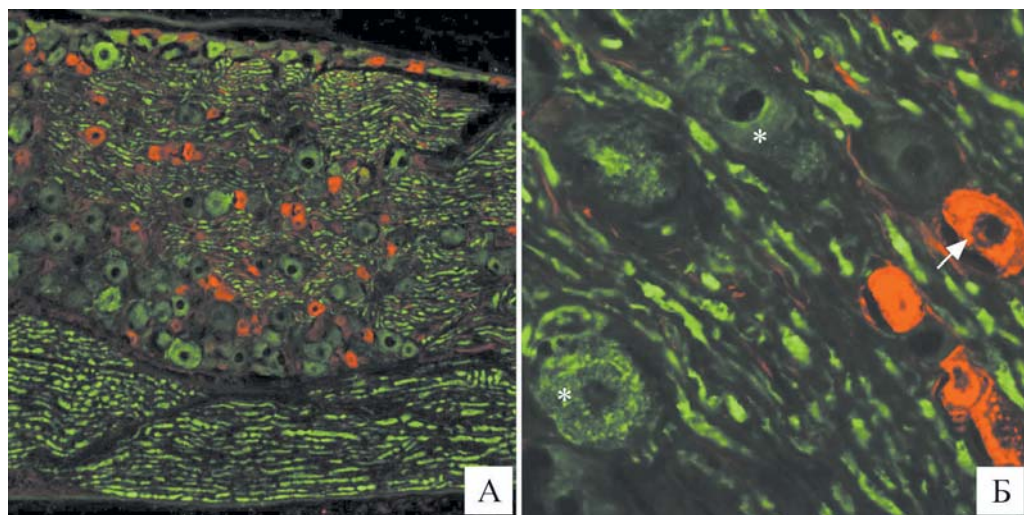


Рис. 3. Раздельное цитоплазматическое окрашивание крупных SynP-129 позитивных нейронов (клон антител P-syn/81A, зеленым) и IB4-позитивных нейронов (красным) спинального ганглия: А – ув. $\times 10$, Б – ув. $\times 40$.

Таблица

Локализация связывания антител к α -Syn и его фосфорилированной по Ser-129 форме в структурах периферической нервной системы интактных крыс Wistar

Исследованные структуры	Использованные антитела			
	Антитела к α -Syn («Sigma», s3062) (1:200 -1:1000)	Антитела к α -Syn-P-129		
		EP1536Y (1:100 - 1:500)	P-syn/81A (1:100 - 1:500)	P-syn #64 (1:100 -1:500)
Нейроны ганглия дорсальных рогов спинного мозга (цитоплазма)	++	+	+++	-
Нейроны ганглия дорсальных рогов спинного мозга (ядра)	-	+	-	+++
Пресинаптические окончания	+++	++	-	-
Нервные волокна	-	-	+++	-
Глиальные клетки	++	++	-	+
Нейроны вегетативных превертебральных ганглиев (цитоплазма)	+++	+	++	не исследовали
Нервные сплетения сосудов	++	-	++	-

Обозначения: «-» – отсутствие окрашивания, «+» – визуальная интенсивность окрашивания от слабой до интенсивной.

сальных рогов спинного мозга [13, 20, 23]. Высокое содержание α -Syn в структурах, участвующих в болевой чувствительности, важно для лучшего понимания патогенеза БП, т.к. у человека при БП описано образование патологических агрегатов синуклеина в этих структурах, что связывают с наблюдаемой у пациентов болевой симптоматикой [6, 9]. Также выявлено повреждение тонких нервных волокон и изменение температурной и болевой чувствительности [15]. При исследовании биоптатов кожи при БП были найдены агрегаты α -Syn в пептидергических нервных волокнах [12], что подтверждает наши результа-

ты. Патологическое накопление α -Syn в олигодендроглии обнаруживают при БП и мультисистемной атрофии [10]. Полученные нами данные о наличии α -Syn в GFAP-негативных глиальных клетках у интактных животных согласуются с работой [10], продемонстрировавшей экспрессию этого белка на разных стадиях созревания олигодендроглии.

Неоднозначность результатов, полученных нами при локализации фосфорилированного α -Syn, может быть обусловлена неспецифическим связыванием антител с мишенями, которые еще не идентифицированы, в т.ч. с др. белками семейства. В литературе от-

мечены различия в локализации α -Syn, выявляемого разными клонами антител [21, 24] или у разных видов животных [13], что вызывает вопросы относительно его истинной локализации в клетке [21]. Так, утверждается, что ядерное окрашивание нейронов на α -Syn имеет неспецифическую природу [14], хотя др. авторы предполагают, что различия во внутриклеточной локализации белка, выявляемого разными клонами антител, могут быть связаны с особенностями его пространственной структуры [18, 24]. Предполагается [18], что фосфорилирование и др. посттрансляционные модификации α -Syn изменяют доступность выявляемых антителами эпитопов, что приводит к различиям в результатах окрашивания и отражает внутриклеточную динамику фосфорилированного и нефосфорилированного α -Syn, а также его взаимодействия с молекулярными мишенями в ядре и цитоплазме [18, 21].

Таким образом, проведенное исследование показало, что в нейронах ПНС в зависимости от исследуемых структур наблюдается как пресинаптическая, так и цитоплазматическая локализация α -Syn. В спинальном ганглии α -Syn преимущественно экспрессируется пептидергическими сенсорными нейронами и обнаруживается в их терминалах в дорсальных рогах спинного мозга. Высокая экспрессия α -Syn выявляется и в телах и отростках нейронов превертебральных ганглиев, а также в сплетениях стенок сосудов и в цитоплазме GFAP-негативных глиальных клеток. α -Syn, фосфорилированный по Ser-129, в норме также обнаруживается в сенсорных нейронах спинального ганглия, однако антитела разных производителей значительно отличаются характером связывания и де-

монстрируют разную внутриклеточную локализацию, что может быть обусловлено как неспецифической реакцией, так и структурными особенностями исследуемого белка.

Выводы

1. Альфа-синуклеин и его фосфорилированная форма широко распространены в периферической нервной системе интактных крыс и обнаруживаются в телах нейронов и пресинаптических окончаниях.

2. В спинальном ганглии альфа-синуклеин экспрессируется преимущественно пептидергическими сенсорными нейронами и локализован в их окончаниях, приходящих в дорсальные рога спинного мозга.

3. Выявлена неоднотипность связывания антител разных клонов с фосфорилированным альфа-синуклеином, что необходимо учитывать при оценке патологической агрегации белка на экспериментальных моделях болезни Паркинсона и при исследовании патоморфологического материала больных паркинсонизмом.

Благодарность

Выражаем благодарность Соболеву Валерию Борисовичу за методическую помощь.

Список литературы

1. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011. Т. 5. № 4. С. 46-51.
2. Соболев В.Б., Худоевков Р.М. Иммуногистохимическое выявление α -синуклеина в слюнной железе как биомаркер болезни Паркинсона // *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений*. 2017. № 2. С. 16-23.

3. *Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L.* Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family // *J. of Neurosci.* 2011. No. 31(20). Pp. 7264-7274.
4. *Arawaka S., Sato H., Sasaki A., Koyama S., Kato T.* Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in alpha-synuclein aggregates // *Acta Neuropathologica Communications.* 2017. No. 1(5). P. 48.
5. *Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging.* 2003. No. 24(2). Pp. 197-211.
6. *Braak H., Sastre M., Bohl J.R., de Vos R.A., Del Tredici K.* Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons // *Acta Neuropathol.* 2007. No. 113(4). Pp. 421-429.
7. *Braz J.M., Nassar M.A., Wood J.N., Basbaum A.I.* Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor // *Neuron.* 2005. Vol. 47(6). Pp. 787-793.
8. *Burre J., Sharma M., Sudhof T.C.* Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2017. pii: a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091.
9. *Del Tredici K., Braak H.* Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease // *Acta Neuropathol.* 2012. No. 124(5). Pp. 643-64.
10. *Djelloul M., Holmqvist S., Boza-Serrano A., Azevedo C., Yeung M.S., Goldwurm S., Frisén J., Deierborg T., Roybon L.* Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models // *Stem Cell Reports.* 2015. No. 5(2). Pp. 174-84.
11. *Donadio V., Incensi A., Rizzo G., Scaglione C., Capellari S., Fileccia E., Avoni P., Liguori R.* Spine Topographical Distribution of Skin α -Synuclein Deposits in Idiopathic Parkinson Disease // *J. of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2017. No. 5(76). Pp. 384-389.
12. *Doppler K., Ebert S., Üçeyler N., Trenkwalder C., Ebentheuer J., Volkmann J., Sommer C.* Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology // *Acta Neuropathol.* 2014. No. 128(1). Pp. 99-109.
13. *Giasson B.I., Duda J.E., Forman M.S., Lee V.M., Trojanowski J.Q.* Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons // *Exp. Neurol.* 2001. No. 172(2). Pp. 354-362.
14. *Huang Z., Xu Z., Wu Y., Zhou Y.* Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains // *Neuroscience.* 2011. No. 199. Pp. 318-32.
15. *Lin C.H., Chao C.C., Wu S.W., Hsieh P.C., Feng F.P., Lin Y.H., Chen Y.M., Wu R.M., Hsieh S.T.* Pathophysiology of Small-Fiber Sensory System in Parkinson's Disease: Skin Innervation and Contact Heat Evoked Potential // *Medicine (Baltimore).* 2016. No. 95(10). E3058. doi: 10.1097/MD.0000000000003058.
16. *Ma M.R., Hu Z.W., Zhao Y.F., Chen Y.X., Li Y.M.* Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation // *Scientific Reports.* 2016. No. 6. P. 37130. doi: 10.1038/srep37130.
17. *Muntané G., Ferrer I., Martinez-Vicente M.* α -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain // *Neuroscience.* 2012. No. 200. Pp. 106-119.
18. *Nam M.K., Han J.H., Jang J.Y., Yun S.E., Kim G.Y., Kang S., Rhim H.* A novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of alpha-synuclein // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2015. No. 12(1850). Pp. 2497-2505.
19. *Oueslati A.* Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? // *J. Parkinsons Dis.* 2016. No. 6(1). Pp. 39-51.
20. *Papachroni K., Ninkina N., Wanless J., Kalofoutis A.T., Gnuchev N.V., Buchman V.L.* Peripheral sensory neurons survive in the absence of alpha- and gamma-synucleins // *J. Mol. Neurosci.* 2005. No. 25(2). Pp. 157-64.
21. *Surguchov A.* Intracellular Dynamics of Synucleins: "Here, There and Everywhere" // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2015. No. 320. Pp. 103-169.
22. *Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M.* Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein // *J. Comp. Neurol.* 2016. No. 524(6). Pp. 1236-58.
23. *Tiunova A.A., Anokhin K.V., Saha A.R., Schmidt O., Hanger D.P., Anderton B.H., Davies A.M., Ninkina N.N., Buchman V.L.* Chicken synucleins: cloning and expression

in the developing embryo // *Mech. Dev.* 2000. No. 99(1-2). Pp. 195-198.

24. **Vivacqua G., Casini A., Vaccaro R., Fornai F., Yu S., D'Este L.** Different sub-cellular localization of alpha-synuclein in the C57BL/6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies // *J. Chem. Neuroanat.* 2011. No. 41(2). Pp. 97-110.

References

1. **Pchelina S.N.** Alfa-sinuklein kak biomarker bolezni Parkinsona [Alpha-synuclein as biomarker of Parkinson's disease]. *Annaly klinicheskoy i ehksperimental'noj nevrologii* [Annals of clinical and experimental neurology]. 2011. T. 5. No. 4. Pp. 46-51. (In Russian).
2. **Sobolev V.B., Khudoerov R.M.** Immunogistohimicheskoe vyavlenie α -sinukleina v slyunnoj zheleze kak biomarker bolezni Parkinsona [Immunohistochemical detection of alpha-synuclein in salivary gland as biomarker of Parkinson disease]. *Byulleten' Nacionalnogo obshchestva po izucheniyu bolezni Parkinsona i rasstrojstv dvizhenij* [Bulletin of the National Society for the Study of Parkinson's Disease and Movement Disorders]. 2017. No. 2. Pp. 16-23. (In Russian).
3. **Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L.** Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. of Neurosci.* 2011. No. 31(20). Pp. 7264-7274.
4. **Arawaka S., Sato H., Sasaki A., Koyama S., Kato T.** Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in alpha-synuclein aggregates. *Acta Neuropathologica Communications.* 2017. No. 1(5). P. 48.
5. **Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E.** Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 2003. No. 24(2). Pp. 197-211.
6. **Braak H., Sastre M., Bohl J.R., de Vos R.A., Del Tredici K.** Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol.* 2007. No. 113(4). Pp. 421-429.
7. **Braz J.M., Nassar M.A., Wood J.N., Basbaum A.I.** Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent

nociceptor. *Neuron.* 2005. Vol. 47(6). Pp. 787-793.

8. **Burre J., Sharma M., Sudhof T.C.** Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2017. pii: a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091.
9. **Del Tredici K., Braak H.** Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2012. No. 124(5). Pp. 643-64.
10. **Djelloul M., Holmqvist S., Boza-Serrano A., Azevedo C., Yeung M.S., Goldwurm S., Frisén J., Deierborg T., Roybon L.** Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models. *Stem Cell Reports.* 2015. No. 5(2). Pp. 174-84.
11. **Donadio V., Incensi A., Rizzo G., Scaglione C., Capellari S., Fileccia E., Avoni P., Liguori R.** Spine Topographical Distribution of Skin α -Synuclein Deposits in Idiopathic Parkinson Disease. *J. of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2017. No. 5(76). Pp. 384-389.
12. **Doppler K., Ebert S., Üçeyler N., Trenkwalder C., Ebentheuer J., Volkmann J., Sommer C.** Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. *Acta Neuropathol.* 2014. No. 128(1). Pp. 99-109.
13. **Giascon B.I., Duda J.E., Forman M.S., Lee V.M., Trojanowski J.Q.** Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons. *Exp. Neurol.* 2001. No. 172(2). Pp. 354-362.
14. **Huang Z., Xu Z., Wu Y., Zhou Y.** Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains. *Neuroscience.* 2011. No. 199. Pp. 318-32.
15. **Lin C.H., Chao C.C., Wu S.W., Hsieh P.C., Feng F.P., Lin Y.H., Chen Y.M., Wu R.M., Hsieh S.T.** Pathophysiology of Small-Fiber Sensory System in Parkinson's Disease: Skin Innervation and Contact Heat Evoked Potential. *Medicine (Baltimore).* 2016. No. 95(10). E3058. doi: 10.1097/MD.0000000000003058.
16. **Ma M.R., Hu Z.W., Zhao Y.F., Chen Y.X., Li Y.M.** Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation. *Scientific Reports.* 2016. No. 6. P. 37130. doi: 10.1038/srep37130.
17. **Muntané G., Ferrer I., Martínez-Vicente M.** α -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience.* 2012. No. 200. Pp. 106-119.

18. Nam M.K., Han J.H., Jang J.Y., Yun S.E., Kim G.Y., Kang S., Rhim H. A novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of alpha-synuclein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2015. No. 12(1850). Pp. 2497-2505.
19. Oueslati A. Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J. Parkinsons Dis*. 2016. No. 6(1). Pp. 39-51.
20. Papachroni K., Ninkina N., Wanless J., Kalofoutis A.T., Gnuchev N.V., Buchman V.L. Peripheral sensory neurons survive in the absence of alpha- and gamma-synucleins. *J. Mol. Neurosci*. 2005. No. 25(2). Pp. 157-64.
21. Surguchov A. Intracellular Dynamics of Synucleins: "Here, There and Everywhere". *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. 2015. No. 320. Pp. 103-169.
22. Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J. Comp. Neurol*. 2016. No. 524(6). Pp. 1236-58.
23. Tiunova A.A., Anokhin K.V., Saha A.R., Schmidt O., Hanger D.P., Anderton B.H., Davies A.M., Ninkina N.N., Buchman V.L. Chicken synucleins: cloning and expression in the developing embryo. *Mech. Dev*. 2000. No. 99(1-2). Pp. 195-198.
24. Vivacqua G., Casini A., Vaccaro R., Fornai F., Yu S., D'Este L. Different sub-cellular localization of alpha-synuclein in the C57BL/6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies. *J. Chem. Neuroanat*. 2011. No. 41(2). Pp. 97-110.

Localization of total and Ser 129 phosphorylated α -synuclein in the rat peripheral nervous system (testing of different antibodies)

D.N. Voronkov, O.V. Salnikova, R.M. Khudoerkov

The deposition of α -synuclein (α -Syn) in the peripheral nervous system precedes the motor symptoms of Parkinson's disease and is considered as a pathological sign and biomarker. However, data on the localization of α -Syn in the intact nervous system require clarification for the future development of experimental models and diagnostic tests. Localization of α -Syn and its the remainder of serine 129 phosphorylated form in peripheral nervous system of intact rats were studied by immunohistochemistry with use of different commercially available antibodies. α -Syn were found in presynaptic terminals of spinal dorsal horn, neuronal somata of prevertebral ganglia, nerve plexuses of vascular wall and GFAP-negative glial cells. Different antibodies to phosphorylated α -Syn shown uneven binding. Staining of processes, somata or nuclei of certain dorsal root ganglia neurons were found. No one of used antibodies detected small nociceptive IB4-positive neurons. The ambiguity of the obtained results can be related both to the different availability of epitopes detected by antibodies as a result of α -Syn interactions with other proteins, and with non-specific binding of antibodies to unidentified targets.

Key words: α -synuclein, peripheral nervous system, dorsal root ganglion, rat, immunohistochemistry.

Адрено- и холинореактивность эритроцитов и анализ их сопряженности с показателями сердечного ритма у крыс

Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев, В.О. Ступин, Д.Л. Тёплый

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», Астрахань

Контактная информация: д.б.н. Курьянова Евгения Владимировна, fyzevk@rambler.ru

У нелинейных крыс определяли величины β -адренореактивности эритроцитов (β -АРЭ) и М-холинореактивности эритроцитов (М-ХРЭ) по степени торможения гипосмотического гемолиза в среде инкубации соответственно анаприлином и атропином, параметры вариабельности сердечного ритма (ВСР) на аппаратно-программном комплексе «Варикард». Установлены средние значения и диапазоны варьирования β -АРЭ ($44,2 \pm 1,0$, от 11 до 84 отн.ед.), М-ХРЭ ($9,2 \pm 0,4$, от 1,5 до 18 отн.ед.). С применением метода кластеризации выявлено, что среди нелинейных крыс преобладают особи со средними ($32,9-50,0$ отн.ед.) и высокими (>50 отн.ед.) величинами β -АРЭ (до 85% численности), но с низкими ($1,7-7,6$ отн.ед.) и средними ($7,9-14,2$ отн.ед.) значениями М-ХРЭ (до 75% численности). Крысам с низкой β -АРЭ и М-ХРЭ характерна более высокая напряженность сердечного ритма, высокая централизация управления при низкой мощности НФ-волн. β -АРЭ и М-ХРЭ интактных крыс слабо коррелируют между собой, образуют разные по силе, но преимущественно слабые связи с показателями ВСР, в большей мере сопряжены с индексом напряжения и мощностью волн спектра ВСР, нежели с частотой сердечного ритма. Факторный анализ β -АРЭ, М-ХРЭ и параметров ВСР выявил 4 информационных фактора, из которых Ф1, Ф3 и Ф4 образованы преимущественно показателями ВСР, а фактор Ф2 – показателями реактивности эритроцитов, особенно β -АРЭ, М-ХРЭ коррелирует с Ф1 и Ф4. Следовательно, β -АРЭ и М-ХРЭ могут выступать как факторообразующие показатели при характеристике регуляторных влияний. Определение β -АРЭ и М-ХРЭ в комплексе с параметрами ВСР способно значительно дополнить представления об изменении регуляторных влияний на уровне клеточных мембран при организации медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных.

Ключевые слова: адрено- и холинореактивность эритроцитов, вариабельность сердечного ритма, кластерный анализ, факторный анализ, нелинейные крысы.

Введение

В последнее время большое внимание ученых и клиницистов привлекает реактивность форменных элементов крови к веществам адренергической, холинергической природы и др. [5, 10, 12, 16-19]. Зрелые эритроциты рассматриваются как весьма удобный объект для изучения регуляторных процессов на клеточном уровне. В процессе дифференцировки эритроциты, несмотря на утрату ядра и цитоплазматических

органелл, сохраняют многие элементы сигнальных каскадов, ионные каналы и ферментные системы, несут на мембранах различные подтипы адрено- и холинорецепторов [3, 9, 18]. Несмотря на достаточно широкое использование методов оценки адрено- и холинореактивности эритроцитов, физиологическая роль адрено- и холинорецепторов форменных элементов крови в полной мере еще не раскрыта [16, 19, 22]. Адрено- и холинореактивность эритроцитов

определяют преимущественно у людей в диагностических целях, но у лабораторных животных эти свойства эритроцитов остаются практически не изученными. Отсутствие экспериментальных данных затрудняет теоретическое осмысление физиологической значимости этих свойств эритроцитов. Неизвестно, насколько изменчивы адрено- и холинореактивность эритроцитов при различных состояниях организма, сопряжены ли они с показателями вариабельности сердечного ритма (ВСР), считающимися, согласно [1, 4], объективными индикаторами активности адренергических и холинергических каналов регуляции на системном уровне.

В связи с этим, **целью** нашего исследования стало определение величин β -адренореактивности эритроцитов (β -АРЭ), М-холинореактивности эритроцитов (М-ХРЭ), показателей ВСР, анализ их варьирования и возможных взаимосвязей у нелинейных крыс.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 170-ти самцах нелинейных белых крыс массой 220-260 г, полученных из вивария при лаборатории экспериментальной физиологии Астраханского государственного университета. До и в период эксперимента животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 24-26°C, относительная влажность 35-40%, освещение в помещениях – искусственное, с фиксированным режимом «день-ночь»), в пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой на стандартном рационе (комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный)

ПК-120 ГОСТ 50258-92 производства ООО «Лабораторкорм»). Животные потребляли корм и воду *ad libitum*.

Все эксперименты выполняли в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Европейской конвенции Directive 2010/63/EU of 22 September 2010. Эксперименты проведены в осенне-зимний период.

Забор крови у крыс осуществляли из хвостовой вены [13]. β -АРЭ определяли экспресс-методом Стрюк Р.И. и Длусской И.Г. (2003) [17], основанном на оценке степени снижения гипоосмотического гемолиза эритроцитов в присутствии β -адреноблокатора в среде инкубации. Для этого из одного образца крови готовили контрольную пробу (инкубация эритроцитов в гипотонической среде) и опытную пробу (инкубация эритроцитов в гипотонической среде с блокатором β -адренорецепторов анаприлином), пробы дублировались.

Для определения М-ХРЭ использовали собственную модификацию метода определения β -АРЭ (заявка на патент РФ № 2016137540), суть которой состояла в использовании блокатора М-холинорецепторов – атропина вместо анаприлина. При выборе концентрации атропина учитывались результаты работ [16, 21]. Оптические плотности проб измеряли на спектрофотометре APEL DD-303UV при длине волны 540 нм. Величины β -АРЭ и М-ХРЭ рассчитывали по формуле:

$$\beta\text{-АРЭ (М-ХРЭ)} = \left(1 - \frac{(E_{оп1} + E_{оп2})}{(E_{к1} + E_{к2})}\right) \times 100\%,$$

где β -АРЭ – величина β -адренореактивности эритроцитов, отн.ед.; М-ХРЭ – величина М-холинореактивности эритроцитов, отн.ед.; Еоп1 и Еоп2 – оптические плотности опытных проб, ед.опт.плотн.; Ек1 и Ек2 – оптические плотности контрольных проб, ед.опт.плотн.

Согласно данной формуле, β -АРЭ (М-ХРЭ) рассчитывается как процент, на который осмотический гемолиз в опытных пробах с β -адреноблокатором (М-холиноблокатором) ниже, чем в контрольных.

Для изучения активности адренергических и холинергических механизмов регуляции на системном уровне применяли методы анализа ВСР [1]. ЭКГ регистрировали у бодрствующих нефиксированных крыс на аппаратно-программном комплексе «Варикард» с использованием миниатюрных электродов-зажимов при местном обезболивании лидокаином [6, 7]. Анализ ВСР выполняли на отрезках из 350-ти R-R-интервалов в программе

«ИСКИМ6» («Рамена», Россия). Рассчитывали частоту сердечного ритма (ЧСР), индекс напряжения (ИН) с учетом ширины класса гистограммы (7,8 мс): $ИН = (АМо / 2 \times \Delta X \times Мо) \times (50 / 7,8) \times 1000$ [6, 7]. Спектральный анализ ВСР у крыс выполняли в диапазонах: HF (0,9-3,5 Гц), LF (0,32-0,9 Гц), VLF (0,17-0,32 Гц), как было описано ранее [6, 7]. Определяли абсолютные мощности волн (в $мс^2$) и рассчитывали индекс централизации (IC): $IC = (LF + VLF) / HF$.

Статистическая обработка результатов выполнялась с помощью t-теста, кластерного, факторного и корреляционного анализа в программе Statistica 10.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований

В ходе экспериментов β -АРЭ была определена у 170-ти самцов крыс. На основе этих данных был выстроен вариационный ряд с анализом нормальности распределения значений β -АРЭ в выборке (рис. 1). Анализ выявил

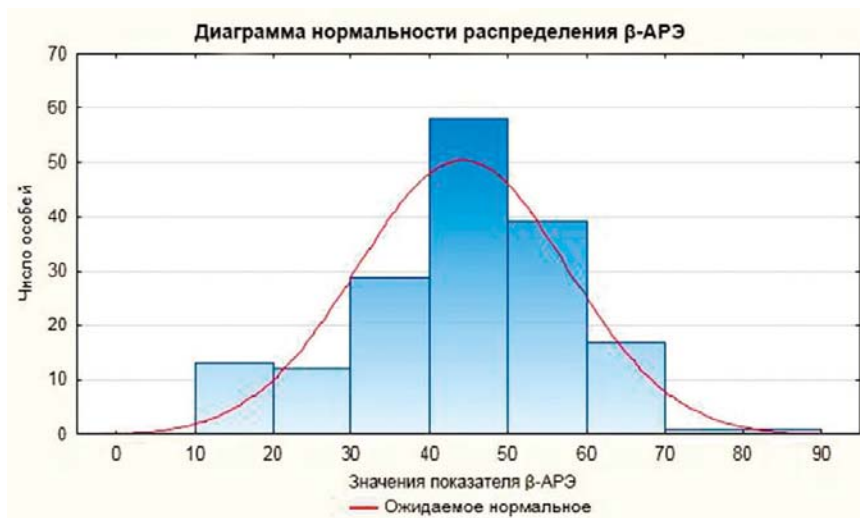


Рис. 1. Распределение значений β -АРЭ в выборке из 170-ти нелинейных крыс и его сопоставление с нормальным распределением (из программы Statistica 10).

широкий диапазон изменчивости значений β -АРЭ от минимальной величины в 11,1 отн.ед. до максимальной, которая составила 84,8 отн.ед. На диаграмме (рис. 1) виден сдвиг вариационного ряда вправо, но в целом он соответствовал нормальному распределению. Центральный класс вариационного ряда включал 34% всех значений β -АРЭ выборки. Среднее значение β -АРЭ для всей выборки равнялось $44,2 \pm 1,0$ отн.ед. и приходилось на центральный класс вариационного ряда.

У 128-ти особей крыс были зарегистрированы ЭКГ и проведен анализ ВСР, как описано ранее [6, 7]. При проведении стандартных манипуляций, связанных с креплением электродов, животные не подавали признаков болевых ощущений и тревоги, поэтому значения показателей ВСР рассматривались нами как отражающие именно состояние спокойного бодрствования.

Как видно из табл. 1, частота сердечного ритма (ЧСР) у самцов крыс в среднем составила 331 уд./мин, что соответствовало данным др. исследований, в которых также регистрировался сердечный ритм у крыс в состоянии покоя

[6, 7, 14]. Средние величины ИН, мощностей HF-, LF- и VLF-волн соответствовали показателям, свойственным взрослым животным в покое, согласно [6, 7]. IC оказался выше 1 отн.ед., что определялось преобладанием суммарной мощности медленных волн над HF-волнами. Как следует из данных табл. 1, значения всех показателей ВСР широко варьировали около средних величин. Особенно большой была разница между максимальными и минимальными значениями спектральных параметров ВСР.

Учитывая высокую изменчивость β -АРЭ и параметров ВСР, для более глубокого изучения структуры выборки и выяснения возможных зависимостей между этими показателями был выполнен кластерный анализ данных методом k-средних. Основным критерием группировки стала β -АРЭ. В результате кластеризации выборка крыс была разделена на 3 группы (кластера) (табл. 2).

В группу с низкой β -АРЭ вошли животные со значениями показателя от 12,6 до 31,7 отн.ед. К группе со средней β -АРЭ были отнесены крысы с величинами

Таблица 1

Показатели вариабельности сердечного ритма у самцов нелинейных крыс в состоянии спокойного бодрствования (n=128)

Показатель	Средняя и ошибка средней	Min значение показателя в выборке	Max значение показателя в выборке
ЧСР, уд/мин	$331,0 \pm 3,9$	253	447
ИН, отн. ед.	$31,2 \pm 2,6$	1,8	149,6
HF, мс ²	$13,6 \pm 1,5$	0,64	100,48
LF, мс ²	$9,4 \pm 1,1$	0,12	64,64
VLF, мс ²	$6,2 \pm 0,6$	0,14	27,02
IC, отн.ед.	$1,8 \pm 0,1$	0,07	8,5

Таблица 2
Значения β -АРЭ и параметров ВСР у самцов нелинейных крыс в группах-кластерах, выделенных на основе величины β -АРЭ ($M \pm m$)

Группы-кластеры	Животные с низкой β -АРЭ (n=15)	Животные со средней β -АРЭ (n=58)	Животные с высокой β -АРЭ (n=55)
β -АРЭ, отн.ед.	21,5 $\pm$ 1,8 ^{***, ^^}	43,6 $\pm$ 0,6	56,6 $\pm$ 0,6 ^{***}
min и max значение β -АРЭ, отн.ед.	12,6 – 31,7	32,9 – 50,0	50,4 – 67,2
ЧСР, уд./мин	343,3 $\pm$ 17,7	327,9 $\pm$ 5,4	331,0 $\pm$ 6,4
ИН, отн.ед.	38,4 $\pm$ 6,4 [*]	25,4 $\pm$ 2,1	27,6 $\pm$ 2,9
HF, мс ²	5,2 $\pm$ 0,8 [*] , ^	11,8 $\pm$ 1,3	13,8 $\pm$ 2,1
LF, мс ²	6,5 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 0,9	8,7 $\pm$ 1,3
VLF, мс ²	6,6 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,7
IC, отн.ед.	2,6 $\pm$ 0,5 [*] , ^^	1,7 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1

Примечания:

^{*}, ^{**}, ^{***} – различия достоверны по сравнению с группой со средней β -АРЭ при $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$;

[^], ^{^^}, ^{^^^} – различия достоверны по сравнению с группой с высокой β -АРЭ при $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

нами показателя от 32,9 до 50,0 отн.ед. Группу с высокой β -АРЭ сформировали особи с показателями от 50,4 до 67,2 отн.ед. Самой многочисленной (n=58) оказалась группа-кластер со средними значениями β -АРЭ, что согласуется с нормальностью распределения этого показателя в выборке. Близка к ней по численности (n=55) группа-кластер из крыс с высокой β -АРЭ, а группа-кластер из особей с низкой β -АРЭ была самой малочисленной (n=15). Следовательно, среди нелинейных крыс почти в 88,3% случаев можно обнаружить животных со значениями β -АРЭ в пределах средних и высоких величин и лишь в 11,7% случаев – с низкой β -АРЭ.

Анализ ВСР с учетом проведенной группировки особей по величине β -АРЭ показал (табл. 2), что у животных с низкой β -АРЭ ИН и IC были выше на 51-53% ($p < 0,05$), а мощность HF-волн

– ниже на 55,9% ($p < 0,05$), чем в группе со средней β -АРЭ. Аналогичными, но более выраженными были различия по этим показателям между крысами с низкой и высокой β -АРЭ: по IC – на 73%, по мощности волн HF – на 62,3% ($p < 0,05$). Т.е. у крыс с низкой β -АРЭ зарегистрирована самая низкая мощность HF-волн при наиболее высоких величинах ИН и IC.

Таким образом, диапазон изменчивости β -АРЭ у самцов нелинейных крыс в покое оказался довольно широким, встречались низкие, средние и высокие значениями показателя, но доминировали (более 80%) особи со средними и высокими величинами β -АРЭ. При этом животные с низкой β -АРЭ отличались от крыс со средними и высокими ее значениями большей напряженностью и централизацией управления ритмом сердца в связи с меньшей мощностью HF-волн.

Относительно М-ХРЭ следует отметить, что у людей она определяется довольно редко [16, 19], а у крыс это свойство эритроцитов оставалось неизученным, судя по отсутствию данных в доступной литературе. С применением собственной модификации методики β -АРЭ, как указано выше, нами определены значения М-ХРЭ у 128-ти самцов крыс. На основе этих величин был построен и проанализирован вариационный ряд (рис. 2).

По сравнению с β -АРЭ диапазон изменчивости значений М-ХРЭ оказался значительно уже: минимальная М-ХРЭ составила 1,7 отн.ед., а максимальная – всего 18,4 отн.ед. Вариационный ряд был немного смещен влево, в сторону низких величин, но в целом соответствовал нормальному распределению (рис. 2). Центральные классы вариационного ряда включали 28% и 31% всех значений М-ХРЭ выборки. На границу этих классов приходилось среднее значение М-ХРЭ – $9,2 \pm 0,4$ отн.ед. Т.е. ве-

личины М-ХРЭ крыс были почти в 5 раз ниже и варьировали в более узких пределах, чем значения β -АРЭ, определенные у тех же животных.

Как и в случае с β -АРЭ, был проведен кластерный анализ выборки крыс по величине М-ХРЭ с одновременной оценкой показателей ВСР в выделенных группах-кластерах. Методом k-средних выборка была разделена на 3 группы-кластера (табл. 3). К группе с низкой М-ХРЭ были отнесены животные с величинами показателя от 1,7 до 7,6 отн.ед., группа со средней М-ХРЭ объединила крыс со значениями показателя от 7,9 до 13,4 отн.ед., а группа с высокой М-ХРЭ – особей с величинами от 14,2 до 18,4 отн.ед. Самой многочисленной ($n=56$) оказалась группа-кластер из животных с низкими значениями М-ХРЭ, а самой малочисленной ($n=21$) – группа из крыс с высокими значениями М-ХРЭ. Т.е. среди обследованных животных в 43,8% случаев встречались особи с низкой М-ХРЭ, а реже всего



Рис. 2. Распределение значений М-ХРЭ в выборке из 128-ти нелинейных крыс и его сопоставление с нормальным распределением (из программы Statistica 10).

(16,4% случаев) – животные с высокой М-ХРЭ. В целом наибольшее количество (почти 84,4%) значений М-ХРЭ нелинейных крыс находилось в пределах низких и средних величин.

Параметры ВСР у крыс с различной М-ХРЭ в основном не имели особенностей. Но ИН был самым высоким у крыс с низкой М-ХРЭ и превышал значения у животных с высокой М-ХРЭ на 68,3% ($p<0,05$) (табл. 3).

Таким образом, нами определены величины М-ХРЭ у крыс, показано, что они значительно ниже, а диапазон их варьирования уже, чем величин β -АРЭ. Среди крыс присутствуют особи с низкими, средними и высокими значениями М-ХРЭ, но подавляющее большинство – это животные с низким и средним значениями показателя. Между группами, выделенными на основе М-ХРЭ, различия по параметрам ВСР в основ-

ном не существенны, но у крыс с низкой М-ХРЭ ритм сердца напряженнее, чем у крыс с высокой М-ХРЭ.

Помимо кластерного анализа, для выявления возможных зависимостей между показателями реактивности эритроцитов и ВСР были выполнены корреляционный и факторный анализ данных от 128-ти особей крыс. В таблицы для анализа также были введены значения оптических плотностей проб по определению β -АРЭ и М-ХРЭ (β -АРЭ опт.пл. и М-ХРЭ опт.пл.).

Анализ корреляционных связей показал, что β -АРЭ и М-ХРЭ между собой сопряжены слабо ($r=0,112$), следовательно, являются достаточно самостоятельными характеристиками реактивности эритроцитов к регуляторным факторам. Но связь между ними существует через оптические плотности проб по их определению ($r=-0,35$, $p<0,05$). β -АРЭ,

Таблица 3
Значения М-ХРЭ и параметров ВСР у самцов нелинейных крыс в группах-кластерах, выделенных на основе величины М-ХРЭ ($M\pm m$)

Группы	Животные с низкой М-ХРЭ (n=56)	Животные со средней М-ХРЭ (n=52)	Животные с высокой М-ХРЭ (n=21)
М-ХРЭ, отн.ед.	5,7 $\pm$ 0,2***	9,6 $\pm$ 0,2	15,9 $\pm$ 0,4***
min и max значение М-ХРЭ, отн.ед.	1,7 – 7,6	7,9 – 13,4	14,2 – 18,4
ЧСР, уд./мин	329,8 $\pm$ 6,3	326,7 $\pm$ 6,4	328,6 $\pm$ 7,0
ИН, отн.ед.	30,3 $\pm$ 2,6^	24,3 $\pm$ 2,5	18,0 $\pm$ 2,2
HF, мс ²	10,6 $\pm$ 1,3	12,1 $\pm$ 1,5	15,5 $\pm$ 3,3
LF, мс ²	6,9 $\pm$ 1,0	10,2 $\pm$ 1,3	9,8 $\pm$ 1,8
VLF, мс ²	5,4 $\pm$ 0,7	6,2 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 0,8
IC, отн.ед.	1,7 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3

Примечания:

*** – различия достоверны по сравнению с группой со средней М-ХРЭ при $p<0,001$;

^ – различия достоверны по сравнению с группой с высокой М-ХРЭ при $p<0,05$.

М-ХРЭ и оптические плотности их проб весьма слабо сопряжены с ЧСР и в большей степени коррелируют с показателями ВСР. Оптическая плотность проб на определение β -АРЭ и показатель М-ХРЭ образует отрицательную связь с ИН ($r=-0,21$, $p<0,05$). Эта связь говорит о том, что у крыс с высоким ИН выше вероятность обнаружения низкой М-ХРЭ и степени осмотического гемолиза эритроцитов при определении β -АРЭ. Сила корреляций β -АРЭ и М-ХРЭ с мощностями волн спектра ВСР близка к статистической значимости, хотя и не достигает ее. Из этих связей наиболее сильными являются корреляции показателей реактивности эритроцитов с мощностью HF-волн (0,133-0,178). В меньшей степени β -АРЭ и М-ХРЭ сопряжены с медленными волнами, но оптическая плотность проб по определению β -АРЭ имеет положительную связь с мощностью VLF-волн ($r=0,20$, $p<0,05$).

В целом корреляционный анализ выявил довольно слабую сопряженность фоновых характеристик реактивности эритроцитов и показателей ВСР. Вместе с тем результаты анализа говорят, что β -АРЭ и М-ХРЭ являются достаточно самостоятельными показателями, образующими разные по силе связи, причем в большей мере – с параметрами ВСР (особенно с ИН и мощностью HF), нежели с ЧСР. В частности, с ИН сильнее сопряжена М-ХРЭ, чем β -АРЭ.

Факторный анализ показателей был выполнен с использованием ортогонального вращения по методу Varimax в программе Statistica 10.0. Выделено 4 фактора, 3 из которых, как было показано ранее [6, 7], образованы преимущественно показателями ВСР. Однако, за счет включения в число переменных β -АРЭ и М-ХРЭ, значимость факторов в отражении разнообразия выборки изменилась (табл. 4).

Таблица 4

Матрица факторного анализа показателей реактивности эритроцитов и ВСР нелинейных крыс

Переменные	Факторный анализ			
	Выделенные нагрузки значимы на уровне $p<0,05$			
	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
β АРЭ, отн.ед.	0,263	-0,749	0,129	0,209
β -АРЭ, опт.пл.	0,177	0,646	-0,239	-0,456
М-ХРЭ, отн.ед.	0,327	-0,399	0,257	-0,432
М-ХРЭ, опт.пл.	0,286	-0,786	0,328	-0,164
ЧСР, уд./мин	-0,239	0,106	0,501	-0,662
ИН, отн.ед.	-0,842	-0,116	0,193	-0,108
HF, мс ²	0,626	-0,173	-0,520	-0,313
LF, мс ²	0,800	0,219	0,135	0,051
VLF, мс ²	0,749	0,335	0,333	0,130
IC, отн.ед.	0,106	0,455	0,769	0,219
Общ. дисперсия: 7,443	2,660	2,177	1,526	1,080
Доля общ. дисперсии: 0,745	0,266	0,218	0,153	0,108

Самым значимым по весу факторных нагрузок оказался Ф1, с которым были очень тесно сопряжены ИН и абсолютные мощности волн ВСР. Этот фактор был определен как *фактор симпатопарасимпатических отношений*, согласно [6, 7]. Из показателей реактивности эритроцитов с этим фактором сильнее всего оказалась связанной М-ХРЭ ($r=0,327$).

Вторым по значимости стал фактор, образованный β -АРЭ и оптическими плотностями проб по определению β -АРЭ и М-ХРЭ. Ф2 был определен как *фактор реактивности эритроцитов крови к регуляторным влияниям*. Этот новый фактор оттеснил на третью позицию *фактор централизации управления* (Ф3), который в основном формируется ИС. ЧСР как основной факторообразующий показатель вошла лишь в Ф4, хотя при анализе показателей ВСР она обычно образует второй по значимости фактор Ф2 (табл. 4). Помимо ЧСР с Ф4, на границе статистической значимости коррелировала М-ХРЭ и оптическая плотность проб на определение β -АРЭ. Ф4 был определен как *фактор гуморальной регуляции*, с учетом [6, 7].

Таким образом, факторный анализ продемонстрировал весомость показателей реактивности эритроцитов в характеристике регуляторных влияний, а также четко выявил самостоятельность параметров β -АРЭ и М-ХРЭ в такой характеристике, поскольку β -АРЭ выступает как основной показатель фактора Ф2, а М-ХРЭ в той или иной мере коррелирует и с Ф4, и с Ф1. Факторный анализ подтвердил, что с показателями сердечного ритма теснее сопряжена М-ХРЭ, нежели β -АРЭ.

Обсуждение результатов

Переходя к обсуждению, отметим, что факт проявления β -АРЭ и М-ХРЭ подтверждает, что β -АР и М-ХР мембран эритроцитов служат не только для механического связывания соответствующих лигандов [3], но и обеспечивают регуляторные влияния на внутриэритроцитарные процессы через сигнальные каскады [8, 9, 15]. Очевидно, эти функции β -АР и М-ХР эритроцитов у человека и животных являются идентичными.

β -АРЭ крыс характеризуется довольно широким диапазоном изменчивости (11-85 отн.ед.), согласующимся с данными для людей (6-60 отн.ед.) [10, 17]. Диапазон варьирования М-ХРЭ значительно уже (1,7-18,4 отн.ед.), этот показатель является более стабильным, чем β -АРЭ. Среднее значения β -АРЭ у крыс равно $44,2 \pm 1,0$ отн.ед., а М-ХРЭ – $9,2 \pm 0,4$ отн.ед., следовательно, повышение осмотической стойкости мембран при связывании анаприлина с β -АР эритроцитов выражено почти в 5 раз сильнее, чем при воздействии атропина на М-ХР эритроцитов.

Говоря о возможных механизмах проявления β -АРЭ и М-ХРЭ, полагаем, что в основе однонаправленности, но разной выраженности эффектов с АР и ХР на осмотическую стойкость эритроцитов лежат особенности молекулярных механизмов их реализации. Связывание анаприлина с β -АР тормозит фосфорилирование белков и уменьшает прочность связей между элементами цитоскелета [8, 9], в результате жесткость эритроцитарной мембраны снижается, что позволяет ей сохранять целостность и структурную стабильность при растяжении [15]. Связывание атропина с

М-ХР, вероятно, способно через специфические сигнальные пути активировать каскад аденилатциклаза-цАМФ или аллостерически модифицировать элементы др. адренергических сигнальных каскадов [11, 23, 24], что приводит к стабилизации и даже повышению прочности связей между белками цитоскелета мембраны – соответственно, увеличивает ее жесткость. Увеличение жесткости мембраны позволяет эритроцитам противостоять осмотической нагрузке, но в довольно узких пределах, чем обусловлены низкие величины М-ХРЭ.

Применение типологического подхода с кластеризацией выборки выявило, что среди нелинейных крыс встречаются особи с низкими, средними и высокими величинами β -АРЭ и М-ХРЭ, что можно было ожидать с учетом генетической неоднородности выборки. При этом более 80% крыс имеют высокие (>50 отн.ед.) и средние (30-50 отн.ед.) значения β -АРЭ. Вероятно, этим можно объяснить тот факт, что средняя величина β -АРЭ крыс заметно превышает величину, считающуюся нормальной для человека, – 20 отн.ед. [10, 17]. По М-ХРЭ соотношение иное: более 80% крыс характеризуются низкими ($<7,6$ отн.ед.) и средними (7,6-13 отн.ед.) величинами показателя.

Одновременное определение у крыс параметров реактивности эритроцитов и ВСР в сочетании с типологическим подходом к анализу позволило выявить, что для животных с низкой β -АРЭ характерна высокая напряженность сердечного ритма при низкой мощности волн НФ, в отличие от крыс с высокими и средними величинами β -АРЭ. Высокая ригидность ритма сердца считается результатом преобладания симпатоза-

дреналовых влияний [1, 4, 7], поэтому низкие значения β -АРЭ можно рассматривать как проявление десенситизации мембраны эритроцитов к стабильно повышенному уровню катехоламинов. У крыс с низкой М-ХРЭ ритм сердца напряженнее, чем у животных с высокой М-ХРЭ. В этом случае можно предполагать прямую зависимость между низким уровнем холинергических влияний, который определяет высокую ригидность ритма сердца, согласно [1], и слабой реактивностью эритроцитов к веществам, комплементарным М-ХР.

Применение корреляционного и факторного анализа выявило, что β -АРЭ и М-ХРЭ интактных животных образуют с показателями ВСР связи слабой и средней силы. Слабая сопряженность показателей довольно характерна для состояния спокойного бодрствования и согласуется с данными др. авторов [1, 2, 7]. Вместе с тем, для каждого из показателей реактивности эритроцитов свойственна собственная структура корреляций с параметрами ВСР, что указывает на их самостоятельность в характеристике регуляторных влияний. Важно отметить, что β -АРЭ и М-ХРЭ сильнее коррелируют с ИН и мощностью НФ-волн, отражающими активность нервных каналов регуляции сердца, нежели с ЧСР, которая сильно зависит от гуморальных влияний на водитель ритма сердца [1, 7]. Структура корреляций и факторных нагрузок говорит о большей сопряженности М-ХРЭ, нежели β -АРЭ с показателями ВСР.

Таким образом, в ходе проведенных исследований показана возможность определения реактивности эритроцитов у нелинейных крыс, получены фактические данные, выявлены особенности

величин β -АРЭ и М-ХРЭ, изучена их внутригрупповая изменчивость у этих животных. Проведен анализ сопряженности β -АРЭ и М-ХРЭ с параметрами ВСР и информационная значимость в характеристике регуляторных влияний на примере лабораторных крыс. Это дает основание считать, что применение методов определения β -АРЭ, М-ХРЭ в комплексе с анализом ВСР в биомедицинских исследованиях на лабораторных животных позволит давать более адекватную оценку изменениям регуляторных механизмов на мембранном и системном уровнях организации, выдвигать новые предположения и делать более обоснованные выводы.

Выводы

У интактных нелинейных крыс средние значения и диапазоны варьирования β -АРЭ составляют $44,2 \pm 1,0$ и 11-84 отн.ед., М-ХРЭ – $9,2 \pm 0,4$ и 1,5-18 отн.ед. соответственно. Для большинства (почти 80%) нелинейных крыс характерны высокие и средние величины β -АРЭ, низкие и средние величины М-ХРЭ.

Животным с низкой β -АРЭ и М-ХРЭ свойственна высокая ригидность ритма сердца в отличие от животных с высокими значениями показателей реактивности эритроцитов.

β -АРЭ и М-ХРЭ интактных нелинейных крыс слабо коррелируют между собой, образуют разные по силе связи с параметрами ВСР, являясь достаточно самостоятельными характеристиками, которые в большей мере сопряжены с ИН и мощностью HF, нежели с ЧСР.

Факторный анализ продемонстрировал информативную значимость показателей реактивности эритроцитов в характеристике регуляторных влияний,

их способность выступать в качестве фактоорообразующих показателей, подтвердил, что М-ХРЭ в большей мере, чем β -АРЭ, сопряжена с показателями сердечного ритма.

Список литературы

1. **Баевский Р.М.** Анализ вариабельности сердечного ритма в космической медицине // Физиология человека. – 2002. – Т. 28, № 2. – С. 70-82.
2. **Бань А.С., Парамонова Н.А., Загородный Г.М.** Анализ взаимосвязи показателей вариабельности ритма сердца // Военная медицина. – 2010. – № 4. – С. 21-24.
3. **Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г.** Структурно-функциональная характеристика мембран эритроцита и ее изменение при патологиях разного генеза // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3. – С. 334-354.
4. **Коркушко О.В., Шатило В.Б., Писарук А.В., Лишневская В.Ю., Чеботарев Н.Д.** Анализ вариабельности ритма сердца в клинической практике: 25-летний опыт изучения // Электр. ресурс: мат-лы межд. конф. – 2002. – С. 5-20.
5. **Купреева М.С., Петросян Э.А., Сухинин А.А.** Оценка состояния красной крови при желчном перитоните // Бюллетень Волгоградского науч. центра РАМН. – 2008. – № 2. – С. 49-51.
6. **Курьянова Е.В.** К вопросу о применении спектральных и статистических параметров вариабельности сердечного ритма для оценки нейровегетативного состояния организма в эксперименте // Бюллетень СО РАМН. – 2009. – Т. 140, № 6. – С. 30-37.
7. **Курьянова Е.В.** Возрастные, половые и типологические особенности механизмов регуляции сердечного ритма и свободнорадикальных процессов у нелинейных крыс: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Астрахань. – 2012. – 45 с.
8. **Курыта А.В., Соя Е.В.** Уровень активности β -адренорецепторов, состояние функции эндотелия и мембран эритроцитов у больных старших возрастных групп с сердечной недостаточностью и их изменением под влиянием лечения // Укр. кардіо. ж. – 2004. – № 3. – С. 60-65.
9. **Липунова Е.А., Скоркина М.Ю.** Физиология крови: моногр. исслед. – Белгород: БелГУ. – 2007. – 324 с.
10. **Малкова М.И., Булашова О.В., Хазова Е.В.** Определение адренореактивности организма по адренорецепции клеточной мембраны при

- сердечно-сосудистой патологии // Практическая медицина. – 2013. – Т. 71, № 3. – С. 20-23.
11. **Манухин Б.Н., Нестерова Л.А.** Аллостерическое влияние атропина и карбахола на активность альфа2-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28, № 5. – С. 382-386.
 12. **Муравьев А.В., Муравьев А.А.** Вне- и внутриклеточные механизмы изменения агрегации эритроцитов // Физиология человека. – 2005. – Т. 31, № 4. – С. 108-112.
 13. **Ноздрачев А.Д.** Большой практикум по физиологии человека и животных: уч. пособ. для студ. вузов в 2 т. – М.: Академия. – 2007. – 608 с.
 14. **Сергеева О.В., Алипов Н.Н., Смирнов В.М.** Влияние атропина, пропранолола и атенолола на волновую структуру колебаний ритма сердца у крыс // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2008. – Т. 145, № 4. – С. 364-367.
 15. **Скоркина М.Ю.** Морфофизиологический анализ механизмов регуляции объема клеток крови: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Астрахань. – 2014. – 40 с.
 16. **Стрельникова А.И., Циркин В.И., Крысова А.В., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л.** М-холинореактивность эритроцитов небеременных и беременных женщин, определяемая по изменению скорости агглютинации эритроцитов под влиянием ацетилхолина // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2012. – Т. 154, № 8. – С. 140-143.
 17. **Стрюк Р.И., Длусская И.Г.** Адренореактивность и сердечно-сосудистая система. – М.: Медицина. – 2003. – 160 с.
 18. **Тихомирова И.А., Муравьев А.В., Гусева Е.П.** Адренореактивность организма и агрегатные свойства эритроцитов в норме и при патологии // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2006. – Т. 18, № 2. – С. 63-68.
 19. **Циркин В.И., Анисимов К.Ю., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л., Братухина О.А., Попова В.С., Шушканова Е.Г.** Хемореактивность эритроцитов как отражение течения беременности и родов // Вестник уральской мед. акад. науки. – 2015. – № 4. – С. 143-150.
 20. **Bristow M.R.** β -Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure // Circulation. – 2000. – V. 101. – No. 5. – Pp. 558-569.
 21. **Carvalho F.A., Mesquita R., Martins-Silva J., Saldanha C.** Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels // J. Appl. Toxicol. – 2004. – V. 24. – Is. 6. – Pp. 419-427.
 22. **Dalefielda R.R., Oehmea F.W.** The presence of a muscarinic receptor on canine erythrocyte membranes // Gen. Pharmacol.: The Vascular System. – 1999. – V. 32. – Is. 3. – Pp. 341-344.
 23. **Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J.** Basic and Clinical Pharmacology. – McGraw-Hill Companies, Inc. – 2012. – 1245 p.
 24. **Lopes de Almeida J.P., Saldanha C.** Nonneurological Cholinergic System in Human Erythrocytes Biological Role and Clinical Relev // J. Memb. Biol. – 2010. – V. 234. – Pp. 227-234.

References

1. **Baevskiy R.M.** Analiz variabelnosti serdechnogo ritma v kosmicheskoy medicine [Analysis of heart rate variability in space medicine]. Fiziologiya cheloveka [Human Physiology]. 2002. Vol. 28, No. 2. Pp. 70-82. (In Russian).
2. **Ban A.S., Paramonova N.A., Zagorodnyy G.M.** Analiz vzaimosvyazi pokazateley variabelnosti ritma serdca [Analysis of the relationship between heart rate variability indices]. Voennoy medicina [Military medicine]. 2010. No. 4. Pp. 21-24. (In Russian).
3. **Borovskaya M.K., Kuznecova E.E., Gorohova V.G.** Strukturno-funkcionalnaya harakteristika membran ehritrocita i ee izmenenie pri patologiyah raznogo geneza [Structural and functional characteristics of erythrocyte membranes and its change in pathologies of different genesis]. Byulleten VSNC SO RAMN [Bulletin VSNC of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences]. 2010. No. 3. Pp. 334-354. (In Russian).
4. **Korkushko O.V., Shatilo V.B., Pissaruk A.B., Lishnevskaya V.Yu., Chebotarev N.D.** Analiz variabelnosti ritma serdca v klinicheskoy praktike: 25-letniy opyt izucheniya [Heart rate variability analysis in clinical practice: 25 years of experience]. Elektr. resurs: mat-ly mezhd. konf. [Electr. resource: materials of the international conference]. 2002. Pp. 5-20. (In Russian).
5. **Kupreeva M.S., Petrosyan E.A., Suhinin A.A.** Ocenka sostoyaniya krasnoy krovi pri zhelchnom peritonite [Assessment of the state of red blood for bile peritonitis]. Byulleten Volgogradskogo nauch. centra RAMN [Bulletin of Volgograd Science Center of Russian Academy of Medical Sciences]. 2008. No. 2. Pp. 49-51. (In Russian).
6. **Kuryanova E.V.** K voprosu o primeneniі spekttralnyh i statisticheskikh parametrov variabelnosti serdechnogo ritma dlya ocenki neyrovege-

- tativnogo sostoyaniya organizma v eksperimente [On the Application of Spectral and Statistical Parameters of Heart Rate Variability to Evaluate the Neurovegetative State of an Organism in an Experiment]. Byulleten SO RAMN [Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences]. 2009. Vol. 140, No. 6. Pp. 30-37. (In Russian).
7. **Kuryanova E.V.** Vozrastnye, polovye i tipologicheskie osobennosti mekhanizmov regulyatsii serdechnogo ritma i svobodnoradikalnykh processov u nelineynykh kryss [Age, sexual and typological features of the mechanisms of regulation of the heart rate and free radical processes in nonlinear rats]: avtoref. diss. ... d.b.n. [abstract of the thesis ... Dr.Sci. Biol.]. – Astrakhan. 2012. 45 p. (In Russian).
 8. **Kuryata A.V., Soya E.V.** Uroven aktivnosti β -adrenoreceptorov, sostoyanie funktsii endoteliya i membran eritrotsitov u bolnykh starshikh vozrastnykh grupp s serdechnoy nedostatochnostyu i ih izmeneniyem pod vliyaniem lecheniya [Level of β -adrenoreceptor activity, the state of endothelial function and erythrocyte membranes in patients of older age groups with heart failure and their change under the influence of treatment]. Ukr. kardio. zhurnal [Ukrainian J. of Cardiology]. 2004. No. 3. Pp. 60-65. (In Russian).
 9. **Lipunova E.A., Skorkina M.Yu.** Fiziologiya krovi: monogr. issled. [Physiology of blood: monographic study]. – Belgorod: BelGU. 2007. 324 p. (In Russian).
 10. **Malkova M.I., Bulashova O.V., Hazova E.V.** Opreделение adrenoreaktivnosti organizma po adrenoreceptii kletочноy membrany pri serdechno-sosudistoy patologii [Determination of adrenoreactivity of the body by adrenoreceptance of the cell membrane in cardiovascular pathology]. Prakticheskaya medicina [Practical Medicine]. 2013. Vol. 71, No. 3. Pp. 20-23. (In Russian).
 11. **Manuhin B.N., Nesterova L.A.** Allostericheskoe vliyaniye atropina i karbakhola na aktivnost alfa2-adrenoreceptorov membran kory golovnogogo mozga kryss [Allosteric effects of atropine and carbachol on the activity of alpha2-adrenergic receptors in rat cerebral cortex membranes]. Biologicheskie membrany [Biological membranes]. 2011. Vol. 28, No. 5. Pp. 382-386. (In Russian).
 12. **Muravev A.V., Muravev A.A.** Vne- i vnutrikletочnye mekhanizmy izmeneniya agregatsii eritrotsitov [Extra- and intracellular mechanisms of erythrocyte aggregation change]. Fiziologiya cheloveka [Human Physiology]. 2005. Vol. 31, No. 4. Pp. 108-112. (In Russian).
 13. **Nozdrachev A.D.** Bolshoy praktikum po fiziologii cheloveka i zhivotnykh: uch. posob. dlya stud. vuzov v 2 t. [A large workshop on the physiology of man and animals: Textbook allowance for stud. universities in 2 volumes]. – Moscow: Akademiya. 2007. 608 p. (In Russian).
 14. **Sergeeva O.V., Alipov N.N., Smirnov V.M.** Vliyaniye atropina propranolola i atenolola na volnovuyu strukturu kolebaniy ritma serdca u kryss [Influence of atropine, propranolol and atenolol on the wave structure of heart rate fluctuations in rats]. Byulleten eksperimentalnoy biologii i mediciny [Bulletin of Experim. Biology and Medicine]. 2008. Vol. 145, No. 4. Pp. 364-367. (In Russian).
 15. **Skorkina M.Yu.** Morfofiziologicheskiy analiz mekhanizmov regulyatsii obema kletok krovi [Morphological and physiological analysis of the mechanisms regulating the volume of blood cells]: avtoref. diss. ... d.b.n. [abstract of the thesis ... Dr.Sci. Biol.]. – Astrakhan. 2014. 40 p. (In Russian).
 16. **Strelnikova A.I., Cirkin V.I., Krysova A.V., Hlybova S.V., Dmitrieva S.L.** M-holinoreaktivnost eritrotsitov neberemennykh i beremennykh zhenshchin opredelyaemaya po izmeneniyu skorosti agglutinatsii eritrotsitov pod vliyaniem acetilholina [M-cholinoreactivity of erythrocytes of non-pregnant and pregnant women, determined by the change in the rate of agglutination of erythrocytes under the influence of acetylcholine]. Byull. eksp. boil. i med. [Bulletin of Experim. Biology and Medicine]. 2012. Vol. 154, No. 8. Pp. 140-143. (In Russian).
 17. **Stryuk R.I., Dlusskaya I.G.** Adrenoreaktivnost i serdechno-sosudistaya sistema. [Adrenoreactivity and cardiovascular system]. Moscow: Medicina. 2003. 160 p. (In Russian).
 18. **Tihomirova I.A., Muravev A.V., Guseva E.P.** Adrenoreaktivnost organizma i agregatnye svoystva eritrotsitov v norme i pri patologii [Adrenoreactivity of the organism and aggregate properties of erythrocytes in norm and in pathology]. Regionarnoe krovoobrashchenie i microcirkulatsiya [Regional Hemodynamics and Microcirculation]. 2006. Vol. 18, No. 2. Pp. 63-68. (In Russian).
 19. **Cirkin V.I., Anisimov K.Yu., Hlybova S.V., Dmitrieva S.L., Bratuhina O.A., Popova V.S., Shushkanova E.G.** Hemoreaktivnost eritrotsitov kak otkazheniye techeniya beremennosti i rodov [Chromoreactivity of erythrocytes as a reflection of the course of pregnancy and childbirth]. Vestnik uralskoy med. akad. nauki [J. of Ural Medical Academic Science]. 2015. No. 4. Pp. 143-150. (In Russian).

20. *Bristow M.R.* β -Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*. 2000. V. 101. No. 5. Pp. 558-569.
21. *Carvalho F.A., Mesquita R., Martins-Silva J., Saldanha C.* Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. *J. Appl. Toxicol.* 2004. V. 24. Is. 6. Pp. 419-427.
22. *Dalefielda R.R., Oehmea F.W.* The presence of a muscarinic receptor on canine erythrocyte membranes. *Gen. Pharmacol.: The Vascular System*. 1999. V. 32. Is. 3. Pp. 341-344.
23. *Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J.* Basic and Clinical Pharmacology. McGraw-Hill Companies, Inc. 2012. 1245 p.
24. *Lopes de Almeida J.P., Saldanha C.* Nonneuronal Cholinergic System in Human Erythrocytes Biological Role and Clinical Relev. *J. Memb. Biol.* 2010. V. 234. Pp. 227-234.

Adreno- and cholinoreactivity of erythrocytes and analysis of their conjugation with heart rate in rats

E.V. Kuryanova, A.V. Tryasuchev, V.O. Stupin, D.L. Tepliy

In non-linear rats, the β -adrenoreactivity of erythrocytes (β -ARE) and M-cholinoreactivity of erythrocytes (M-CRE) were determined from the degree of inhibition of hyposmotic hemolysis in the incubation medium, respectively, with anaprilin and atropine, parameters of heart rate variability (HRV) on the hardware-software complex "Varicard". Mean values and ranges of β -ARE variation were established (44.2 ± 1.0 , from 11 to 84 rel. units), M-CRE (9.2 ± 0.4 , from 1.5 to 18 rel. units). Using the method of clustering, it was revealed that among non-linear rats, individuals with average (32.9-50.0 rel. units) and high (>50 rel. units) values of β -ARE (up to 85% of the population) predominate, but with low (1.7-7.6 rel. units) and average (7.9-14.2 rel. units) values of M-CRE (up to 75% of the population). Rats with low β -ARE and M-CRE are characterized by a higher heart rate, high centralization of control at low HF-wave power. β -ARE and M-CRE intact rats are weakly correlated, form different strengths, but mainly weak bonds, with HRV parameters, are more closely related to the stress and wave power index of the HRV spectrum than to the frequency of a cardiac rhythm. Factor analysis of β -ARE, M-CRE and HRV parameters revealed 4 information factors, of which F1, F3 and F4 are mainly formed by HRV, and factor F2 – by erythrocyte reactivity, especially β -ARE, M-CRE correlates with F1 and F4. Therefore, β -ARE and M-CRE can act as factor-forming indices in the characterization of regulatory influences. The determination of β -ARE and M-CRE in complex with HRV parameters can significantly supplement the idea of changes in regulatory influences at the level of cell membranes in the organization of biomedical studies using laboratory animals.

Key words: adreno- and cholinoreactivity of erythrocytes, heart rate variability, cluster analysis, factor analysis, non-linear rats.

Влияние холодной гелиевой плазмы на метаболические и физико-химические параметры крови человека *in vitro*

А.К. Мартусевич^{1,2}, А.Г. Соловьева¹, С.Ю. Краснова¹, Д.В. Янин^{1,3},
А.Г. Галка^{1,3}, А.В. Костров³

¹ – ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Нижний Новгород

² – Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород

³ – ФИЦ «Институт прикладной физики РАН», Нижний Новгород

Контактная информация: д.б.н. Мартусевич Андрей Кимович, crist-mart@yandex.ru

Цель данного исследования – сравнительная оценка сдвигов окислительного метаболизма и кристаллогенных свойств плазмы крови при обработке гелиевой холодной плазмой и неионизированным потоком гелия. Изучали действие СВЧ-генерированной гелиевой холодной плазмы на образцы цельной крови человека. Продолжительность воздействия составляла 1 и 3 мин. Для проведения эксперимента образцы крови делили на 5 равных порций по 1,5 мл, причем первая из них являлась контрольной (с ней не осуществляли никаких манипуляций), вторую и третью обрабатывали холодной плазмой с указанными выше экспозициями, а четвертую и пятую – потоком гелия без перевода его в плазменную форму. В плазме крови всех образцов исследовали параметры окислительного метаболизма методом Fe-индуцированной биохемилюминесценции и кристаллогенную активность. Установлено, что холодная гелиевая плазма и неионизированный поток гелия оказывают модифицирующее влияние на окислительный метаболизм и кристаллогенные свойства плазмы крови при обработке *in vitro*. Для холодной плазмы оно проявилось в антиоксидантном эффекте и стимуляции кристаллогенной активности, тогда как у потока гелия обнаружено прооксидантное действие и способность угнетать дегидратационную структуризацию биосреды. При этом наиболее оптимальной для действия холодной плазмы является 1-минутная экспозиция.

Ключевые слова: холодная плазма, биологические эффекты, плазма крови, окислительный метаболизм, кристаллогенные свойства.

Введение

Исследования в области физики плазмы проводятся уже на протяжении длительного времени в России и за рубежом [1, 21, 22, 26]. В то же время биомедицинские аспекты действия холодной плазмы различного происхождения и состава рассмотрены существенно менее подробно. В первую очередь эти данные относятся к оценке клинических перспектив применения генераторов холодной плазмы [4], в т.ч. аппарата

«Плазон» (МГТУ им. Н.Э. Баумана) [4, 6, 25, 7], газовый поток от которых формируется в большинстве вариантов из атмосферного воздуха и дозируется по концентрации монооксида азота либо др. соединений с известной биологической активностью [6, 7].

С другой стороны, эффекты именно самой холодной плазмы изучены лишь в единичных публикациях [26, 11, 14, 17], преимущественно посвященных дезинфицирующим свойствам данного

воздействия [11, 15-17, 24], тогда как биологические эффекты холодной плазмы, составляющие базис ее клинического применения, исследованы относительно слабо. В немногочисленных работах, в которых рассматривается влияние этого фактора на биосистемы, использовали либо воздушную [21, 22, 26, 15, 18, 27], либо аргоновую плазму [16, 2].

На основании этого **целью** данного исследования служила сравнительная оценка сдвигов окислительного метаболизма и кристаллогенных свойств плазмы крови при обработке гелиевой холодной плазмой и неионизированным потоком гелия.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы образцы цельной крови здоровых добровольцев ($n=10$). Для осуществления воздействия нами была собрана специальная установка, позволяющая проводить непосредственную обработку образцов крови холодной плазмой. В данной установке использовали холодную плазму, генерированную за счет воздействия СВЧ-излучения на поток гелия в аппарате собственной конструкции, разработанном в ИПФ РАН (Нижний Новгород, Россия). Продолжительность воздействия составляла 1 и 3 мин.

Для проведения эксперимента образцы крови делили на 5 равных порций по 1,5 мл, причем первая из них являлась контрольной (с ней не осуществляли никаких манипуляций), вторую и третью обрабатывали холодной плазмой с указанными выше экспозициями, а четвертую и пятую – потоком гелия без перевода его в плазменную форму. Экспозиция по завершении воздействия составляла 10 мин. Сразу после этого из

образцов цельной биологической жидкости стандартным методом центрифугирования выделяли плазму крови.

В биологической жидкости методом Fe-индуцированной биохемилюминесценции определяли светосумму хемилюминесценции, рассматриваемую в качестве критерия интенсивности перекисного окисления липидов, и параметр $tg2\alpha$, служащий индикатором общей антиоксидантной активности плазмы крови [3]. Измерения проводили на аппарате БХЛ-06 («Медозонс», Россия). Уровень малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и эритроцитах оценивали по методу В.Г. Сидоркина, И.А. Чулошниковой (1993) [8].

Для изучения кристаллогенных свойств плазму крови в объеме 100 мкл наносили на предметное стекло и приготавливали микропрепараты высушенной биологической жидкости в соответствии с методом кристаллоскопии, позволяющим оценивать собственную дегидратационную структуризацию биосреды [7, 5]. Высушенные микропрепараты оценивали морфологически (путем описания особенностей структуризации высушенного образца биологической жидкости) и визуаметрически (с применением собственной системы параметров) [7, 5]. Основными визуаметрическими показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизруемость (отражает количественную сторону кристаллизации – плотность кристаллических элементов в фации), индекс структурности (характеризует сложность структуропостроения), степень деструкции фации (представляет собой индикатор качественной стороны процесса – правильности образования структур) и выраженность краевой зоны микропрепарата [5].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.1 for Windows. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскала-Уоллеса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты исследований

На первом этапе нами было проанализировано влияние холодной плазмы на процессы перекисного окисления липидов. Установлено, что обработка биологической жидкости и холодной плазмой, и неионизированным потоком гелия приводит к нарастанию светосум-

мы хемилюминесценции, трактуемой как показатель интенсивности липопероксидации (рис. 1). При этом второе из указанных воздействий вызывает существенно более значимые изменения рассматриваемого показателя. Следует отметить, что данная тенденция обнаруживается при обоих использованных режимах обработки.

В то же время при меньшей длительности воздействия (1 мин) применение холодной гелиевой плазмы лишь незначительно, но статистически значимо стимулировало интенсивность перекисного окисления липидов (на 16%; $p < 0,05$ по сравнению с контрольным образцом). Увеличение продолжительности обработки до 3-х мин приводило к существенно более выраженной активации перекисного окисления липидов (на 41%; $p < 0,05$ по отношению к интактному и обработанному холодной плазмой в течение 1 мин образцам).

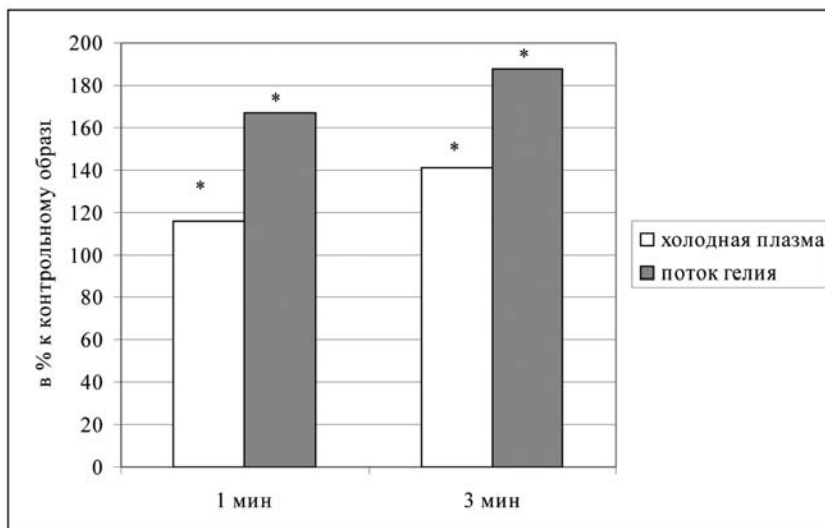


Рис. 1. Интенсивность липопероксидации плазмы крови при ее обработке холодной плазмой и гелиевым потоком. Данные представлены в % к уровню контрольного образца, принятого за 100%; * – статистическая значимость различий по отношению к последнему на уровне $p < 0,05$.

Использование для обработки биологической жидкости неионизированного гелиевого потока также демонстрировало дозозависимый эффект, но при обоих режимах обеспечивало значительно более сильную активацию липопероксидации, о чем свидетельствовало увеличение светосуммы хемилюминесценции на 67 и 88% по сравнению с контрольным образцом для 1- и 3-минутного воздействия соответственно ($p < 0,05$ для обоих случаев).

Иные закономерности были обнаружены для общей антиоксидантной активности плазмы крови (рис. 2). Так, при обработке биосреды холодной плазмой на протяжении 1 и 3 мин регистрировали значительное и дозозависимое нарастание параметра $tg2\alpha$, характеризующего общую антиоксидантную активность биосубстрата (на 63 и 79% по сравнению с

контрольным образцом соответственно; $p < 0,05$ для обоих случаев). Важно подчеркнуть, что при указанных режимах воздействия имеет место превалирование прироста антиоксидантной активности над темпами увеличения интенсивности процессов перекисного окисления липидов.

Напротив, влияние на цельную кровь человека потока гелия приводило к угнетению антиоксидантного потенциала биологической жидкости (на 12 и 17% при продолжительности обработки 1 и 3 мин соответственно; $p < 0,05$). Это косвенно указывает на формирование признаков окислительного стресса, индуцированного контактом биосреды с неионизированным гелиевым потоком.

Эти результаты находят подтверждение и в динамике концентрации вторичного продукта липопероксидации – малонового диальдегида (рис. 3).

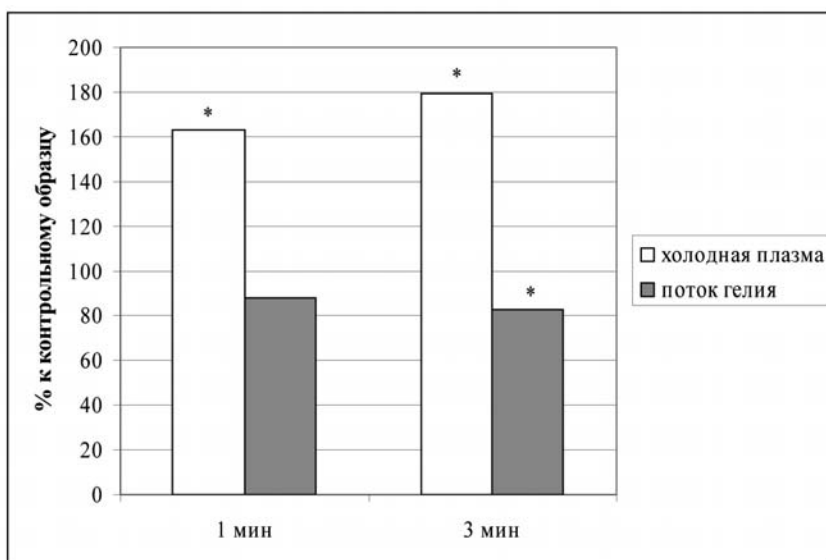


Рис. 2. Общая антиоксидантная активность плазмы крови при ее обработке холодной плазмой и гелиевым потоком. Данные представлены в % к уровню контрольного образца, принятого за 100%; * – статистическая значимость различий по отношению к последнему на уровне $p < 0,05$.

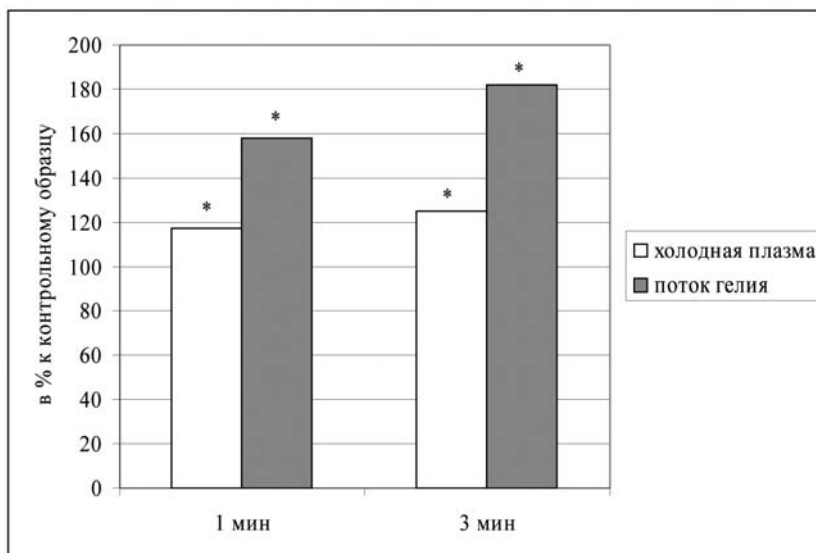


Рис. 3. Концентрация малонового диальдегида в плазме крови при ее обработке холодной плазмой и гелиевым потоком. Данные представлены в % к уровню контрольного образца, принятого за 100%; * – статистическая значимость различий по отношению к последнему на уровне $p < 0,05$.

Выявлено, что обработка цельной крови холодной плазмой *in vitro* обеспечивает относительно небольшое нарастание уровня данного метаболита как при 1-мин, так и при 3-мин воздействии рассматриваемого фактора (увеличение концентрации малонового диальдегида на 17 и 25% по сравнению с образцом, с которым не проводили никаких манипуляций; $p < 0,05$ для обоих случаев). В то же время применение гелиевого потока в существенно большей степени повышает концентрацию соединения в плазме крови (на 58 и 82% при длительности обработки 1 и 3 мин соответственно; $p < 0,05$). Это позволяет характеризовать воздействие гелиевого потока как прооксидантное.

Оценка влияния холодной гелиевой плазмы на кристаллогенные свойства плазмы крови также позволила

продемонстрировать неодинаковость эффекта данного воздействия, причем лимитирующим фактором явилась продолжительность обработки (рис. 4). Так, при обработке крови неионизированным потоком гелия в кристаллоскопических фациях плазмы крови отмечали снижение кристаллогенной активности биосреды, что проявлялось в уменьшении плотности структурных элементов по сравнению с картинами кристаллизации интактной плазмы крови человека. Кроме того, при данном воздействии имело место преимущественное образование одиночных кристаллов и единичных аморфных тел с высокой степенью деструкции. Также в этих образцах наблюдали формирование хаотичных разломов, распространяющихся практически по всему микропрепарату без изменения диаметра краевой зоны фации.

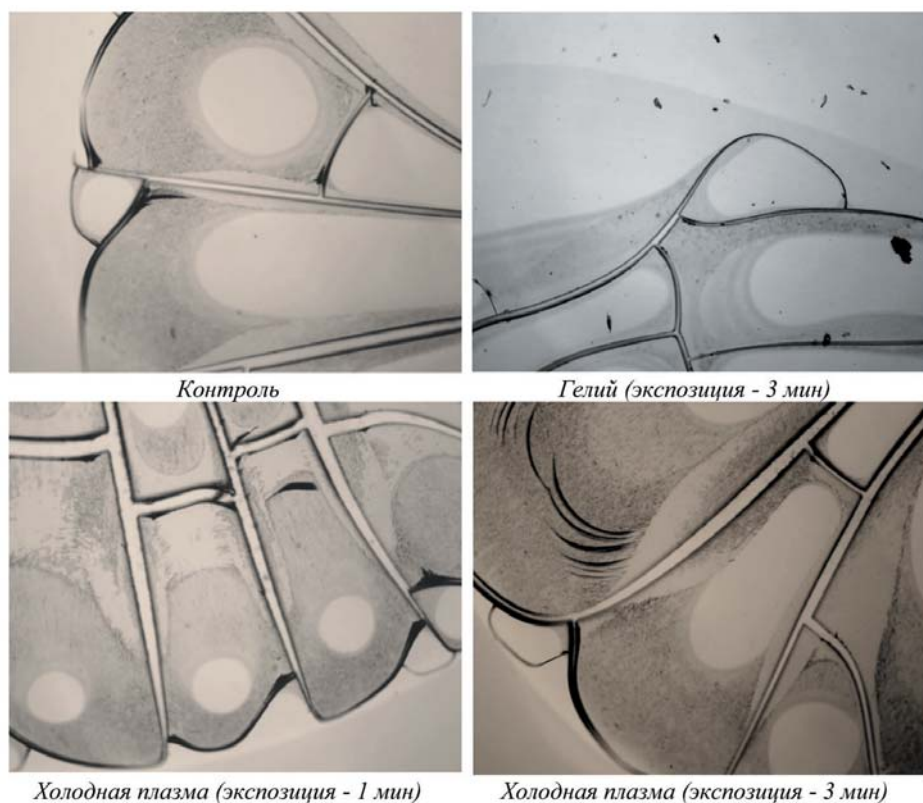


Рис. 4. Картины собственной кристаллизации сыворотки крови человека при обработке потоком холодной гелиевой плазмы (ув. х56).

Наиболее оптимальный характер дегидратационной структуризации плазмы крови зарегистрирован при обработке биосреды холодной плазмой в течение 1 мин. Выявлено, что указанный режим воздействия способствовал образованию регулярной, симметричной картины, включающей совокупность центростремительных разломов, делящих образец на практически равные отдельности. Также фиксировали значительную активацию структуризации биологической жидкости относительно

контрольного образца, преимущественно реализуемую за счет увеличения плотности кристаллических элементов, среди которых встречались и дендритные (в первую очередь – в центральной зоне микропрепарата). Следует подчеркнуть, что в этом случае конфигурация структур была близка к оптимальной, а процессы их разрушения – минимально выражены. Краевая зона фаций при обработке холодной плазмой в течение 1 мин не претерпевала значительных качественных и количественных преобразований.

Увеличение продолжительности воздействия холодной гелиевой плазмой до 3-х мин оказывало менее благоприятный эффект в отношении кристаллогенных свойств биологической среды. В частности, в этих фациях обнаруживали тенденцию к умеренной хаотизации разломов, неоднородность текстуры и небольшое усложнение формируемых элементов, среди которых появляются единичные неразветвленные дендритные кристаллы. Важно, что при данном режиме обработки регистрировали повышение степени разрушенности последних, достигающее средней степени, в то время как краевая зона микропрепаратов умеренно сужается.

Результаты морфологического описания собственной кристаллизации плазмы крови при воздействии холодной гелиевой плазмы и неионизированного гелия полностью подтверждаются данными их визуаметрической оценки (рис. 5 и 6). Так, показанная выше тен-

денция к стимуляции кристаллогенной активности биосреды под влиянием потока холодной плазмы реализовалась в повышении кристаллизруемости и/или индекса структурности этих образцов по отношению к контрольным (рис. 5), причем выраженность данного эффекта была обратно пропорциональна продолжительности обработки. В частности, при 1-мин экспозиции отмечали существенное, статистически значимое увеличение как плотности структурных элементов фации, оцениваемой по уровню кристаллизруемости, так и сложности кристаллов, описываемой индексом структурности ($p < 0,05$ по сравнению с фацией плазмы крови, на которую не оказывали никаких воздействий). При удлинении продолжительности обработки биосубстрата холодной плазмой до 3-х мин отмечали более чем двукратное повышение индекса структурности (в 2,41 раза; $p < 0,05$ относительно контрольного образца).

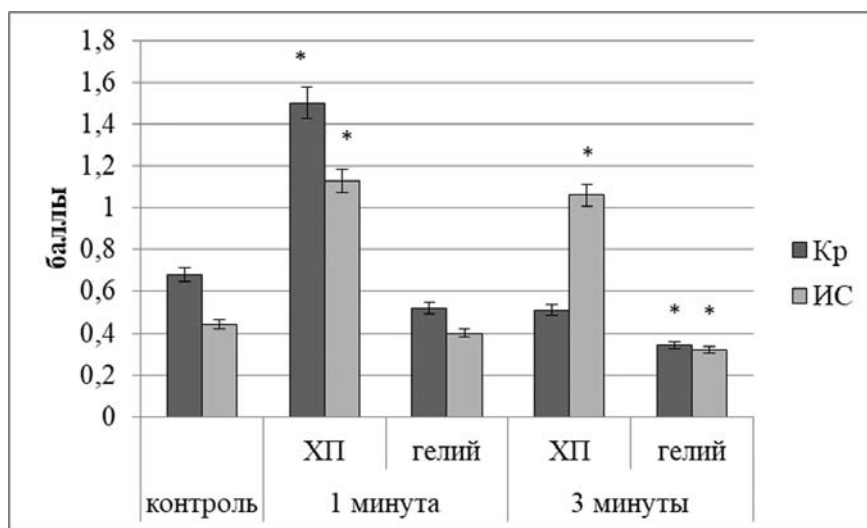


Рис. 5. Уровень кристаллизруемости (Кр) и индекса структурности (ИС) фаций плазмы крови при обработке гелиевой холодной плазмой и потоком гелия. ХП – холодная плазма; * – статистическая значимость различий по отношению к последнему на уровне $p < 0,05$.

Напротив, воздействие на плазму крови человека гелиевого потока, не подвергавшегося предварительной ионизации, демонстрирует обратную тенденцию. Кратковременная обработка биосреды гелием (1 мин) не оказывала значимого модифицирующего влияния на ее кристаллогенную активность, на что указывает сохранение уровня кристаллизуемости и индекса структурности. Увеличение длительности обработки биожидкости (3 мин) усиливало ингибирующий эффект воздействия, причем в этом режиме по обоим указанным показателям наблюдали достоверное снижение значений ($p < 0,05$ по сравнению с интактным образцом биологической жидкости).

По основному критерию правильности кристаллогенеза – степени деструкции фации – обнаружена монотонная тенденция нарастания уровня параметра при увеличении длительности воздей-

ствия (рис. 6). При этом сдвиги в большей степени выражены при обработке биосреды неионизированным потоком гелия. Следует отметить, что по этому показателю все образцы, подвергнутые воздействиям, демонстрируют статистически значимо повышенные значения относительно интактного ($p < 0,05$). Это косвенно указывает на более оптимальную реакцию кристаллогенных свойств биожидкости на обработку холодной гелиевой плазмой по сравнению с гелиевым потоком, а также предпочтительность кратковременной обработки (1 мин).

Интегральную оценку состояния протеомного компонента плазмы крови при действии гелиевого потока, неионизированного и переведенного в плазменную форму, проводили на основании анализа выраженности краевой зоны микропрепаратов высушенной биологической жидкости (рис. 6). Установлено,

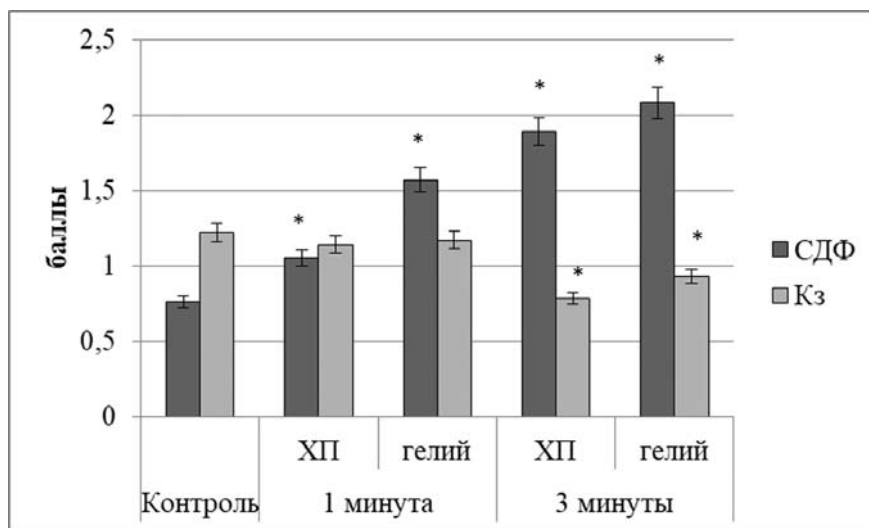


Рис. 6. Степень деструкции (СДФ) и выраженность краевой зоны (Кз) в высушенных микропрепаратах плазмы крови при обработке гелиевой холодной плазмой и потоком гелия. ХП – холодная плазма; * – статистическая значимость различий по отношению к последнему на уровне $p < 0,05$.

что оба указанных воздействия при экспозиции 1 мин не оказывают значимого влияния на данный показатель, тогда как увеличение продолжительности обработки крови до 3-х мин приводит к умеренному сужению краевого пояса дегидратированных образцов плазмы крови человека ($p < 0,05$ по отношению к контрольным фациям). При этом наличие ионизации не влияет на выраженность указанной тенденции.

Обсуждение результатов

Интерес к практическим возможностям плазменной медицины, отчетливо наблюдаемый в последние десятилетия, связан с открывающимися широкими перспективами ее использования в хирургии [4, 16], стоматологии [1, 24, 18], дерматокосметологии [21, 27, 13], физиотерапии и др. С другой стороны, фактором, затрудняющим быструю трансформацию этого направления в метод практической медицины, служит недостаточно полная расшифровка биологических эффектов плазмы различного состава и способа генерации. Следует подчеркнуть, что большинство работ в рассматриваемой области посвящено изучению влияния на различные биобъекты воздушной холодной плазмы атмосферного давления [26, 11, 17, 24]. Несмотря на то, что для нее продемонстрирован ряд позитивных эффектов [4, 25], однако состав газового потока в этом случае однозначно не может быть стандартизирован [6]. Кроме того, полученные данные преимущественно касаются действия холодной плазмы на рост и морфофункциональные особенности колоний микроорганизмов [17, 10, 12], т.к. ориентированы на уточнение антибактериальной активности фактора [11,

16, 24]. Исследования, направленные на оценку влияния холодной плазмы на биосистемы более высокого уровня организации, единичны [16].

Также в отечественной и зарубежной литературе присутствуют упоминания об использовании аргоновой холодной плазмы [16, 2], однако и для этого воздействия в первую очередь тестируются антибактериальные свойства.

Наконец, в последние 5-7 лет внимание исследователей привлекает гелиевая плазма, имеющая наиболее простой компонентный состав [20, 19]. Эмпирически для нее также продемонстрирован антибактериальный эффект [19, 23], а также саногенетическая активность при ранах различного происхождения и гемостатическое действие [13]. В то же время механизмы и системные эффекты гелиевой холодной плазмы остаются слабо изученными.

В нашем исследовании на образцах цельной крови человека показано, что обработка биологической жидкости холодной гелиевой плазмой способна вызывать сдвиги окислительного метаболизма и физико-химических свойств плазмы крови, причем они определяются продолжительностью воздействия и обратно пропорциональны ему. Следует подчеркнуть, что выявленные изменения специфичны именно для плазменной формы гелия, т.к. обнаруженные модификации существенно отличаются от характерных для неионизированного газового потока. Установлено, что наиболее оптимальным является действие на кровь холодной гелиевой плазмы в течение 1 мин, о чем свидетельствуют как метаболические параметры, так и кристаллогенная активность плазмы крови, способная выступать в качестве

индикатора токсичности экзогенных соединений [9].

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что холодная гелиевая плазма и неионизированный поток гелия оказывают модифицирующее влияние на окислительный метаболизм и кристаллогенные свойства плазмы крови при обработке *in vitro*. Для холодной гелиевой плазмы оно проявилось преимущественно в антиоксидантном эффекте и стимуляции кристаллогенной активности, тогда как у потока гелия обнаружено выраженное прооксидантное действие и способность угнетать дегидратационную структуризацию биосреды. При этом наиболее оптимальной для действия рассматриваемого фактора является 1-минутная экспозиция.

Список литературы

1. Алейник А.Н. Плазменная медицина. - Томск: Изд-во ТПУ, 2011. 45 с.
2. Балданов Б.Б., Ранжуров Ц.Р., Норбоев Ч.Н. и др. Инактивация микроорганизмов в холодной аргоновой плазме атмосферного давления // Вестник ВСГУТУ. 2015. № 4. С. 56-60.
3. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. - Минск: БГУ, 2004.
4. Липатов К.В., Супромадзе М.А., Шехтер А.Б. и др. Применение газового потока, содержащего оксид азота (NO-терапия) в комплексном лечении гнойных ран // Хирургия. 2002. № 2. С. 41-43.
5. Мартусевич А.К. Биокристалломика в молекулярной медицине. - СПб: Издательство СПбГМУ, 2011.
6. Мартусевич А.К., Перетягин С.П., Янин А.Ф. Исследование некоторых продуктов, генерируемых медицинским аппаратом для получения NO-содержащей холодной плазмы // Медицинская физика. 2012. № 4. С. 80-86.
7. Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Модификация дегидратационной структуризации сыворотки крови при ее обработке оксидом азота // Биофизика. 2013. Т. 58. № 6. С. 1038-1042.
8. Сидоркин В.Г., Чулошникова И.А. Метод определения МДА в эритроцитах и плазме крови с помощью тиобарбитуровой кислоты. Авторское свидетельство СССР № 1807410. 1993. Бюлл. № 13.
9. Ющенко А.А., Даудова А.Д., Аюпова А.К., Урляпова Н.Г. Использование морфоструктурной реакции сыворотки крови в токсикологической оценке лекарственных средств // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. № 7. С. 113-117.
10. Alshraideh N.H., Higginbotham S., Flynn P.B., et al. Eradication and phenotypic tolerance of Burkholderia cenocepacia biofilms exposed to atmospheric pressure non-thermal plasma // Int. J. Antimicrob. Agents. 2016. Vol. 47. Pp. 446-450.
11. Alkawareek M.Y., Gorman S.P., Graham W.G., Gilmore, B.F. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma // Int J. Antimicrob. Agents. 2014. Vol. 43. Pp. 154-160.
12. Butscher D., Zimmermann D., et al. Plasma inactivation of bacterial endospores on wheat grains and polymeric model substrates in a dielectric barrier discharge // Food Control. 2016. Vol. 60. Pp. 636-645.
13. Brun P., Pathak S., Castagliuolo I., et al. Helium generated cold plasma finely regulates activation of human fibroblast-like primary cells // Plos ONE. 2014. Vol. 9. No. 8. P. e104397.
14. Dobrynin D., Fridman D., Friedman G., Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue // New J. Phys. 2009. Vol. 11. Pp. 1-26.
15. Duske K., Wegner K., Donnert M., et al. Comparative in vitro study of different atmospheric pressure plasma jets concerning their antimicrobial potential and cellular reaction // Plasma Process Polym. 2015. Vol. 12. Pp. 1050-1060.
16. Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M. Yu., et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds // J. Med. Microbiol. 2011. Vol. 60. Pp. 75-83.
17. Flynn P.B., Buseti A., Wielogorska E., et al. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 26320.
18. Hoffmann C., Berganza C., Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology // Medical Gas Research. 2013. Vol. 3. P. 21.
19. Jawaid P., Rehman M.U., Zhao Q.L., et al. Helium-based cold atmospheric plasma-induced reactive oxygen species-mediated

- apoptotic pathway attenuated by platinum nanoparticles // *J. Cell. Mol. Med.* 2016. Vol. 20. No. 9. Pp. 1737-1748.
20. **Kim S.-M., Kim J.-I.** Decomposition of biological macromolecules by plasma generated with helium and oxygen // *J. Microbiol.* 2006. Vol. 44. No. 4. Pp. 466-471.
 21. **Kong M.G., Kroesen G., Morfill G., et al.** Plasma medicine: an introductory review // *New J. Phys.* 2009. Vol. 11. P. 115012.
 22. **Laroussi M.** Low-temperature plasmas for medicine? // *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2009. Vol. 37. Pp. 714-725.
 23. **Lotfy K.** Cold atmospheric plasma and oxidative stress: reactive oxygen species vs. antioxidant // *Austin Biochem.* 2016. Vol. 1. No. 1. P. 1001.
 24. **Scholtz V., et al.** Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection // *Biotechnol. Adv.* 2015. Vol. 33. No. 6. Pp. 1108-1119.
 25. **Shekhter A.B., Serezhnikov V.A., Rudenko T.G., et al.** Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds // *Nitric oxide.* 2005. Vol. 12. Pp. 210-219.
 26. **Stoffels E., Sakiyama Y., Graves D.B.** Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues // *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2008. Vol. 36. Pp. 1441-1457.
 27. **Wiegand C., Fink S., Beier O., et al.** Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models // *Skin Pharmacol. Physiol.* 2016. Vol. 29. Pp. 257-265.
- ### References
1. **Aleinik A.N.** Plazmennaya meditsina [Plasma medicine]. Tomsk: Izdatelstvo TPU, 2011. 45 p. (In Russian).
 2. **Baldanov B.B., Ranzhurov Ts.R., Norboev Ch.N., et al.** Inaktivatsiya mikroorganizmov v kholodnoy argonovoy plazme atmosfernogo davleniya [Inactivation of microorganisms in cold argon atmospheric plasma]. *Vestnik VSGUTU* [Bulletin of the East-Siberian State University of Technology and Management]. 2015. No. 4. Pp. 56-60. (In Russian).
 3. **Kostyuk V.A., Potapovich A.I.** Bioradikaly i bioantioxidanty [Bioradicals and antioxidants]. Minsk: BGU. 2004. (In Russian).
 4. **Lipatov K.V., Sopromadze M.A., Shekhter A.B., et al.** Primenenie gazovogo potoka, soderzhashhego oksid azota (NO-terapiya) v kompleksnom lechenii gnojnyh ran [The use of gas flow is containing nitric oxide (NO-therapy) in complex treatment of purulent wounds]. *Chirurgiya [Surgery]*. 2002. No. 2. Pp. 41-43. (In Russian).
 5. **Martusevich A.K.** Biokristallomika v molekulyarnoy meditsine [Biocrystallomics in molecular medicine]. Saint-Petersburg: Izdatelstvo SPbGMU. 2011. (In Russian).
 6. **Martusevich A.K., Peretyagin S.P., Vanin A.F.** Issledovanie nekotorykh produktov, generiruemyyh medicinskim apparatom dlja polucheniya NO-soderzhashhej holodnoj plazmy [Study of some products is generating with medical device for producing of NO-containing cold plasma]. *Meditsinskaya fizika [Medical Physics]*. 2012. No. 4. Pp. 80-86. (In Russian).
 7. **Martusevich A.K., Peretyagin S.P.** Modifikatsiya degidratatsionnoy strukturizatsii syvorotki krovi pri ee obrabotke oksidom azota [Modification of dehydration structurization of blood serum under its processing with nitric oxide]. *Biophysics*. 2013. Vol. 58. No. 6. Pp. 1038-1042. (In Russian).
 8. **Sidorkin V.G., Chuloshnikova I.A.** Metod opredeleniya MDA v eritrotsitakh i plazme krovi s pomoshch'yu tiobarbiturovoy kisloty [Method of estimation of malonic dialdehyde in erythrocyte and blood plasma with thiobarbituric acid]. Patent of USSR No. 1807410. 1993. Bulletin No. 13. (In Russian).
 9. **Yushchenko A.A., Daudova A.D., Ayupova A.K., Urlyapova N.G.** Ispol'zovanie morfostrukturnoy reaktsii syvorotki krovi v toksikologicheskoy otsenke lekarstvennykh sredstv [The use of morphostructural response of blood serum in toxicological estimation of drugs]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2004. No. 7. Pp. 113-117. (In Russian).
 10. **Alshraideh N.H., Higginbotham S., Flynn P.B., et al.** Eradication and phenotypic tolerance of *Burkholderia cenocepacia* biofilms exposed to atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2016. Vol. 47. Pp. 446-450.
 11. **Alkawareek M.Y., Gorman S.P., Graham W.G., Gilmore, B.F.** Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2014. Vol. 43. Pp. 154-160.
 12. **Butscher D., Zimmermann D., et al.** Plasma inactivation of bacterial endospores on wheat grains and polymeric model substrates in a dielectric barrier discharge. *Food Control*. 2016. Vol. 60. Pp. 636-645.
 13. **Brun P., Pathak S., Castagliuolo I., et al.** Helium generated cold plasma finely regulates activation of human fibroblast-like primary cells. *Plos ONE*. 2014. Vol. 9. No. 8. P. e104397.
 14. **Dobrynin D., Fridman D., Friedman G., Fridman A.** Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J. Phys.* 2009. Vol. 11. Pp. 1-26.

15. *Duske K., Wegner K., Donnert M., et al.* Comparative in vitro study of different atmospheric pressure plasma jets concerning their antimicrobial potential and cellular reaction. *Plasma Process Polym.* 2015. Vol. 12. Pp. 1050-1060.
16. *Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M. Yu., et al.* Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* 2011. Vol. 60. Pp. 75-83.
17. *Flynn P.B., Buseti A., Wielogorska E., et al.* Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 26320.
18. *Hoffmann C., Berganza C., Zhang J.* Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Medical Gas Research.* 2013. Vol. 3. P. 21.
19. *Jawaid P., Rehman M.U., Zhao Q.L., et al.* Helium-based cold atmospheric plasma-induced reactive oxygen species-mediated apoptotic pathway attenuated by platinum nanoparticles. *J. Cell. Mol. Med.* 2016. Vol. 20. No. 9. Pp. 1737-1748.
20. *Kim S.-M., Kim J.-I.* Decomposition of biological macromolecules by plasma generated with helium and oxygen. *J. Microbiol.* 2006. Vol. 44. No. 4. Pp. 466-471.
21. *Kong M.G., Kroesen G., Morfill G., et al.* Plasma medicine: an introductory review. *New J. Phys.* 2009. Vol. 11. P. 115012.
22. *Laroussi M.* Low-temperature plasmas for medicine? *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2009. Vol. 37. Pp. 714-725.
23. *Lotfy K.* Cold atmospheric plasma and oxidative stress: reactive oxygen species vs. antioxidant. *Austin Biochem.* 2016. Vol. 1. No. 1. P. 1001.
24. *Scholtz V., et al.* Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.* 2015. Vol. 33. No. 6. Pp. 1108-1119.
25. *Shekhter A.B., Serezhnikov V.A., Rudenko T.G., et al.* Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. *Nitric oxide.* 2005. Vol. 12. Pp. 210-219.
26. *Stoffels E., Sakiyama Y., Graves D.B.* Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2008. Vol. 36. Pp. 1441-1457.
27. *Wiegand C., Fink S., Beier O., et al.* Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2016. Vol. 29. Pp. 257-265.

The influence of helium cold plasma on metabolic and physical-chemical parameters of human blood *in vitro*

A.K. Martusevich, A.G. Soloveva, S.Yu. Krasnova, D.V. Yanin, A.G. Galka, A.V. Kostrov

The aim of the study was comparative estimation of the changes of oxidative metabolism and crystallogenic properties of blood plasma under processing with cold helium plasma and non-ionized helium flow. We studied the influence of microwave-generating cold plasma on the specimens of whole human blood. The exposure time was 1 and 3 min. Before processing all blood specimens were divided into 5 portions. First portion was control (without any manipulations), second and third portion were treated with cold plasma, fourth and fifth ones were sparged with non-ionized helium flow. In all portions we estimated the parameters of oxidative metabolism and crystallogenic activity. It was stated that cold helium plasma and non-ionized helium modified these parameters under blood processing in vitro. For cold helium plasma this effect was realized by stimulation of antioxidant activity and crystallogenic properties of blood plasma. In opposite, non-ionized helium flow had prooxidant effect and demonstrated the inhibition of biological fluid crystallization. Our data showed that most optimal time for blood processing with cold plasma is 1 min.

Key words: cold plasma, biological effects, blood plasma, oxidative metabolism, crystallogenic properties.



Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга

Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Республика Беларусь

Контактная информация: Бонь Елизавета Игоревна, e_bon@list.ru

В структуре заболеваемости и смертности во всем мире лидирующие позиции занимают cerebro-vasкулярные заболевания, ведущими среди которых являются ишемические повреждения головного мозга. Церебральная ишемия представляет собой тяжелое нейродегенеративное состояние, которое, в зависимости от затронутой области, может препятствовать реализации когнитивных и моторных функций центральной нервной системы. Даже кратковременная ишемия головного мозга (ИГМ) ведет к его глубоким повреждениям. Ключевыми звеньями патогенеза ИГМ являются недостаток оксигенации нейронов, угнетение в мозге аэробного и активация анаэробного пути утилизации глюкозы, снижение энергообразования, нарушение транспорта потенциал-определяющих ионов, изменение кислотно-основного состояния, эксайтотоксичность, активация воспалительного процесса, возникновение окислительного и нитрозативного стресса, апоптоза. Эти процессы не могут быть смоделированы *in vitro*, и большая часть исследований патологии головного мозга ишемического генеза проводится на животных. Адекватные модели церебральной ишемии способствуют детализации их патогенеза и позволяют изучать динамику адаптационных механизмов, что служит фундаментальной основой для усовершенствования диагностики, лечения и профилактики этой патологии. В литературе представлены многообразные способы, позволяющие осуществить моделирование ИГМ различной степени выраженности и разного патогенетического варианта. Полная (тотальная) ИГМ достигается путем декапитации, остановки сердца или окклюзии аорты либо полых вен, неполная (субтотальная) ишемия – путем окклюзии обеих общих сонных артерий на фоне интракраниальной гипертензии, частичная ишемия – путем окклюзии общей сонной артерии, фокальная ишемия – путем окклюзии средней мозговой артерии либо ее эмболии макросферами, мультифокальная церебральная ишемия – путем множественной эмболии микросферами. Настоящий обзор посвящен анализу и систематизации сведений литературы по вопросам моделирования ИГМ и описанию структурных и метаболических нарушений нейронов неокортекса и гиппокампа. Степень выраженности данных изменений выступить в качестве маркеров глубины гипоксического повреждения и эффективности используемых способов их коррекции.

Ключевые слова: ишемия, головной мозг, моделирование.

Введение

Лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всем мире занимают сердечно-сосудистые и cerebro-vasкулярные заболевания. Ежегодно от

сердечно-сосудистых заболеваний умирает около 7 млн, а от cerebro-vasкулярных – около 6 млн чел. [29]. До 85% всех инсультов обусловлено ишемией головного мозга (ИГМ). В России частота ин-

сульта колеблется от 460 до 560 случаев на 100000 населения [1]. По данным Всероссийского центра профилактической медицины от цереброваскулярных заболеваний умирает 25% мужчин и 39% женщин. Среди европейских стран показатель смертности от цереброваскулярных заболеваний в России является самым высоким.

Согласно критериям Trial of Org 10172 in acute stroke treatment (TO-AST), представленной на Втором всемирном конгрессе по инсульту (Вашингтон, 1992 г.), выделяют следующие патогенетические подтипы инфаркта головного мозга [24]:

1) *атеротромботический подтип* возникает при уменьшении или полном прекращении кровотока в результате локального тромбообразования в русле экстра- или интракраниальных крупных артерий, обусловленного изъязвлением и нестабильностью атеросклеротических бляшек, либо возникающего в результате атеросклеротического стенозирования сосудов;

2) *кардиоэмболический подтип* формируется вследствие попадания тромба из сердца при патологии его камер, клапанов, дефекте межпредсердной и межжелудочковой перегородки (парадоксальная кардиальная эмболия);

3) *гемодинамический подтип* развивается при глобальной гипоперфузии мозга, обусловленной резким снижением артериального давления и малым объемом циркулирующей крови;

4) *лакунарный подтип* – это небольшой (менее 15 мм в диаметре) глубокий очаг ИГМ, формирующийся в результате окклюзии одной из пенетрирующих артерий и со временем разрешающийся в небольшую кисту – лакуну;

5) *гемореологический подтип* возникает вследствие микроокклюзии сосудов мозга при изменении реологических свойств крови [24].

Церебральная ишемия представляет собой тяжелое нейродегенеративное состояние, которое, в зависимости от вовлеченной в патологический процесс области, может препятствовать реализации когнитивных и сенсомоторных функций центральной нервной системы. Даже кратковременная ИГМ ведет к его глубоким повреждениям. Ключевыми звеньями патогенеза ИГМ являются: недостаток оксигенации нейронов, угнетение в мозге аэробного и активация анаэробного пути утилизации глюкозы, снижение энергообразования, нарушение транспорта потенциал-определяющих ионов, изменение кислотно-основного состояния, эксайтотоксичность, возникновение окислительного и, в т.ч., нитрозативного стресса, осуществляющегося при участии оксида азота NO, активация воспалительного процесса, апоптоза [2, 3, 14, 23]. Эти процессы не могут быть смоделированы *in vitro*, и большая часть исследований ишемических повреждений головного мозга проводится на животных.

Адекватные модели церебральной ишемии способствуют детализации представлений о патогенезе данной патологии и, кроме того, позволяют оценивать развитие повреждений и адаптационные механизмы головного мозга, что служит фундаментальной основой для усовершенствования способов их диагностики, лечения и профилактики.

Учитывая существование различных патогенетических вариантов ишемических повреждений головного мозга, необходимы адекватные способы их моделирования [20, 22] (табл.).

Способы моделирования ИГМ

Вид ИГМ	Способы реализации
Полная (тотальная, глобальная)	Декапитация, остановки сердца или окклюзии аорты и полых вен
Неполная (субтотальная)	Окклюзия обеих общих сонных артерий с интракраниальной гипертензией
Частичная	Окклюзия одной общей сонной артерии
Фокальная (локальная)	Окклюзия средней мозговой артерии либо ее эмболизация макросферами
Мультифокальная	Множественная эмболизация средней мозговой артерии микросферами, тромбоз эмболия, фототромбоз
Гипоксическая	Лигирование сонной артерии с последующим вдыханием гипоксической смеси

На наш взгляд, модели полной ИГМ подходят для воспроизведения атеротромботического патогенетического варианта инфаркта мозга, неполной ИГМ – для моделирования гемодинамического, а фокальной, мультифокальной и гипоксической ИГМ – в большей мере позволяют изучать механизмы развития и последствия кардиоэмболического, лакунарного и гемореологического типов инфаркта головного мозга.

Модели тотальной, субтотальной и частичной ИГМ достаточно просты в исполнении, но их результаты сложнее экстраполировать на человека, т.к. для него в большей степени характерна фокальная ишемия. Модель тотальной ИГМ подходит для воспроизведения аноксического повреждения головного мозга при остановке сердца.

Различные виды животных разнятся по чувствительности к ишемическим воздействиям на головной мозг. Например, у грызунов подсемейства песчанок виллизиев круг разомкнут, и инсульт развивается при окклюзии одной из общих сонных артерий. У крыс же топография сосудов виллизиева круга и

организация кровообращения головного мозга имеет значительное сходство с таковыми у человека. В связи с этим, с целью экстраполяции результатов на человека данных животных целесообразно использовать для моделирования церебральной патологии сосудистого генеза. Кроме того, инбредные крысы линии SHR (spontaneously hypertensive rats) в 100% случаев имеют повышенное артериальное давление и достаточно часто используются для изучения цереброваскулярной патологии в связи с тем, что инсульт у них развивается спонтанно [10, 13].

Моделирование тотальной (глобальной) ишемии головного мозга

Существует способ моделирования тотальной ИГМ у крыс путем окклюзии четырех магистральных артерий (двух вертебральных и двух внутренних сонных), кровоснабжающих головной мозг [11]. Недостатками способа являются: двухэтапность воспроизведения модели (коагуляция позвоночных артерий на первом этапе и пережатие внутренних сонных артерий на втором этапе экспе-

римента), труднодоступность позвоночных артерий, риск повреждения ствола мозга при коагуляции позвоночной артерии.

Последующая модификация данного способа моделирования тотальной (глобальной) ИГМ не устранили эти существенные недостатки.

Известен способ моделирования глобальной ИГМ у крыс, представляющий собой модификацию четырехсосудистой модели, которая воспроизводится одноэтапно, при одномоментной окклюзии общих сонных артерий с наложением хирургических микрозажимов на вертебральные артерии между вторым и третьим шейными позвонками [35]. Однако при этом не исключается возможность коллатерального кровоснабжения головного мозга у крыс, осуществляемого по вентральной спинномозговой артерии.

Глобальная ИГМ моделируется путем экстракраниальной окклюзии сосудов, кровоснабжающих головной мозг (плечеголового ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии). Этот способ моделирования ИГМ лишен недостатков вышеуказанных способов: позволяет проводить операцию одноэтапно, исключает коллатеральное и редуцированное кровоснабжение. Недостатком данного способа является его повышенная травматичность в связи с использованием подхода к дуге аорты и магистральным артериям, кровоснабжающим головной мозг, через вскрытие грудной клетки. При этом повреждается плевральная полость, возникает пневмоторакс, что обуславливает необходимость перевода животных на искусственное дыхание. О тяжести реализации этого способа сви-

детельствует высокий процент смертности крыс в группе ложнооперированных животных [4].

Моделирование субтотальной (неполной и частичной) ишемии головного мозга

Наиболее часто для изучения последствий ишемии на головной мозг используются модели частичной и субтотальной ишемии путем перевязки одной из общих сонных артерий: частичная ишемия головного мозга или обеих общих сонных артерий, субтотальная ишемия головного мозга.

Односторонняя перевязка общей сонной артерии приводит лишь к снижению кровоснабжения головного мозга ввиду наличия у крыс замкнутого виллизиева круга, а одномоментная двухсторонняя перевязка общих сонных артерий (субтотальная ИГМ), несущих до 90% крови к головному мозгу, приводит к быстрой смерти животных (в течение двух часов), в связи с чем данная модель не подходит для изучения ишемического воздействия в динамике [26, 27].

Метод субтотальной ИГМ по В.Д. Розвадовскому (1985) заключается в лигировании обеих общих сонных и подключичных артерий дистальнее отхождения внутренних грудных артерий и проксимальнее позвоночных артерий. Он наиболее прост в использовании, обладает низкой себестоимостью, однако при этом возникает ишемия не только в бассейне средней мозговой артерии (СМА), но и в др. отделах головного мозга [7].

Кроме того, существует метод моделирования ИГМ, при котором одновременно производят воздействия двумя способами: лигируют обе общие сонные артерии

и искусственно понижают артериальное давление до уровня 20-30 мм рт. ст. При этом сохраняется минимальное кровоснабжение продолговатого мозга, поддерживающего деятельность вазомоторного и дыхательного центров, и коллатеральное кровообращение в мозге восстановиться не может [13].

Моделирование фокальной (локальной) и мультифокальной ишемии головного мозга

Существует преходящая фокальная церебральная ишемия (с реперфузией) и постоянная очаговая церебральная ишемия (без реперфузии).

Различают следующие способы моделирования фокальной ИГМ [13]:

1. Фокальная – окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА)

- 1) ОСМА с краниотомией
 - a) необратимая,
 - b) обратимая;
- 2) ОСМА без краниотомии
 - a) эндоваскулярная ОСМА (необратимая и обратимая),
 - b) эмболическая ОСМА (эмболия макросферами).

2. Мультифокальная

- 1) эмболическая ОСМА (эмболия микросферами),
- 2) тромбоемболия,
- 3) фототромбоз.

Необратимая транскраниальная ОСМА

Этот способ является достаточно инвазивным и травматичным, т.к. требует краниотомии. При моделировании необратимой транскраниальной ОСМА артерию лигируют или подвергают электрокоагуляции. ОСМА может сочетаться с временной или постоянной окклюзией общей сонной артерии.

Метод по Tamura A. (1981) заключается в перевязке СМА через трепанационное отверстие в области между овальным отверстием и отверстием зрительного нерва [31]. Этот метод в наибольшей мере приближен к условиям развития ишемического инсульта у людей, однако он является достаточно сложным в исполнении. При использовании метода, описанного в работе Gill R. и др. (1987), производят лигирование СМА через трепанационное отверстие в месте пересечения носовой расщелины [19]. Этот способ моделирования ИГМ также является одним из наиболее адекватных, как и метод по Tamura, однако он сложен и отличается высокой себестоимостью.

Обратимая транскраниальная ОСМА

Этот способ моделирования ишемического повреждения головного мозга аналогичен предыдущему. Отличие заключается в восстановлении кровотока по СМА спустя определенный период ишемии [22].

Эндоваскулярная ОСМА

Для реализации метода хирургическая нить вводится во внутреннюю сонную артерию до тех пор, пока она не obturiрует СМА, что приведет к прекращению кровотока и развитию инфаркта мозга в бассейне данной артерии. При эндоваскулярной ОСМА через определенный промежуток времени шовный материал удаляют (обратимая эндоваскулярная ОСМА), обеспечивая реперфузию ишемизированной области, либо сохраняют окклюзию (необратимая эндоваскулярная ОСМА). Метод, предложенный в работе Smrčka M. (2002), заключается во введении монофиламентного волокна через разрез

бифуркации аорты во внутреннюю сонную артерию, а затем интракраниально, в связи с чем является очень сложным в исполнении [30]. К слабым сторонам этого метода моделирования ИГМ относятся: недостаточная окклюзия СМА, возможность развития субарахноидального кровоизлияния, гипертермии и некроза экстракраниальных тканей с ипсилатеральной стороны [31].

Эмболическая ОСМА

Данным путем осуществляют моделирование фокальной и мультифокальной ИГМ. В этом случае ОСМА достигается путем введения сгустков крови (тромбоэмболическая окклюзия) или искусственных микро- и макросфер. Тромбоэмболическая модель наиболее близка к кардиоэмболическому патогенетическому варианту инсульта у человека согласно классификации TOAST [21, 17].

Сгустки крови при тромбоэмболической ОСМА формируют либо *in vitro*, либо путем эндоваскулярной инстилляцией тромбина *in situ* [12].

При введении сфер в мозговую кровотоку картину инфаркта головного мозга определяет их размер: введение макросфер (300–400 мкм) индуцирует инфаркт головного мозга, характерный для окклюзии проксимального участка СМА, тогда как введение микросфер (~50 мкм) приводит к диффузной эмболии дистальных сосудов виллизиева круга [25]. Однако объем моделируемого инфаркта головного мозга при этом способе моделирования очень изменчив, т.к. определяется скоростью спонтанного лизиса вводимых кровяных сгустков.

Фототромбоз

Для осуществления фототромботической модели церебральной ишемии

используют местную фотокоагуляцию сосудов ограниченных областей коры головного мозга. После внутривенной инъекции светочувствительных красителей («бенгальская роза») мозг облучают, что приводит к фотохимической окклюзии облученных сосудов и развитию ишемии зоны головного мозга [20].

Моделирование гипоксической ишемии головного мозга

Одна из наиболее часто используемых моделей гипоксической ИГМ описана в 1960 г. Для ее реализации 7-дневным крысам проводили одностороннее лигирование общей сонной артерии с последующим 3-часовым вдыханием гипоксической смеси, содержащей 8% кислорода. При этом возникает односторонний инфаркт в больших полушариях головного мозга, а область повреждения локализуется в перивентрикулярных регионах мозга [22].

Нейроны неокортекса и гиппокампа являются наиболее чувствительными к недостатку кислорода. Функциональные, биохимические и морфологические признаки повреждения нейронов выявляются уже после 2-минутной ИГМ [28].

Морфологические нарушения клеток и субклеточных структур неокортекса и гиппокампа

Гипоксия вызывает нейродегенеративные изменения в головном мозге, выраженность которых зависит от степени ее тяжести. При острой гипоксии морфологические изменения нейронов обычно более выражены, чем при хронической [28].

На морфологическом уровне при гипоксии головного мозга наблюдается

отек. Ранним проявлением отека являются признаки нарушения микроциркуляции: стаз, плазматическое пропитывание и некробиотические изменения стенок кровеносных сосудов головного мозга, повышение их проницаемости, выход плазмы в перикапиллярное пространство [2].

Ведущими звеньями патогенеза ишемической гипоксии головного мозга является энергодефицит, а также избыток продуктов метаболизма, накапливающихся в зоне ишемии, что обуславливает снижение пластических процессов, развитие в нейронах дистрофических, атрофических и некротических изменений [34]. Морфологические изменения на клеточном уровне проявляются в изменении размеров, формы нейронов, интенсивности окрашивания их цитоплазмы.

При субтотальной ИГМ, вызванной компрессией обеих общих сонных артерий в *неокортексе*, выявлено уменьшение размеров нейронов, изменение их формы (многоугольная, вытянутая, расширение и извитость апикального отростка), появление сателлитоза и нейронафагии [4, 9].

В *гиппокампе* также отмечаются дезорганизация клеточных слоев и значительное увеличение размеров перикарионов нейронов, потеря чёткости их контуров и деформация. Наблюдается хроматолиз, кариопикноз, набухание ядер и их смещение на периферию перикариона, апоптотические изменения [4, 28].

В условиях ишемической гипоксии значительно возрастает количество патологических форм нейронов – гиперхромных, гиперхромных сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней.

«Темные» гиперхромные нейроны расцениваются как измененные сморщенные клетки. Выделяют 3 типа гиперхромных нейронов [6]. Цитоплазма гиперхромных клеток первого типа содержит расширенные цистерны эндоплазматической сети, распавшиеся на вакуоли цистерны комплекса Гольджи, митохондрии с разрушенными кристами.

В гиперхромных нейронах второго типа происходит накопление мелкогранулярного вещества, что приводит к повышению осmioфилии цитоплазмы, уплотнению ядра, которое приобретает неправильные очертания.

Гиперхромные нейроны третьего типа характеризуются темным, неправильной формы ядром, появлением в цитоплазме щелевидных уплотнений и поврежденных органелл [6]. Выдвинута гипотеза о происхождении «темных» нейронов в результате незапрограммированного фазового изменения гиалоплазмы. Эти нейроны способны к восстановлению функционирования, а в случае гибели – фагоцитируются микроглией [18].

Гиперхроматофилия нейронов может отражать преобладание синтеза белка над его расходом, а также их сморщивание – как следствие дегидратации клетки из-за энергетических и ионных нарушений [18]. На ультраструктурном уровне выявляется округлость и угловатость ядер гиперхромных нейронов, извилистость кариолеммы, нарушение целостности наружной ядерной мембраны, присутствие в отдельных участках кариоплазмы плотных мелких зёрнышек интерхроматиновых гранул, которые встречаются либо поодиночке, либо небольшими скоплениями, а также эксцентрическое расположение ядрышек.

При гипоксии головного мозга отмечаются изменения в митохондриях нейронов: набухание, разрушение их крист, неравномерное распределение в цитоплазме, что свидетельствует о нарушении энергетического обеспечения нейронов. К уменьшению количества митохондрий приводит нарушение целостности наружной и внутренней мембран из-за нарушения проницаемости для катионов, что вызывает отек и разрыв. Активное набухание митохондрий связано с работой цепи переноса электронов [21]. Происходит расширение канальцев гранулярной и гладкой эндоплазматической сети, изменение их структуры, распад на мелкие гранулы, появление крупных вакуолей и петель. Преобладают свободные рибосомы, образуя обширные скопления. Это является одним из проявлений формирующегося в клетке энергодефицита, т.к. фиксация рибосом к мембранам шероховатого эндоплазматического ретикула при участии белка рибофорина является энергозависимым процессом. В условиях ишемического воздействия нейрон сокращает экспорт белка и стремится направить его для внутренних потребностей. Дезорганизация гранулярной эндоплазматической сети приводит к накоплению вновь образованных белков в цитоплазме. По мере нарастания клеточной гипоксии и ацидоза усиливается их денатурация.

В комплексе Гольджи отмечается расширение цистерн вследствие накопления воды и их частичная фрагментация.

Возрастает общее количество лизосом, увеличиваются их размеры. Отмечается выход в цитоплазму и активация гидролитических ферментов лизосом –

катепсина, рибонуклеазы, кислой фосфатазы, дезоксирибонуклеазы, гиалуронидазы и др. ферментов, что приводит к аутолизу.

В нейропиле отмечается разрушение синапсов, что свидетельствует о нарушении синаптической передачи [4, 6, 26].

Цитохимические проявления повреждения нейронов

Ишемическая гипоксия вызывает глубокие и разнообразные нарушения метаболизма нейронов в неокортексе и гиппокампе. Отмечается снижение активности сукцинатдегидрогеназы, свидетельствуя о торможении аэробного окисления сукцината в электронно-транспортной цепи митохондрий, а также активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – проявление угнетения пентозофосфатного пути, НАДН-дегидрогеназы и НАДФН- дегидрогеназы – как проявление угнетения митохондриальных и немитохондриальных энергетических процессов. В то же время в цитоплазме нейронов происходит увеличение активности лактатдегидрогеназы, свидетельствуя об усилении активности поздних этапов гликолиза, необходимых для поддержания жизнедеятельности нейронов. Отмечается увеличение активности маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы, как признак разрушения мембран органелл и усиления процессов аутофагии [8, 16].

Молекулярные маркеры ишемической гипоксии

Существует ряд молекулярных маркеров, используемых для выявления ишемической гипоксии в неокортексе и гиппокампе.

Фермент нейрон-специфическая енолаза (NSE) принадлежит к группе ферментов-енолаз, участвующих в гликолизе. Она является высокоспецифичным маркером гибели нейронов. Этот фермент присутствует в большом количестве в нервных клетках неокортекса и гиппокампа. Нейрон-специфическая енолаза характеризует степень гипоксического повреждения мозга. Ее активность значительно повышается при гипоксии, причем высокая скорость ее возрастания ассоциирована с неблагоприятным прогнозом патологического процесса. Определения NSE в спинномозговой жидкости или сыворотке крови дают ценную информацию о степени выраженности повреждений нейронов и нарушениях общей целостности гематоэнцефалического барьера [33].

Нейроглобин – представитель семейства глобиновых белков нервной системы – вовлечён в поддержание газового гомеостаза клетки. Это внутриклеточный гемопротейн, обладающий высокой способностью к связыванию кислорода, в результате чего увеличивает доступность кислорода для мозга и обеспечивает его защиту при гипоксии. Нейроглобин играет роль сенсора стресса, реагируя на изменение соотношения O_2/NO посредством конформационных изменений. Его активность значительно возрастает на ранней стадии гипоксии.

Белки S-100 – группа кальций-связывающих белков, участвующих в процессах деления, регуляции клеточного цикла и дифференцировки клеток, а также в процессах транскрипции, фосфорилирования белков и запуска апоптоза. В головном мозге белок S-100 преимущественно продуцируется астроцитами, участвуя в трофической и регуляторной

функции. Повышенная экспрессия белка S-100 свидетельствует о повреждении мембран астроцитов.

Белки теплового шока (heat shock proteins, hsp) выполняют функцию ядерного сигнала в активации экспрессии структурных генов, участвуют в формировании структуры протеинов и их внутриклеточном транспорте. Hsp ограничивают повреждение макромолекулярных структур клетки, при воздействии стрессорных повреждающих факторов способствуют повышению антиоксидантной защиты. Их содержание в цитоплазме нейронов возрастает на ранней стадии гипоксии [5].

HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) – белок, который считается основным регулятором клеточного ответа на гипоксию. В условиях гипоксии экспрессия HIF-1 α значительно повышается. Белок HIF-1 α индуцирует транскрипцию более 60-ти генов, участвующих в пролиферации и регенерации, ангиогенезе, эритропоэзе, метаболизме глюкозы и железа, способствуя тем самым увеличению доставки кислорода и выживаемости клеток при гипоксии [32].

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, осуществляющих расщепление белковых компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани. Принимают участие в регенерации тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференциации клеток, апоптозе. Гипоксия головного мозга – как острая, так и хроническая – сопровождается повышением уровня ММП, отражая степень воздействия окислительного стресса на организм плода. При гипоксии происходит гиперэкспрессия циклооксигеназы-2 и каталазы. Каталаза

разрушает перекись водорода и влечет за собой повышение экспрессии ММП [15].

Заключение

Таким образом, анализ данных литературы выявил большой спектр различных способов моделирования ИГМ, что позволяет использовать необходимые варианты в зависимости от преследуемых целей и технических возможностей. Вместе с тем можно отметить, что наиболее адекватные модели не всегда являются выполнимыми из-за отсутствия технических возможностей, в то время как легко выполнимые модели (субтотальная и частичная ИГМ) в меньшей степени адекватны развивающейся у человека патологии. Степень выраженности структурных и метаболических нарушений в нейронах неокортекса и гиппокампа могут выступить в качестве маркеров глубины гипоксического повреждения и эффективности используемых способов их коррекции.

Список литературы

1. **Богатырева М.Д., Ключихина О.А., Стаховская Л.В.** Эпидемиология инсульта в Ставропольском крае // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2013. – Т. 8. – № 1. – С. 34-38.
2. **Гончар И.А., Степанова Ю.И., Прудыус И.С.** Биохимические предикторы и маркеры инфаркта головного мозга / под ред. д.м.н., проф. В.С. Камышникова. – Минск: БелМАПО, 2013. 512 с.
3. **Максимович Н.Е.** Современные представления о механизмах развития ишемических повреждений головного мозга и путях коррекции этой патологии // Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии: мат-лы Республиканской научно-практ. конф. с межд. участием. – Гродно, 2010. – С. 149-157.
4. **Мартынова О.В., Тверской А.В., Покровский М.В., Мартынов М.А., Шкилева И.Ю., Шелякина Е.В., Анциферов О.В., Мухина Т.С.** Морфологические изменения нейронов головного мозга крыс при двух-,

- четырёхсосудистой моделях ишемического повреждения головного мозга крыс и их коррекция тадалафилом в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 56-61.
5. Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение / под ред. Д.Э. Коржевского. – СПб: СпецЛит, 2015. – 110 с.
6. **Попова Э.Н.** Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство. – М.: Научный мир, 2010, 155 с.
7. **Розвадовский В.Д., Тренин С.О., Тельпухов В.И.** Микрохирургическая модель ишемии головного мозга // Журнал патологической физиологии и общей патологии. – 1985. – № 2. – С. 87-92.
8. **Рукав Т.А., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М.** Активность некоторых ферментов в нейронах фронтальной коры головного мозга в ранний постишемический период // Вестник ВГМУ. – 2013. – № 2. – С. 50-54.
9. **Рукав Т.А., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М.** Морфофункциональные изменения нейронов фронтальной коры головного мозга в условиях его ишемии-реперфузии // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4. – С. 35-38.
10. **Трушель Н.А.** Сравнительная характеристика строения сосудов виллизиева круга головного мозга у человека и лабораторных животных // Военная медицина. – 2009. – № 2. – С. 47-51.
11. **Щербак Н.С., Галагудза М.М., Кузьменков А.Н.** Новый способ моделирования обратимой глобальной ишемии головного мозга // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2011. – Т. 152, № 11. – С. 592-595.
12. **Beech J., et al.** Further characterisation of a thromboembolic model of stroke in the rat // Brain Res. – 2016. – V. 895. – Pp. 18-24.
13. **Carmichael S.T.** Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose // Neuro. – 2005. – V. 2. – Pp. 396-409.
14. **Chu L., Sharma M., Shoamanesh A.** Severe cerebral vasospasm and infarction after minor head trauma // Can. J. Neurol. Sci. – 2017. – V. 44. – Pp. 618-620.
15. **Clark I., et al.** The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2008. – Vol. 40. – No. 6-7.
16. **Dave K., et al.** Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus // J. Cereb. Blood Flow. Metab. – 2001. – Vol. 21(12). – Pp. 1401-1410.
17. **Dittmar M.S., et al.** Fischer-344 rats are unsuitable for the MCAO filament model due

- to their cerebrovascular anatomy // *J. Neurosci. Methods.* – 2006. – V. 14. – Pp. 78-85.
18. **Gallyas F., et al.** Supravital microwave experiments support that the formation of “dark” neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system // *Brain Res.* – 2009. – Vol. 1270. – Pp. 152-156.
 19. **Gill R., Foster A., Woodruff G.** Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil // *Neurosci.* – 1987. – V. 7. – Pp. 3343-3349.
 20. **Graham S.M., McCullough L.D., Murphy S.J.** Animal Models of Ischemic Stroke: Balancing Experimental Aims and Animal Care // *Comp. Med.* – 2004. – V. 54. – Pp. 486-496.
 21. **Hao C., et al.** Effect of human recombinant prourokinase (rhpro-UK) on thromboembolic stroke in rats // *Eur. J. Pharmacol.* – 2017. – V. 56. – Pp. 89-101.
 22. **Hossmann K.-A.** Experimental models for the investigation of brain ischemia // *Cardiovascular Research.* – 1998. – V. 39. – Pp. 106-120.
 23. **Kcjita Y., et al.** Possible role of nitric oxide in autoregulatory response in rat intracerebral arterioles // *Neurosurgery.* – 1998. – V. 42. – Pp. 834-842.
 24. **Marnane M., Duggan C.A., Sheehan O.C., et al.** Stroke subtype classification to mechanism-specific and undetermined categories by TOAST, A-S-C-O, and causative classification system: direct comparison in the North Dublin Population Stroke Study // *Stroke.* – 2010. – V. 41. – Pp. 1579-1586.
 25. **Mayzel-Oreg O., et al.** Microsphere-induced embolic stroke: an MRI study // *Magn. Reson. Med.* – 2015. – V. 51. – Pp. 1232-1238.
 26. **McGraw C.P.** Experimental cerebral infarction: effects of pentobarbital in Mongolian gerbils // *Arch. Neurol.* – 1977. – Vol. 34. – Pp. 334-336.
 27. **Pulsinelli W.A., Brierley J.B.** A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat // *Stroke.* – 1979. – V. 10. – Pp. 267-272.
 28. **Ryosuke M.D., et al.** Effect of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia // *Anesthesiology.* – 2002. – Vol. 96. – Pp. 705-710.
 29. **Sacco S.E., Whisnant J.P., Broderick J.P.** Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population // *Stroke.* – 1991. – V. 22. – Pp. 1236-1241.
 30. **Smrcka M., Ogilvy C., Koroshetz W.** Small aneurysms as a cause of thromboembolic stroke // *Bratisl Lek. Listy.* – 2002. – V. 103(8). – Pp. 250-253.
 31. **Tamura A., et al.** Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1981. – V. 1. – Pp. 53-60.
 32. **Vaupel P., Mayer A.** Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome // *Cancer Metastasis Reviews.* – 2007. – Vol. 26. – Pp. 225-239.
 33. **Weigand M., et al.** Neuronspecific enolase as a marker of fatal outcome in patients with severe sepsis and septic shock // *Anesthesiology.* – 2000. – Vol. 92. – Pp. 905-907.
 34. **White B.C., et al.** Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury // *J. Neurol. Sci.* – 2000. – Vol. 179. – No. 1-2. – Pp. 1-33.
 35. **Yamaguchi M., et al.** One-stage anterior approach for four-vessel occlusion in rat // *Stroke.* – 2005. – V. 36. – Pp. 2212-2214.

References

1. **Bogatyeva M.D., Klochikhina O.A., Stakhovskaya L.V.** Epidemiologiya insul'ta v Stavropol'skom kraye [Stork epidemiology in Stavropol Krai]. *Meditinskiy vestnik Severnogo Kavkaza* [The medical bulletin of the North Caucasus]. 2013. T. 8. No. 1. Pp. 34-38. (In Russian).
2. **Gonchar I.A., Stepanova J.I., Prudyvus I.S.** Biokhicheskiye prediktory i markery infarkta golovnog mozga [Biochemical predictors and markers of ischemic stroke] / Ed. by Prof. V.S. Kamyshnikov. Minsk, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, 2013. 512 p. (In Russian).
3. **Maksimovich N.Ye.** Sovremennyye predstavleniya o mekhanizmax razvitiya ishemicheskikh povrezhdeniy golovnog mozga i putyakh korrektsii etoy patologii [Modern ideas about the mechanisms of development of ischemic brain damage and ways of correction of this pathology]. Aktual'nyye teoreticheskiye i prikladnyye aspekty patofiziologii: mat-ly Respublikanskoy nauchno-prakt. konf. s mezhd. uchastiyem [Actual theoretical and applied aspects of pathophysiology: materials of the Republican scientific and practical conference with international participation]. Grodno. 2010. Pp. 149-157. (In Russian).
4. **Martynova O.V., Tverskoi A.V., Pokrovsky M.V., Martynov M.A., Shkileva I.Yu., Shelyakina E.V., Antsiferov O.V., Mukhina T.S.** Morfologicheskiye izmeneniya neyronov golovnog mozga kry's pri dvukh-, chetyrokh-sosudistoy modelyakh ishemicheskogo povrezhdeniya golovnog mozga kry's i ikh korrektsiya tadalafi-

- lom v eksperimente [Morphological changes in brain neurons of rats with two-, four-cavity models of ischemic damage to the brain of rats and their correction by tadalafil in the experiment]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2016. No. 6. Pp. 56-61. (In Russian).
5. Molekulyarnaya neyromorfologiya. Neyrodegeneratsiya i otsenka reaktivnosti nervnykh kletok na povrezhdeniye [Molecular neuromorphology. Neurodegeneration and evaluation of the reaction of nerve cells to damage]. Ed. by Korzhhevsky D.E. St. Petersburg. : SpetsLit, 2015. 110 p. (In Russian).
6. **Popova E.N.** Ul'trastruktura mozga, alkohol' i potomstvo [Ultrastructure of the brain, alcohol and offspring]. Moscow: Nauchnyj mir, 2010, 155 p. (In Russian).
7. **Rozvadovskiy V.D., Trenin S.O., Tel'pukhov V.I.** Mikrokhirurgicheskaya model' ishemii golovnogo mozga [Microsurgical model of cerebral ischemia]. *Zhurnal patologicheskoy fiziologii i obshchey patologii* [Journal of Pathological physiology and general pathology]. 1985. No. 2. Pp. 87-92. (In Russian).
8. **Rukan T.A., Maksimovich N.E., Zimatkin S.M.** Aktivnost' nekotorykh fermentov v neyronakh frontal'noy kory golovnogo mozga v ranniye postishemicheskiy period [Activity of some enzymes in the neurons of the frontal cortex of the brain in the early postischemic period]. *Vestnik VGMU* [Bulletin of the Voronezh State Medical University]. 2013. No. 2. Pp. 50-54. (In Russian).
9. **Rukan T.A., Maksimovich N.E., Zimatkin S.M.** Morfofunktsional'nyye izmeneniya neyronov frontal'noy kory golovnogo mozga v usloviyakh yego ishemii-reperfuzii [Morphofunctional changes in the neurons of the frontal cortex of the brain under conditions of its ischemia-reperfusion]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2012. No. 4. Pp. 35-38. (In Russian).
10. **Trushel' N.A.** Sravnitel'naya kharakteristika stroyeniya sosudov villiziyeva kruga golovnogo mozga u cheloveka i laboratornykh zhivotnykh [Comparative characteristics of the structure of vessels of the Willis circle of the brain in humans and laboratory animals]. *Voyennaya meditsina* [Military medicine]. 2009. No. 2. Pp. 47-51. (In Russian).
11. **Shcherbak N.S., Galagudza M.M., Kuz'menkov A.N.** Novyy sposob modelirovaniya obratimoy global'noy ishemii golovnogo mozga [A new way to model reversible global brain ischemia]. *Byull. eksp. biol. i med.* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2011. Vol. 152, No. 11. Pp. 592-595. (In Russian)
12. **Beech J., et al.** Further characterisation of a thromboembolic model of stroke in the rat. *Brain Res.* 2016. V. 895. Pp. 18-24.
13. **Carmichael S.T.** Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *Neuro.* 2005. V. 2. Pp. 396-409.
14. **Chu L., Sharma M., Shoamanesh A.** Severe cerebral vasospasm and infarction after minor head trauma. *Can. J. Neurol. Sci.* 2017. V. 44. Pp. 618-620.
15. **Clark I., et al.** The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008. Vol. 40. No. 6-7.
16. **Dave K., et al.** Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2001. Vol. 21(12). Pp. 1401-1410.
17. **Dittmar M.S., et al.** Fischer-344 rats are unsuitable for the MCAO filament model due to their cerebrovascular anatomy. *J. Neurosci. Methods.* 2006. V. 14. Pp. 78-85.
18. **Gallyas F., et al.** Supravital microwave experiments support that the formation of "dark" neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system. *Brain Res.* 2009. Vol. 1270. Pp. 152-156.
19. **Gill R., Foster A., Woodruff G.** Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *Neurosci.* 1987. V. 7. Pp. 3343-3349.
20. **Graham S.M., McCullough L.D., Murphy S.J.** Animal Models of Ischemic Stroke: Balancing Experimental Aims and Animal Care. *Comp. Med.* 2004. V. 54. Pp. 486-496.
21. **Hao C., et al.** Effect of human recombinant prourokinase (rhpro-UK) on thromboembolic stroke in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2017. V. 56. Pp. 89-101.
22. **Hossmann K.-A.** Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular Research.* 1998. V. 39. Pp. 106-120.
23. **Kcjita Y., et al.** Possible role of nitric oxide in autoregulatory response in rat intracerebral arterioles. *Neurosurgery.* 1998. V. 42. Pp. 834-842.
24. **Marnane M., Duggan C.A., Sheehan O.C., et al.** Stroke subtype classification to mechanism-specific and undetermined categories by TOAST, A-S-C-O, and causative classification system: direct comparison in the North Dublin Population Stroke Study. *Stroke.* 2010. V. 41. Pp. 1579-1586.
25. **Mayzel-Oreg O., et al.** Microsphere-induced embolic stroke: an MRI study. *Magn. Reson. Med.* 2015. V. 51. Pp. 1232-1238.

26. McGraw C.P. Experimental cerebral infarction: effects of pentobarbital in Mongolian gerbils. Arch. Neurol. 1977. Vol. 34. Pp. 334-336.
27. Pulsinelli W.A., Brierley J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke. 1979. V. 10. Pp. 267-272.
28. Ryosuke M.D., et al. Effect of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia. Anesthesiology. 2002. Vol. 96. Pp. 705-710.
29. Sacco S.E., Whisnant J.P., Broderick J.P. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population. Stroke. 1991. V. 22. Pp. 1236-1241.
30. Smrcka M., Ogilvy C., Koroshetz W. Small aneurysms as a cause of thromboembolic stroke. Bratisl Lek Listy. 2002. V. 103(8). Pp. 250-253.
31. Tamura A., et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1981. V. 1. Pp. 53-60.
32. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. Cancer Metastasis Reviews. 2007. Vol. 26. Pp. 225-239.
33. Weigand M., et al. Neuronspecific enolase as a marker of fatal outcome in patients with severe sepsis and septic shock. Anesthesiology. 2000. Vol. 92. Pp. 905-907.
34. White B.C., et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. J. Neurol. Sci. 2000. Vol. 179. No. 1-2. Pp. 1-33.
35. Yamaguchi M., et al. One-stage anterior approach for four-vessel occlusion in rat. Stroke. 2005. V. 36. Pp. 2212-2214.

Methods of modeling and morphofunctional markers of cerebral ischemia

E.I. Bon', N.E. Maksimovich

In the structure of morbidity and mortality worldwide, the leading positions are occupied by cerebrovascular diseases, the leading among which are ischemic brain damage. Cerebral ischemia is a severe neurodegenerative condition that, depending on the affected area, can interfere with the realization of cognitive and motor functions of the central nervous system. Even short-term cerebral ischemia leads to its deep damage. The key links in the pathogenesis of cerebral ischemia are the lack of oxygenation of neurons, inhibition of aerobic activity in the brain and activation of the anaerobic pathway for glucose utilization, decreased energy production, disruption of transport of potential-determining ions, changes in the acid-base state, excitotoxicity, activation of the inflammatory process, oxidative and nitrosative stress, apoptosis. These processes cannot be modeled in vitro, and most of the studies of brain pathology of ischemic genesis are carried out on animals. Adequate models of cerebral ischemia contribute to detailing their pathogenesis and allow us to study the dynamics of adaptive mechanisms, which serves as a fundamental basis for improving the diagnosis, treatment and prevention of this pathology. The literature presents a variety of methods that allow the simulation of cerebral ischemia of varying degrees and different pathogenetic variants. Complete (total) cerebral ischemia is achieved by decapitation, cardiac arrest or occlusion of the aorta or hollow vein, incomplete (subtotal) ischemia - by occlusion of both common carotid arteries against intracranial hypertension, partial ischemia - by occlusion of the common carotid artery, focal ischemia - by occlusion of the middle cerebral artery or its embolism by macrospheres, multifocal cerebral ischemia - by multiple embolism microspheres. This review is devoted to the analysis and systematization of literature data on the modeling of cerebral ischemia and the description of structural and metabolic disorders of the neocortex and hippocampus neurons. The degree of expression of these changes act as markers of the depth of hypoxic damage and the effectiveness of the methods used to correct them.

Key words: ischemia, brain, modeling.

Математическое моделирование реутилизации гипоксантина

П.П. Золин¹, В.М. Лебедев², В.Д. Конвай¹

¹ – ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск

² – ФГБОУ ВО «Финансовый университет при Правительстве Российской Федерации», Москва

Контактная информация: к.м.н. Золин Петр Петрович, zolin_petr@mail.ru

Целью настоящей работы являлась разработка математических моделей метаболизма гипоксантина *in vivo*: поступления гипоксантина в печень, его реутилизации, регуляции этого процесса мононуклеотидами и фосфорибозилпирофосфатом. Опыты выполнены на крысах-самцах, которых подвергали 6,5-минутной асфиксии с последующей реанимацией. Крыс подвергали эвтаназии через 30 мин, 6 и 24 ч, 3, 7 и 21 сут после реанимации и сравнивали с контрольными животными. По результатам математического моделирования сделан вывод, что активность гипоксантин/гуанинфосфорибозилтрансферазы в печени *in situ* регулируется доступностью фосфорибозилпирофосфата. Уровни мононуклеотидов не влияют *in situ* на вовлечение гипоксантина в процесс реутилизации (включение ¹⁴C-гипоксантина в нуклеозидмонофосфаты, нуклеозидди- и трифосфаты).

Ключевые слова: метаболизм пуринов, гипоксантин, реутилизация, математическое моделирование, фосфорибозилпирофосфат.

Введение

Усиление катаболизма пуриновых мононуклеотидов играет важную роль в развитии энергетического дефицита при многих патологических состояниях [1, 16, 19, 21], в т.ч. при постреанимационной болезни [4, 5, 24]. Важнейшим промежуточным продуктом распада пуриннуклеотидов является гипоксантин. Он находится как бы “на перекрестке” метаболических путей пуринового обмена и считается центральным интермедиатом метаболизма пуринов [18]. Кроме того, известно, что клетки организма осуществляют “экспорт” и “импорт” пуринов, главным образом, в виде гипоксантина, для которого существуют специальные системы межтканевого и межорганного транспорта и прохождения через клеточную мембрану. По

образному выражению автора известной монографии о метаболизме пуринов Н.П. Дмитриенко, гипоксантин «... является основной «валютой» в пуриновом обмене организма» [1].

Противоположно направленным процессом по отношению к распаду пуриннуклеотидов является реутилизация гипоксантина. Пуриннуклеозидфосфорилазная реакция не играет существенной анаболической роли [16, 21], кроме того, в большинстве клеток млекопитающих отсутствует инозинкиназа [16, 19]. Поэтому гипоксантин реутизируется не через инозин, а сразу превращается в инозинмонофосфат в реакции с фосфорибозилпирофосфатом (ФРПФ), катализируемой гипоксантин/гуанинфосфорибозилтрансферазой (ГГФРТазой). Затем инозинмонофосфат

превращается в др. нуклеозидмонофосфаты (НМФ): аденилосукцинат, аденозинмонофосфат, ксантозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат. НМФ, в свою очередь, могут фосфорилироваться до соответствующих нуклеозидди- и трифосфатов (НДТФ): аденозиндифосфата, аденозинтрифосфата, гуанозиндифосфата, гуанозинтрифосфата, инозиндифосфата, инозинтрифосфата и т.д.

Давно известно, что “узким местом” процесса превращения гипоксантина в НМФ и НДТФ является ГГФРТазная реакция [16, 23], однако до сих пор не решен вопрос о том, чем именно лимитируется протекание этой реакции *in vivo*. Выдвинуты два претендента на роль лимитирующего фактора: это концентрация ФРПФ либо активность ГГФРТазы, проявляющаяся в клетке *in situ*.

Первой точки зрения придерживаются авторы работ [3, 10, 19], полагающие, что скорость реутилизации гипоксантина в различных клетках лимитируется доступностью ФРПФ для ГГФРТазной реакции.

Сторонники второй точки зрения – авторы статьи [22] – считают, что интенсивность реутилизации гипоксантина в эритроцитах дельфинов определяется активностью ГГФРТазы. В очень детально описанной работе [23] было установлено, что если взять аденозинтрифосфат, гуанозинтрифосфат, инозинмонофосфат и гуанозинмонофосфат в физиологических для печени концентрациях, то каждый из них по отдельности обладает ингибирующим эффектом на ГГФРТазу, очищенную из крысиной печени. А вместе все четыре мононуклеотида, взятые в тех же физиологических концентрациях, ингибируют ГГФРТазу сильнее, чем каждый из них

по отдельности – а именно, на 95%, т.е. почти полностью; при этом для измерения активности фермента использовались физиологические концентрации гипоксантина и ФРПФ. Авторы этого исследования сделали вывод, что реутилизация гипоксантина *in vivo* регулируется вышеуказанными мононуклеотидами, поскольку оставшаяся небольшая активность фермента (5%) становится фактором, лимитирующим скорость реакции.

Однако в работе [23] ингибирование ГГФРТазы мононуклеотидами было продемонстрировано на очищенном ферменте в условиях *in vitro*, а как дело обстоит *in vivo* – остается неизвестным.

Кроме того, на реутилизацию гипоксантина в печени в условиях целостного организма может дополнительно влиять и поступление гипоксантина в данный орган из крови. Печень является главным органом пуринового обмена [3, 16, 23], в котором утилизируется не только собственный гипоксантин, но и поступающий с кровью из др. органов.

Изучать реутилизацию гипоксантина *in vivo* можно путем введения в организм меченого гипоксантина. Но в настоящее время отсутствуют адекватные биохимические методы, которые бы позволили количественно изучить в условиях *in situ*, как влияют на реутилизацию гипоксантина сочетания различных концентраций потенциальных веществ-регуляторов, а также вклад гипоксантина, поступающего в орган из крови. Сделать это можно путем математического моделирования, которое в данном случае не просто облегчает или удешевляет исследование, а позволяет получить уникальную информацию о регуляции метаболических процессов в условиях целостного организма, кото-

рую пока невозможно получить другими способами.

Целью настоящей работы явилось изучение при помощи математического моделирования направленности и силы влияний, которые оказывают на процессы реутилизации гипоксантина в печени мононуклеотиды, ФРПФ и интенсивность поступления в печень гипоксантина.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 116-ти нелинейных белых крысах-самцах, содержащихся в стандартных условиях вивария ЦНИЛ ОмГМУ и получавших стандартный лабораторный рацион при свободном доступе к воде и пище. Все опыты выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes (ETS № 123, Strasbourg, 1986)). Показатели массы крыс перед опытом составляли: средняя арифметическая – 238 г, среднеквадратическое отклонение – 31 г, ошибка средней – 2,3 г.

Дизайн исследования включал применение плана параллельных групп и простой рандомизации. Крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, фиксировали в положении на спине и интубировали полиэтиленовой трубкой диаметром 2 мм. После установления ритмичного дыхания трубку перекрывали на 6,5 мин, после чего животных реанимировали при помощи непрямого массажа сердца и искусственного дыхания. Формировали группы, в которых забирали печень через 30 мин, 6 и 24 ч, 3, 7 и 21 сут после начала реанимации.

Крыс группы “Контроль” подвергали не асфиксии и реанимации, а лишь контрольным манипуляциям – наркозу, фиксации, интубации. При забое животных и взятии биоматериала крыс наркотизировали диэтиловым эфиром, вскрывали у них брюшную полость, пересекали серповидную и дугообразную связки, соединяющие печень с диафрагмой, после чего погружали печень в жидкий азот до полного замораживания. Для исследования использовали краевые части печени, наиболее быстро замороженные. Всем животным за 25 мин до фиксации печени в жидком азоте вводили в бедренную вену ^{14}C -гипоксантин в дозе $740 \text{ кБк} \cdot \text{кг}^{-1}$, растворенный в 0,9%-ном NaCl, который брали из расчета $2,5 \text{ мл} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела.

Приготовление хлорнокислого экстракта печени, определение его общей радиоактивности, содержаний НМФ, НДТФ и включения в них ^{14}C -гипоксантина выполняли, как описано ранее [4]. В отдельном кусочке печени определяли содержание ФРПФ по методу [7].

Математическое моделирование метаболизма гипоксантина проводили с помощью регрессионного анализа. Он является одним из наиболее востребованных количественных методов в различных науках – медико-биологических, технических, социальных и т.д. Сильная сторона метода состоит в том, что он направлен не просто на изучение изменений взаимосвязанных параметров, но на сведение в одной формуле причины и следствия. Регрессионный анализ отвечает на вопрос: «Влияет ли одна или несколько переменных (потенциальных причин) на другую переменную (результат) и, если да, то в какой мере?».

Уравнение многофакторной регрессии в общем виде можно записать следующим образом:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_m) + e \quad (1),$$

где зависимая переменная y , называемая откликом, является функцией от независимых переменных $x_1, x_2, \dots, x_m$, которые обычно именуются факторами; $f(x)$ – функция, описывающая силу и форму влияния $x_1, x_2, \dots, x_m$ на y ; e – случайная составляющая отклика, обычно она трактуется как совокупность всех неучтенных в модели и влияющих на y факторов и случайностей, в т.ч. ошибок измерения [2, 11, 13].

Аналитическое выражение функции отклика y , как правило, выбирают из следующего набора стандартных видов функций: прямая, парабола, гипербола, полином, экспоненциальная функция, логарифмическая функция. Полином или многочлен от m переменных – это сумма одночленов или, строго – конечная формальная сумма вида:

$$\sum_I c_I x_1^{i_1} x_2^{i_2} x_3^{i_3} \dots x_m^{i_m} \quad (2),$$

где: $I = (i_1, i_2, \dots, i_m)$ – набор из целых неотрицательных чисел, именуемый мультииндексом; c_I – число, именуемое коэффициентом полинома или многочлена, зависящее только от мультииндекса I .

Многофакторную регрессию в виде полинома можно записать следующим образом:

$$y = \sum_I c_I x_1^{i_1} x_2^{i_2} x_3^{i_3} \dots x_m^{i_m} + e \quad (3),$$

где $x_j, j = 1, \dots, m$ – факторы.

Линейным полиномом называют полином первой степени. Тогда уравнение (3) для линейной полиномиальной рег-

рессии можно записать в следующем виде:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^m b_i x_i \quad (4),$$

где x_i – факторы; b_0, b_i – действительные константы (коэффициенты функции отклика); $i = \overline{1, m}$. Коэффициент b_0 называется свободным членом регрессионного уравнения.

Любая метаболическая система может быть охарактеризована большим числом различных параметров, среди которых исследователь должен: а) выделить (назначить) факторы и отклики; б) выбрать вид модели. На этом этапе работы важное значение имеет априорная информация, под которой понимается информация, полученная в предыдущих экспериментах или взятая из литературы [2, 8, 14]. Обе указанные задачи неформализуемы или ограниченно формализуемы, т.е. по преимуществу являются прерогативой человека, а не компьютерной программы. Выбор факторов и откликов определяется в основном не математическими, а содержательными соображениями, в нашем случае – биохимическими. А выбор вида зависимости отклика от факторов плохо формализуется потому, что одна и та же эмпирическая кривая на заданном участке определения может быть примерно с одинаковой точностью описана самыми разными аналитическими выражениями. Исследователь выбирает между ними, руководствуясь их разработанностью, удобством интерпретации, прошлым опытом и т.д.

Как отмечает А.И. Орлов [12], теория оценивания неизвестных параметров хорошо развита в случае линейного регрессионного анализа. Если же линейности нет и нельзя перейти к

линейной задаче, то, как правило, хороших свойств от оценок ожидать не приходится. С другой стороны, ожидается, что XXI век станет веком нелинейной математики, поскольку все линейные процессы изучены, а мы живем в мире, где преобладают нелинейные процессы [6].

Мы в настоящей работе использовали линейную регрессию по трем причинам. Во-первых, вполне логично начать с линейных моделей, а затем уже, если возникнет необходимость, переходить к более сложным нелинейным зависимостям отклика от факторов. Во-вторых, имеются априорные данные о близком к линейному влиянии на реутилизацию гипоксантина отдельных изучаемых нами факторов, взятых поодиночке [19, 23]. В-третьих, линейную модель, как правило, строят в тех случаях, когда объемы выборок n сравнительно невелики – в т.н. «отсеивающих экспериментах», когда требуется по ограниченному количеству опытов выбрать факторы, оказывающие наибольшее влияние на отклик [8], – это вполне соответствует характеру нашего исследования.

Как известно, даже простейшую линию – прямую – можно провести (на плоскости или в многомерном пространстве) разными способами. Нами для получения оценок коэффициентов функции (4) по экспериментальным данным использовался метод наименьших квадратов. Его широкая популярность объясняется двумя главными преимуществами: во-первых, применение метода наименьших квадратов не требует знания закона распределения обрабатываемых наблюдений, а, во-вторых, он хорошо разработан в плане вычисли-

тельной реализации [8, 12, 14]. Сущность метода заключается в нахождении таких параметров модели (коэффициентов уравнения регрессии), при которых минимизируется сумма квадратов отклонений экспериментальных значений отклика от значений отклика, вычисленных по модели.

Построение и исследование регрессионных моделей с помощью метода наименьших квадратов мы проводили, как описано в работе [5], с помощью созданной нами компьютерной программы “*RegMed*” (авторы: А.П. Мягчилов, В.М. Лебедев, П.П. Золин, государственная регистрация программы произведена во ВНИИЦ в 2009 г., регистрационный № 50200900439).

Одним из требований, предъявляемых к совокупности факторов для возможности применения метода наименьших квадратов, является независимость факторов друг от друга, которая понимается как отсутствие между ними линейной связи [2].

В тех случаях, когда наша модель содержала только два фактора, для проверки наличия связи между ними мы применяли в программе “*RegMed*” непараметрический парный коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Если же модель содержала более двух факторов, для проверки связи всей совокупности этих факторов в программе “*RegMed*” мы использовали непараметрический коэффициент конкордации (коэффициент согласованности) Кендалла [5].

Часто перед исследователем стоит задача сравнения силы влияния факторов на отклик. Но факторы в модели, как правило, выражены в различных единицах измерения, поэтому их сравнение

правомерно лишь в том случае, если их привести к безразмерному, стандартизованному виду. В настоящей работе применена стандартизация факторов и отклика по среднеквадратическому отклонению s . Обычно при использовании стандартизации по s все значения просто делят на s , мы же избрали модифицированную процедуру [14], в которой разница между эмпирическим значением отклика каждой крысы и средним арифметическим группы делится на s группы. Тогда в уравнении регрессии цифровые коэффициенты перед факторами показывают силу влияния факторов на отклик. При этом коэффициент b_0 в уравнении отсутствует. В стандартизованном таким способом масштабе за начало отсчета (нуль) для отклика и для каждого фактора принимается его средняя арифметическая в выборке, а за единицу измерения – величина s .

Минимально необходимым и в то же время важнейшим требованием, предъявляемым к модели, является адекватное описание ею изучаемого объекта. Лишь при условии, что модель достаточно адекватна, имеет смысл говорить о других ее достоинствах – интерпретируемости, простоте и т.д. Единого общего правила для анализа адекватности регрессионных моделей нет [13]. В нашей работе основным способом проверки адекватности моделей стала проверка при помощи коэффициента корреляции Спирмена [5]. В литературе имеются примеры его применения при оценке результатов регрессионного анализа [9, 11]. Программа “RegMed” содержит возможность проверки адекватности моделей при помощи коэффициента корреляции Спирмена, а также при

помощи F-критерия Фишера [5]. Но условием применимости последнего является нормальное распределение случайной составляющей отклика e [2, 8], что выполняется не всегда. Поэтому F-критерий Фишера для проверки адекватности моделей мы применяли выборочно.

Результаты и их обсуждение

В процессе построения и отбора многофакторных моделей нередко используют т.н. «пошаговый регрессионный анализ», сущность которого состоит в последовательном увеличении или уменьшении в регрессионной модели количества факторов [8, 13-15]. При этом в модели оставляют факторы, ориентируясь не только на статистические, но и на содержательные соображения. Мы построили и проверили на адекватность линейные регрессионные модели, включающие в себя все возможные комбинации четырех выбранных нами факторов: включения ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени, содержания в данном органе ФРПФ, НДФ и НМФ. Использование в моделях содержания НДФ и НМФ вместо отдельных концентраций аденозинтрифосфата, гуанозинтрифосфата, инозинмонофосфата, гуанозинмонофосфата и др. нуклеотидов позволило нам резко снизить число факторов в модели для того, чтобы превышение числа опытов (объема выборки) над числом факторов было достаточно большим. Заметим, что в статистике преобразование исходных факторов в новые, укрупненные факторы, является одним из способов устранения взаимосвязи (мультиколлинеарности) исходных факторов [14].

В настоящей работе исследовали влияние сочетаний четырех вышеуказанных факторов на два отклика: y_1 – включение ^{14}C -гипоксантина в НМФ и y_2 – включение ^{14}C -гипоксантина в НДТФ печени. Регрессионные модели со стандартизированными факторами и откликами y_1 и y_2 , выдержавшие проверку на адекватность, представлены в табл. 1 и 2. Наличие связи между всеми возможными

парами факторов проверяли в программе “RegMed” при помощи коэффициента парной корреляции Спирмена, а наличие связей совокупностей трех или четырех факторов проверяли с помощью коэффициента конкордации Кендалла. Статистически значимая связь факторов, обнаруженная по коэффициентам Спирмена или Кендалла, обозначена в табл. 1 и 2 пометкой «(связ.)».

Таблица 1
Регрессионные модели регуляции включения гипоксантина в НМФ

Группы крыс	Регрессионные модели (после стандартизации по среднему квадратическому отклонению)	PS
Контроль	$y_1 = 0,14*[\text{ФРПФ}] + 0,78*[^{14}\text{C}] - 0,06*[\text{НДТФ}] + 0,49*[\text{НМФ}]$	<0,025
	$y_1 = 0,30*[\text{ФРПФ}] + 0,57*[\text{НДТФ}] + 0,14*[\text{НМФ}]$	0,01
	$y_1 = 0,80*[^{14}\text{C}] - 0,14*[\text{НДТФ}] + 0,61*[\text{НМФ}]$	<0,025
	$y_1 = 0,38*[\text{ФРПФ}] + 0,66*[\text{НДТФ}]$	<0,025
	$y_1 = 0,05*[\text{ФРПФ}] + 0,62*[\text{НМФ}]$	0,05
	$y_1 = 0,42*[\text{НДТФ}] + 0,39*[\text{НМФ}]$	0,05
6 ч после реанимации	$y_1 = 0,70*[\text{ФРПФ}] + 0,90*[\text{НДТФ}] + 0,18*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 0,77*[^{14}\text{C}] + 1,28*[\text{НДТФ}] - 0,33*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 0,71*[\text{ФРПФ}] + 1,05*[\text{НДТФ}]$	0,05
3 сут после реанимации	$y_1 = 0,74*[^{14}\text{C}] + 0,04*[\text{НДТФ}] + 0,14*[\text{НМФ}]$ (связ.)	<0,05
	$y_1 = 0,53*[\text{НДТФ}] + 0,21*[\text{НМФ}]$	<0,025
7 сут после реанимации	$y_1 = 0,09*[\text{ФРПФ}] + 0,87*[^{14}\text{C}] + 0,44*[\text{НДТФ}] - 0,26*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 1,23*[\text{ФРПФ}] - 0,99*[\text{НДТФ}] + 0,84*[\text{НМФ}]$ (связ.)	<0,05
	$y_1 = 0,91*[^{14}\text{C}] + 0,54*[\text{НДТФ}] - 0,33*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 0,59*[\text{ФРПФ}] + 0,27*[\text{НМФ}]$	<0,05
21 сут после реанимации	$y_1 = 0,08*[\text{ФРПФ}] + 0,86*[^{14}\text{C}] + 1,32*[\text{НДТФ}] - 1,08*[\text{НМФ}]$	<0,01
	$y_1 = 0,84*[^{14}\text{C}] + 1,26*[\text{НДТФ}] - 1,02*[\text{НМФ}]$	<0,01

Примечания: отклик y_1 – включение ^{14}C -гипоксантина в НМФ печени; фактор [ФРПФ] – содержание ФРПФ в печени, фактор [^{14}C] – общее включение ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени, фактор [НДТФ] – содержание НДТФ в печени, фактор [НМФ] – содержание НМФ в печени; P_s – показатель адекватности моделей: статистическая значимость связи между экспериментальными и модельными значениями отклика y_1 по критерию Спирмена.

Таблица 2

Регрессионные модели регуляции включения гипоксантина в НДТФ

Группы крыс	Регрессионные модели (после стандартизации по среднему квадратическому отклонению)	P_s
Контроль	$y_2 = -1,20*[\text{ФРПФ}] + 0,59*[^{14}\text{C}] - 1,14*[\text{НДТФ}] + 1,42*[\text{НМФ}]$ $y_2 = -1,07*[\text{ФРПФ}] - 0,66*[\text{НДТФ}] + 1,16*[\text{НМФ}]$	<0,005 0,01
30 мин после реанимации	$y_2 = 0,38*[^{14}\text{C}] + 0,65*[\text{НДТФ}] + 0,44*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,59*[\text{НДТФ}] + 0,52*[\text{НМФ}]$	0,01 <0,05
6 ч после реанимации	$y_2 = 0,35*[\text{ФРПФ}] - 1,16*[\text{НДТФ}] + 0,53*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,39*[^{14}\text{C}] - 0,96*[\text{НДТФ}] + 0,26*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,37*[\text{ФРПФ}] - 0,72*[\text{НДТФ}]$ $y_2 = -1,33*[\text{НДТФ}] + 0,57*[\text{НМФ}]$	0,005 0,005 0,05 0,05
24 ч после реанимации	$y_2 = 0,80*[\text{НДТФ}] - 0,02*[\text{НМФ}]$	0,05
3 сут после реанимации	$y_2 = 0,76*[^{14}\text{C}] + 0,002*[\text{НДТФ}] + 0,13*[\text{НМФ}]$ (связ.) $y_2 = 0,51*[\text{НДТФ}] + 0,20*[\text{НМФ}]$	0,005 <0,01
21 сут после реанимации	$y_2 = -0,17*[\text{ФРПФ}] + 0,02*[^{14}\text{C}] - 2,04*[\text{НДТФ}] + 1,37*[\text{НМФ}]$ $y_2 = -0,17*[\text{ФРПФ}] - 2,06*[\text{НДТФ}] + 1,39*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,06*[^{14}\text{C}] - 1,91*[\text{НДТФ}] + 1,25*[\text{НМФ}]$ $y_2 = -1,94*[\text{НДТФ}] + 1,29*[\text{НМФ}]$ (связ.)	<0,01 <0,01 <0,005 <0,025

Примечания: отклик y_2 – включение ^{14}C -гипоксантина в НДТФ печени; фактор [ФРПФ] – содержание ФРПФ в печени, фактор $[^{14}\text{C}]$ – общее включение ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени, фактор [НДТФ] – содержание НДТФ в печени, фактор [НМФ] – содержание НМФ в печени; P_s – показатель адекватности моделей: статистическая значимость связи между экспериментальными и модельными значениями отклика y_2 по критерию Спирмена.

Ю.В. Коновалов [8] отмечает, что в условиях мультиколлинеарности факторов аппроксимирующие свойства регрессионной модели остаются на высоком уровне, и на мультиколлинеарность можно не обращать внимания, если использовать уравнение регрессии только для предсказания, не выходя за цифровые границы экспериментальных данных, по которым была построена модель. Последнее соответствует условиям нашего исследования, поэтому мы подвергли интерпретации все регрессионные модели, представленные в

табл. 1 и 2, включая модели со связанными факторами.

Приведем пример интерпретации отдельно взятой модели из табл. 1, группа «6 ч после реанимации»:

$$y_1 = 0,71*[\text{ФРПФ}] + 1,05*[\text{НДТФ}].$$

Величина статистики критерия Фишера для данной модели $F=26,6$, модель по критерию Фишера адекватна с уровнем значимости $p<0,05$. Она адекватна также по критерию Спирмена, уровень значимости $P_s=0,05$. Оба фактора, ФРПФ и НДТФ, стоят в модели со знаком плюс, поэтому, чем больше их вели-

чины, тем больше величина отклика y_1 . Поскольку модель стандартизирована, по величине коэффициентов перед факторами можно сравнить силу влияния факторов на отклик: $1,05/0,71=1,5$. Значит, содержание НДТФ в печени крыс этой группы в полтора раза сильнее влияет на включение гипоксантина в НМФ, чем содержание ФРПФ.

Главный вопрос, на который должно ответить наше исследование, – является ли остаточная активность ГГФРТаза, ингибированной мононуклеотидами [23], лимитирующим фактором реутилизации гипоксантина *in situ*?

Известны патологические состояния у людей (болезнь Lesch-Nyhan, синдром Kelley-Seegmiller), при которых наблюдается врожденное отсутствие или резкое снижение активности ГГФРТаза в тканях. Дефицит ГГФРТаза у таких пациентов часто приводит к увеличению в их клетках содержания ФРПФ [20] и к активации синтеза пуринов *de novo* из низкомолекулярных предшественников [17]. В опытах М.-Ф. Vincent и соавт. [23] дефицит активности ГГФРТаза создавался другим способом: смесь аденозинтрифосфата, гуанозинтрифосфата, инозинмонофосфата и гуанозинмонофосфата в физиологических концентрациях ингибировала ГГФРТаза печени на 95%, но здесь, в отличие от врожденной недостаточности ГГФРТаза, имеет место, по мнению авторов, действие регуляторного механизма: баланс между активностями ГГФРТаза и ксантиноксидазы *in situ* определяет направление метаболизма гипоксантина, доставляемого кровью в печень со всего организма.

Ранее в постреанимационном периоде после 6,5-минутной асфиксии у крыс

мы обнаружили в их печени угнетение реутилизации гипоксантина на фоне повышения содержания ФРПФ и активации синтеза пуринов *de novo* [4, 5, 24] – парадоксальный факт, поскольку синтез пуринов *de novo* требует гораздо больших затрат веществ, энергии и времени по сравнению с реутилизацией гипоксантина. Это и привлекло наше внимание к работам [17, 20, 23]. Мы предположили, что в печени реанимированных крыс *in situ* активность ГГФРТаза почти полностью подавлена мононуклеотидами, как описано в работе [23], вследствие чего доступность ФРПФ и интенсивность поступления гипоксантина в печень не могут оказывать влияние на реутилизацию последнего.

Если данное предположение верно, тогда: а) в регрессионных моделях реутилизации гипоксантина факторы НДТФ и НМФ должны всегда стоять со знаком минус; б) цифровые коэффициенты перед НДТФ и НМФ должны быть гораздо больше, чем коэффициенты перед остальными факторами. Однако в нашем исследовании не нашлось ни одной группы подопытных животных, в которой эти два постулата выполняются. Напротив, как следует из табл. 1 и 2, на реутилизацию гипоксантина содержание НМФ влияет со знаком плюс в 23-ти из 29-ти адекватных моделей, а содержание НДТФ влияет со знаком плюс в 17-ти из 30-ти моделей, величины же цифровых коэффициентов перед факторами НДТФ и НМФ колеблются в очень широких пределах.

В дополнение к исследованию многофакторных регрессионных моделей мы провели парный корреляционный анализ при помощи коэффициента Спирмена. Оказалось, что включение

^{14}C -гипоксантина в НМФ не имеет отрицательной по знаку парной корреляции, хотя бы даже статистически незначимой – ни с содержанием НМФ, ни с содержанием НДТФ, ни с суммой содержания НМФ+НДТФ – причем, отсутствие отрицательной корреляции характерно как для группы «Контроль», так и для всех без исключения групп реанимированных крыс – от 30 мин до 21 сут после реанимации.

Таким образом, снижение уровней НДТФ и НМФ не сопровождается усилением реутилизации гипоксантина. Это приводит нас к выводу, что протекание ГГФРТАзной реакции *in situ* не лимитируется ингибирующим влиянием мононуклеотидов.

Дальнейшее исследование регрессионных моделей было нацелено на установление роли ФРПФ. Первый этап реутилизации гипоксантина, в котором непосредственно участвует ФРПФ, – это реутилизация до НМФ, изучавшаяся нами по включению ^{14}C -гипоксантина в НМФ печени (табл. 1). В нашем исследовании было получено 10 адекватных моделей, в которых ФРПФ является одним из факторов, а включение ^{14}C -гипоксантина в НМФ – откликом. И оказалось, что во всех без исключения 10-ти моделях ФРПФ оказывает положительное влияние (перед ФРПФ стоит знак плюс) на реутилизацию гипоксантина (табл. 1). Напомним, что по методическим причинам мы определяли содержание ФРПФ в одном кусочке печени, а все остальные показатели – в другом ее кусочке, что, несомненно, «смазывало» связь ФРПФ с остальными факторами и с откликом. Но, раз уж закономерность проявилась сквозь эти помехи (причем, как у здоровых животных, так и на всех

сроках постреанимационного периода), то можно уверенно сделать вывод, что реутилизация гипоксантина до НМФ зависит *in vivo* от доступности ФРПФ.

Следующий этап реутилизации гипоксантина (до НДТФ) включает большое число реакций – ни в одной из которых, заметим, ФРПФ не участвует. В табл. 2 уровень ФРПФ представлен в качестве фактора регрессионных моделей в трех группах крыс: в группе «6 ч после реанимации» он оказывает влияние со знаком плюс в двух имеющихся моделях процесса реутилизации гипоксантина до НДТФ, но ФРПФ влияет со знаком минус на этот же процесс у здоровых животных (группа «Контроль») и у крыс, практически выздоровевших от постреанимационной болезни (группа «21 сут после реанимации»). Причина разнонаправленных влияний ФРПФ может заключаться в том, что от ФРПФ зависит биосинтез большого числа нуклеотидов, которые способны противоположным образом влиять на реакции превращения НМФ в НДТФ [1, 16, 19, 21].

Во всех без исключения адекватных моделях (табл. 1 и 2) включение ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени имеет связь со знаком плюс с интенсивностью реутилизации гипоксантина как до НМФ, так и до НДТФ. Поскольку модели стандартизированы, есть возможность сравнить влияние факторов на отклик. Сравнение показало, что включение ^{14}C -гипоксантина в печень сильнее влияет по сравнению с остальными факторами на реутилизацию гипоксантина до НМФ (табл. 1), но гораздо слабее влияет на его реутилизацию до НДТФ (табл. 2). В механизмах этого влияния еще предстоит разобраться. Так, имеются данные о том, что по-

ступление гипоксантина в клетку может зависеть от его внутриклеточной реутилизации [16, 19], а не наоборот.

Часть линейных регрессионных моделей, построенных нами, не выдержали проверку на адекватность и поэтому не вошли в табл. 1 и 2. В этих случаях для получения адекватных моделей в будущих исследованиях целесообразно увеличивать объем выборки n (число животных в группе) и/или переходить к нелинейным моделям.

Выводы

1. Протекание ГГФРТазной реакции в печени *in situ* не лимитируется ингибирующим действием мононуклеотидов.

2. Образование в этих условиях НМФ из гипоксантина зависит главным образом от доступности ФРПФ для ГГФРТазной реакции.

3. Между поступлением из крови в печень гипоксантина и его превращением в пуриновые мононуклеотиды существует прямая связь.

4. Перечисленные закономерности справедливы как для здоровых, так и для реанимированных крыс в течение всего изученного периода – от 30 мин до 21 сут после реанимации.

Список литературы

1. *Дмитриенко Н.П.* Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – Киев: Наукова думка. – 1991. – 200 с.
2. *Дрейпер Н., Смит Г.* Прикладной регрессионный анализ. – М.: Финансы и статистика. – 1987. – 351 с
3. *Дудинька В., Хлынчак А.И., Скотницка Е., Суска М.* Метаболизм пуринов в эритроцитах человека // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 6. – С. 581-591.
4. *Золин П.П., Конвай В.Д., Домрачев А.А.* Фракционирование пуриновых производных в изучении энергетического обмена // Вестн. Ом. ун-та. – 2017. – № 1. – С. 65-70.

5. *Золин П.П., Лебедев В.М., Конвай В.Д.* Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа. – Омск: Изд-во Омского гос. ун-та. – 2009. – 344 с.
6. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармако-моделирования. – М.: Изд-во ВПК. – 2007. – 320 с.
7. *Конвай В.Д., Золин П.П., Вейцман Г.Е.* Способ радиометрического определения содержания фосфорибозилпирофосфата в биологических тканях. – 1991. – А.с. 1802335 СССР.
8. *Коновалов Ю.В.* Статистическое моделирование с использованием регрессионного анализа. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана. – 2013. – 73 с.
9. *Крыштановский А.О.* Анализ социологических данных с помощью пакета SPSS. – М.: Изд. дом ГУ ВШЭ. – 2006. – 281 с.
10. *Кубышин В.Л., Горбач З.В., Мальевская Е.В.* Регуляторная роль транскетолазы и некоторых метаболитов пентозофосфатного пути в синтезе фосфорибозилпирофосфата гемолитами эритроцитов // Журнал ГрГМУ. – 2010. – № 1. – С. 39-42.
11. *Львовский Е.Н.* Статистические методы построения эмпирических формул. – М.: Высш. школа. – 1988. – 239 с.
12. *Орлов А.И.* Прикладная статистика. – М.: Экзамен. – 2006. – 671 с.
13. *Тюрин Ю.Н., Макаров А.А.* Анализ данных на компьютере. – М.: МЦНМО. – 2016. – 367 с.
14. *Шмойлова Р.А., Минашкин В.Г., Садовникова Н.А., Шувалова Е.Б.* Теория статистики. – М.: Финансы и статистика. – 2006. – 383 с.
15. *Юнкеров В.И., Григорьев С.Г.* Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – СПб: ВМедА. – 2002. – 266 с.
16. *Buhl M.R.* Purine metabolism in ischemic kidney tissue // Dan. Med. Bull. – 1982. – V. 29, No. 1. – Pp. 1-26.
17. *Fu R., Sutcliffe D., Zhao H., Huang X., Schretlen D.J., Benkovic S., Jinnah H.A.* Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways // Mol. Genet. Metab. – 2015. – V. 114, No. 1. – Pp. 55-61.
18. *Harkness R.A., Saugstad O.D.* The importance of the measurement of ATP depletion and subsequent cell damage with an estimate of size and nature of the market for a practicable method // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1997. – V. 57, No. 8. – Pp. 655-672.

19. Harmsen E., de Tombe P.P., de Jong J.W., Achterberg P.W. Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia // *Am. J. Physiol.* – 1984. – V. 246, No. 1. – Pp. H37-H43.
20. Hasegawa H., Shinohara Y., Nozaki S., Nakamura M., Oh K., Namiki O., Suzuki K., Nakahara A., Miyazawa M., Ishikawa K., Himeno T., Yoshida S., Ueda T., Yamada Y., Ichida K. Hydrophilic-interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of erythrocyte 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2015. – V. 976-977. – Pp. 55-60.
21. Henderson J.F., Paterson A.R.P. Nucleotide metabolism. An introduction (Kindle Edition). – Burlington: Elsevier Science. – 2014. – 304 p.
22. López-Cruz R.I., Crocker D.E., Gaxiola-Robles R., Bernal J.A., Real-Valle R.A., Lugo-Lugo O., Zenteno-Savín T. Plasma hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase activity in bottlenose dolphins contributes to avoiding accumulation of non-recyclable purines // *Front. Physiol.* – 2016. – V. 7, article 213. – Pp. 1-8. – doi: 10.3389/fphys.2016.00213.
23. Vincent M.-F., Van der Berge G., Hers H.-G. Metabolism of hypoxanthine in isolated rat hepatocytes // *Biochem. J.* – 1984. – V. 222, No. 1. – Pp. 145-155.
24. Zolin P.P., Conway V.D. Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats // *Bul. Exper. Biol.* – 1997. – V. 124, No. 6. – Pp. 1180-1182.
5. Zolin P.P., Lebedev V.M., Conway V.D. Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа [Mathematical modelling of the metabolic processes with the use of regression analysis]. Omsk: Izd-vo Omskogo gos. un-ta. 2009. 344 p. (In Russian).
6. Karkischenko N.N. Аl'ternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodirovaniya [Biomedicine alternatives. Volume 1. Basic principles of biomedicine and pharmacomodelling]. Moscow: Izd-vo VPK. 2007. 320 p. (In Russian).
7. Conway V.D., Zolin P.P., Veytsman G.E. Sposob radiometricheskogo opredeleniya soderzhaniya fosforibozilpirofosfata v biologicheskikh tkanyakh [Method of radiometric determination of the content of phosphoribosyl pyrophosphate in biological tissues]. 1991. A.s. 1802335 USSR. (In Russian).
8. Kononov Yu.V. Statisticheskoe modelirovanie s ispol'zovaniem regressionnogo analiza [Statistical modelling with the use of regression analysis]. Moscow: Izd-vo MGTU im. N.E. Bauman. 2013. 73 p. (In Russian).
9. Kryshchanovskiy A.O. Analiz sotsiologicheskikh dannykh s pomoshch'yu paketa SPSS [Sociological data analysis using SPSS]. Moscow: Izd. dom GU VShE. 2006. 281 p. (In Russian).
10. Kubyshin V.L., Gorbach Z.V., Mal'evskaya E.V. Regul'yatornaya rol' transketolazy i nekotorykh metabolitov pentozofosfatnogo puti v sinteze fosforibozilpirofosfata gemolizatsiyami eritrotsitov [Regulatory role of transketolase and some metabolites of pentose phosphate pathway in the synthesis of phosphoribosyl pyrophosphate by erythrocyte hemolysates]. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2010. No. 1. Pp. 39-42. (In Russian).
11. L'vovskiy E.N. Statisticheskie metody postroeniya empiricheskikh formul [Statistical methods of empirical formulas construction]. Moscow: Vyssh. shkola. 1988. 239 p. (In Russian).
12. Orlov A.I. Prikladnaya statistika [Applied statistics]. Moscow: Ekzamen. 2006. 671 p. (In Russian).
13. Tyurin Yu.N., Makarov A.A. Analiz dannykh na komp'yutere [Data analysis on the computer]. Moscow: MTsNMO. 2016. 367 p. (In Russian).
14. Shmoylova R.A., Minashkin V.G., Sadovnikova N.A., Shuvalova E.B. Teoriya statistiki [Theory of statistics]. Moscow: Finansy i statistika. 2006. 383 p. (In Russian).
15. Yunkerov V.I., Grigor'ev S.G. Matematiko-statisticheskaya obrabotka dannykh meditsinskikh issledovaniy [Mathematical and statistical data processing for medical research].

References

1. Dmitrienko N.P. Purinovy obmen i ego regul'yatsiya v limfotsitakh [Purine metabolism and its regulation in lymphocytes]. Kiev: Naukova dumka. 1991. 200 p. (In Russian).
2. Dreyper N., Smit G. Prikladnoy regressionnyy analiz [Applied regression analysis]. Moscow: Finansy i statistika. 1987. 351 p. (In Russian).
3. Dudin'ska V., Khlynchak A.Y., Skotnitska E., Suska M. Metabolizm purinov v eritrotsitakh cheloveka [Purine metabolism of human erythrocytes]. *Biochemistry.* 2006. V. 71. No. 6. Pp. 581-591. (In Russian).
4. Zolin P.P., Conway V.D., Domrachev A.A. Fraksionirovanie purinovykh proizvodnykh v izuchenii energeticheskogo obmena [Fractionating of the purine compounds for energy metabolism study]. *Herald of Omsk University.* 2017. No. 1. Pp. 65-70. (In Russian).

- Saint Petersburg: VMedA. 2002. 266 p. (In Russian).
16. **Buhl M.R.** Purine metabolism in ischemic kidney tissue. *Dan. Med. Bull.* 1982. V. 29, No. 1. Pp. 1-26.
 17. **Fu R., Sutcliffe D., Zhao H., Huang X., Schretlen D.J., Benkovic S., Jinnah H.A.** Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. *Mol. Genet. Metab.* 2015. V. 114, No. 1. Pp. 55-61.
 18. **Harkness R.A., Saugstad O.D.** The importance of the measurement of ATP depletion and subsequent cell damage with an estimate of size and nature of the market for a practicable method. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1997. V. 57, No. 8. Pp. 655-672.
 19. **Harmsen E., de Tombe P.P., de Jong J.W., Achterberg P.W.** Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.* 1984. V. 246, No. 1. Pp. H37-H43.
 20. **Hasegawa H., Shinohara Y., Nozaki S., Nakamura M., Oh K., Namiki O., Suzuki K., Nakahara A., Miyazawa M., Ishikawa K., Himeno T., Yoshida S., Ueda T., Yamada Y., Ichida K.** Hydrophilic-interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of erythrocyte 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015. V. 976-977. Pp. 55-60.
 21. **Henderson J.F., Paterson A.R.P.** Nucleotide metabolism. An introduction (Kindle Edition). Burlington: Elsevier Science. 2014. 304 p.
 22. **López-Cruz R.I., Crocker D.E., Gaxiola-Robles R., Bernal J.A., Real-Valle R.A., Lugo-Lugo O., Zenteno-Savín T.** Plasma hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase activity in bottlenose dolphins contributes to avoiding accumulation of non-recyclable purines. *Front. Physiol.* 2016. V. 7, article 213. Pp. 1-8. doi: 10.3389/fphys.2016.00213.
 23. **Vincent M.-F., Van der Berge G., Hers H.-G.** Metabolism of hypoxanthine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1984. V. 222, No. 1. Pp. 145-155.
 24. **Zolin P.P., Conway V.D.** Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats. *Bul. Exper. Biol.* 1997. V. 124, No. 6. Pp. 1180-1182.

Mathematical modeling of the salvage pathway of hypoxanthine

P.P. Zolin, V.M. Lebedev, V.D. Conway

The aim of this paper is to develop mathematical models capable of simulating the hypoxanthine metabolism *in vivo*: hypoxanthine incorporation in the liver, its salvage pathway, the regulation of this process by mononucleotides and by phosphoribosyl pyrophosphate. Experiments were performed in male rats exposed to 6,5 min asphyxia with following resuscitation. Rats euthanized in 30 min, 6 h, 24 h, 3 days, 7 days and 21 days after resuscitation were compared with control animals. Authors conclude from mathematical modeling that the activity of liver hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase *in situ* is regulated by the availability of phosphoribosyl pyrophosphate. The hypoxanthine inclusion in salvage pathway (^{14}C -hypoxanthine incorporation in nucleoside monophosphates, ^{14}C -hypoxanthine incorporation in nucleoside di- and triphosphates) was not influenced *in situ* by mononucleotides level.

Key words: purine metabolism, hypoxanthine, salvage pathway, mathematical modeling, phosphoribosyl pyrophosphate.

Изучение специфической фармакологической активности комплекса гликозилированных полипептидов, выделенного из морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis* на модели острого бронхита у крыс

А.Е. Кательникова¹, К.Л. Крышень², М.Н. Макарова², В.Г. Макаров²,
В.В. Воробьева¹, А.Н. Шиков^{1,2}

¹ – ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

² – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», п. Кузьмолковский, Ленинградская область

Контактная информация: Кательникова Анастасия Евгеньевна, varuna1989@yandex.ru

Проведено изучение противовоспалительной активности комплекса гликозилированных полипептидов (КГП), выделенных из морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis*, на модели острого бронхита, индуцированного сигаретным дымом у крыс.

Эксперимент проведен на самцах крыс Wistar. Животные были разделены на 6 групп: 4 экспериментальных, контрольная и интактная. Животным экспериментальных групп распыляли ингаляционно р-р КГП в дозах 25, 50 и 100 мкг/кг, а также препарат сравнения амброксол в дозе 3,6 мг/кг один раз в сутки, с 14-го дня от начала индукции острого бронхита и в течение последующих 14-ти дней. Индукцию патологии осуществляли путем экспозиции сигаретным дымом с помощью специального оборудования. В качестве критериев оценки использовали анализ гематологических показателей, клеточного состава бронхолегочного лаважа, а также гистологическое исследование ткани левого легкого на уровне средней трети (ворот легкого).

По результатом исследования КГП во всех исследуемых дозах снижал общее количество лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже в среднем на 58%, в дозах 50 и 100 мкг/кг уменьшал данный показатель в крови в среднем на 44% по сравнению с результатами контрольной группы. Микроскопическая оценка толщины бронхов позволила установить дозозависимый эффект тестируемого комплекса со снижением толщины бронха на 61% в максимальной дозе по сравнению с результатами в контрольной группе.

Ключевые слова: комплекс гликозилированных полипептидов; острый бронхит, индуцированный сигаретным дымом; морские ежи (*S. droebachiensis*).

Введение

Острый бронхит (ОБ) – остро/подостро возникшее заболевание преимущественно вирусной этиологии, ведущим клиническим симптомом которого является кашель, продолжающийся 2–3 недели и, как правило, сопровождающийся конституциональными симпто-

мами и симптомами инфекции верхних дыхательных путей [3].

Провоцирующим фактором, или фактором, повышающим риск заболеваемости органов дыхания и, в частности, ОБ, является курение, причем не только хроническое курение, но и пассивное вдыхание табачного дыма. Поскольку 45%

от общей массы сигаретного дыма вдыхается активным курильщиком и 55% – рассеивается в окружающей среде [8, 9]. Уже после первого контакта с сигаретным дымом в бронхах возникает воспаление, а постоянное поступление приводит к воспалению бронхов с характерной для нее, главным образом, клеточной инфильтрацией нейтрофилами [6].

Терапия ОБ является одной из актуальных современных проблем. Для лечения бронхита применяют в первую очередь амброксол, бромгексин, карбоцистеин, ацетилцистеин, являющиеся синтетическими по своей природе, и антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, макролиды). С учетом патогенеза ОБ (воспаление, инфекция верхних дыхательных путей) и симптомами заболевания (кашель, за счет отека и раздражения слизистой провоспалительными медиаторами) хорошие перспективы в качестве лекарственных средств имеют препараты, созданные на основе природного сырья. Например, пептиды, выделенные из лосося, с молекулярной массой 1-2 кДа, обладают противовоспалительной активностью за счет ингибирования продукции оксида азота и провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 IL-1 β [5]. Известно, что соединения, выделенные из морских ежей, обладают противовоспалительным, иммуностимулирующим, антибактериальным, противовирусным действием и др. фармакологическими эффектами [1]. К примеру, водный экстракт гонад морских ежей проявлял противовоспалительное действие на модели адьювантного артрита у крыс, снижая симптомы заболевания на 55% [10]. Хлороформные и метаноловые экстракты, полученные из кишечника, гонад, шипов этих жи-

вотных, проявляют высокую антибактериальную активность в отношении *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Shigella sonnei* и *P. aeruginosa* [4]. Очевидно, биологически активные вещества из морских ежей могут рассматриваться как кандидаты в лекарственные препараты для лечения ОБ – в качестве не только симптоматической терапии, но и патогенетической.

Целью исследования явилась сравнительная экспериментальная оценка эффективности комплекса гликозилированных полипептидов, выделенных из морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis*, на модели острого бронхита, индуцированного сигаретным дымом у крыс.

Модель острого бронхита курильщика разработана в нашем институте на основании публикаций о моделировании повреждения легких сигаретным дымом, включая патологию хронической обструктивной болезни легких [7, 11].

Материалы и методы

Исследуемая субстанция представляет собой комплекс гликозилированных полипептидов (КГП), выделенных из зеленых морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis*. Методами ГЖХ-МС и ВЭЖХ-ELSD установлено, что субстанция содержит 10-15% пептидов, 35-45% аминокислот, 4-8% фосфолипидов, микроэлементы, сахара. При проведении электрофореза в полиакриламидном геле идентифицированы индивидуальные пептиды с молекулярными массами 19-15 кДа, 6-3,5 кДа и менее 3,5 кДа. В качестве препарата сравнения использовали амброксол (Амбробене, производитель – «MERCKLE, GmbH», Германия).

Разработка модели острого бронхита, индуцированного сигаретным дымом

В исследовании использованы самцы крыс Wistar конвенционального статуса массой тела 200-250 г, полученные из питомника лабораторных животных РАМН “Рапполово”. Животных содержали в виварии в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. В период эксперимента животные были размещены в поликарбонатных клетках группами по 6 особей на подстиле (площадь пола на 1 животное составляла 395 см²). Для кормления использовали комбикорм ПК-120-1, приготовленный по ГОСТ Р50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными Приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755. Эксперимент проводили согласно протоколу, одобренному биоэтической комиссией.

Животных разделяли методом блочной рандомизации на 6 групп по 12 в каждой: 4 экспериментальных, контрольная и интактная. Индукцию острого бронхита осуществляли путем экспозиции экспериментальных и контрольной групп животных сигаретным дымом с

помощью специального оборудования (курильная машина, разработка ЗАО “Санкт-Петербургский институт фармации”, Россия) на протяжении 28-ми дней (рис. 1).

Ежедневно для окуривания 6-ти клеток, содержащих по 12 экспериментальных животных, использовали 90 сигарет. Содержание смолы и никотина в сигаретах составляло 12 мг и 0,9 мг соответственно. Концентрация смолы, которая приходилась ежедневно на 1 экспериментальное животное, – 60 мг/кг, концентрация никотина – 4,2 мг/кг.

Дизайн исследования

Исследование направлено на установление специфической активности при курсовом ингаляционном введении в виде аэрозоля исследуемых препаратов. Р-р КГП распыляли при помощи ультразвукового ингалятора «Муссон-2» (ФГУП «Алмаз», Россия) в индивидуальные изолированные боксы для животного из расчета 25, 50 и 100 мкг/кг. Препарат сравнения – амброксол распыляли из расчета 3,6 мг/кг один раз в сутки. Введение исследуемых препаратов производили, начиная с 14-го дня от начала индукции острого бронхита и в течение последующих 14-ти дней. Контрольная группа животных по той же схеме в виде аэрозоля получала дистиллированную воду.

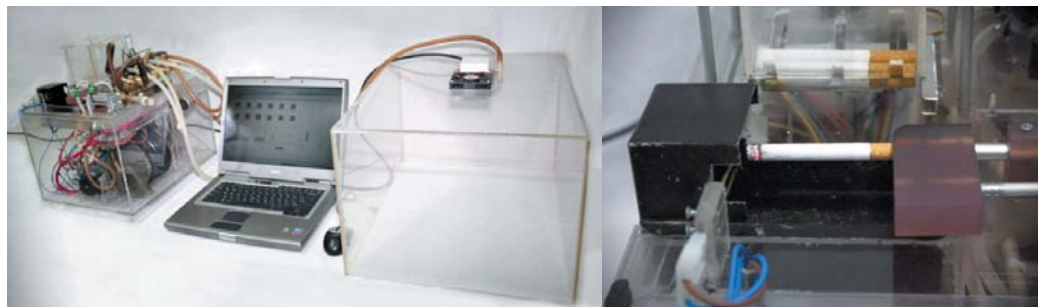


Рис. 1. Машина для курения сигарет.

Оцениваемые показатели

На 1-й, 7-й, 14-й и 28-й дни исследования производили забор крови из хвостовой вены. По окончании эксперимента (28-й день) животных эвтаназировали методом цервикальной дислокации. При этом каждую экспериментальную группу разделяли на две подгруппы по 6 животных в каждой: в одной осуществляли забор бронхолегочного лаважа (БАЛ); в другой – проводили макроскопическое и гистологическое исследование ткани левого легкого на уровне средней трети (ворот легкого) [2].

Критерии оценки

1. В образцах цельной крови и в БАЛ определяли: количество лейкоцитов и лейкоформулу (гранулоциты, моноциты, лимфоциты);

2. В процессе гистологического исследования оценивали:

- толщину слизистой бронхов на протяжении 500 мкм;

- степень (количественно) изменений в ткани легких в баллах по визуально-аналоговой шкале морфологических изменений слизистого и подслизистого слоя бронхов при остром бронхите: норма (0), слабая (1+), средняя (2+), сильная (3+);

- содержание (количественно) нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов в экссудате в просвете бронхов: отсутствие кле-

ток (0); минимальное количество от 1-й до 10-ти клеток (1+); умеренное количество от 11-ти до 30-ти клеток (2+); значительное количество от 31-й и выше (3+).

Статистическая обработка

Статистический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 («StatSoft», США). Для статистического анализа показателей крови, клеточного состава БАЛ и толщины слизистой бронхов использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением (post hoc) с использованием теста Тьюки (post hoc Tukey's). Для данных, представленных в баллах, использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Различия были определены при уровне значимости, равном 0,05.

Результаты и их обсуждение

У всех животных, подвергшихся воздействию сигаретного дыма, к 7-му дню исследования количество лейкоцитов в крови увеличилось в среднем в 4 раза (ANOVA, $p < 0,05$). Количество лейкоцитов в контрольной группе животных с 14-го дня и по 28-й день исследования сохранялось на одном уровне, превышая показатель в интактной группе в 1,7-1,9 раза (см. табл. 1). Концентрации грануло-

Таблица 1
Динамика изменения количества лейкоцитов ($10^9/л$) в крови животных ($n=12$) в период с 1-го по 28-й день исследования, $M \pm m$

Группа	День исследования			
	1-й	7-й	14-й	28-й
Интактная	$5,1 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,7^{**}$
Контрольная	$5,1 \pm 0,3$	$26,6 \pm 1,1^*$	$8,8 \pm 0,6^*$	$9,9 \pm 0,4^*$
Амброксол, 3,6 мг/кг	$5,6 \pm 0,3$	$21,7 \pm 1,1^{* **}$	$9,9 \pm 0,8^*$	$5,9 \pm 0,7^{**}$
КГП, 25 мкг/кг	$5,7 \pm 0,3$	$22,8 \pm 1,2^*$	$8,4 \pm 0,5^*$	$8,4 \pm 0,5^*$
КГП, 50 мкг/кг	$5,5 \pm 0,3$	$22,8 \pm 1,2^*$	$9,1 \pm 0,3^*$	$4,8 \pm 0,4^{**}$
КГП, 100 мкг/кг	$5,6 \pm 0,4$	$34,9 \pm 1,2^{* **}$	$8,6 \pm 0,4^*$	$4,0 \pm 0,4^{**}$

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с интактными животными, тест Тьюки, при $p \leq 0,05$; ** – различия статистически значимы по сравнению с контрольными животными, тест Тьюки, при $p \leq 0,05$.

цитов, моноцитов и лимфоцитов в течение 28-ми дней исследования существенно не изменялась (данные не приведены).

При оценке лейкоцитарного состава бронхоальвеолярного лаважа на 28-й день исследования в контрольной группе животных отмечено повышение содержания лейкоцитов за счет увеличения популяции моноцитов и гранулоцитов, что свидетельствует о воспалительном процессе в легких (см. табл. 2). Уровень лейкоцитов в БАЛ контрольных животных статистически значимо превосходил данный показатель интактной группы в 2,3 раза, по популяции моноцитов и нейтрофилов – больше в 4 и 6,7 раз соответственно (ANOVA, $p < 0,05$).

В экспериментальных группах состав БАЛ практически не отличался от пока-

зателей интактной группы. Тенденция к повышению числа гранулоцитов без достоверных отличий от интактной группы отмечена в группах животных, получавших референтный препарат амброксол и исследуемый КГП в дозе 25 мкг/кг.

При проведении гистологического исследования в контрольной группе животных были выявлены следующие изменения: гиперплазия эпителия бронхов, инфильтрация слизистого и подслизистого слоев стенки бронха нейтрофилами, лимфоцитами, макрофагами, очаговый некроз слизистой бронхов с деформацией слизистой бронха, а также развитие осложнения виде острой мелкоочаговой бронхопневмонии (рис. 2). Перечисленные гистологические признаки свидетельствовали о развитии

Таблица 2

Клеточный состав БАЛ на 28-й день исследования, $M \pm m$, $n=6$

Группа	Клетки крови			
	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	Моноциты, $10^9/\text{л}$	Гранулоциты, $10^9/\text{л}$
Интактная	$0,11 \pm 0,04^*$	$0,09 \pm 0,03$	$0,009 \pm 0,002^*$	$0,012 \pm 0,005^*$
Контрольная	$0,26 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	$0,037 \pm 0,002$	$0,080 \pm 0,007$
Амброксол, 3,6 мг/кг	$0,12 \pm 0,02^*$	$0,09 \pm 0,01$	$0,010 \pm 0,002^*$	$0,020 \pm 0,005^*$
КГП, 25 мкг/кг	$0,11 \pm 0,01^*$	$0,08 \pm 0,01$	$0,011 \pm 0,001^*$	$0,020 \pm 0,004^*$
КГП, 50 мкг/кг	$0,11 \pm 0,02^*$	$0,09 \pm 0,02$	$0,007 \pm 0,001^*$	$0,016 \pm 0,002^*$
КГП, 100 мкг/кг	$0,10 \pm 0,02^*$	$0,08 \pm 0,02$	$0,007 \pm 0,002^*$	$0,014 \pm 0,003^*$

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контрольными животными, тест Тьюки, при $p \leq 0,05$.

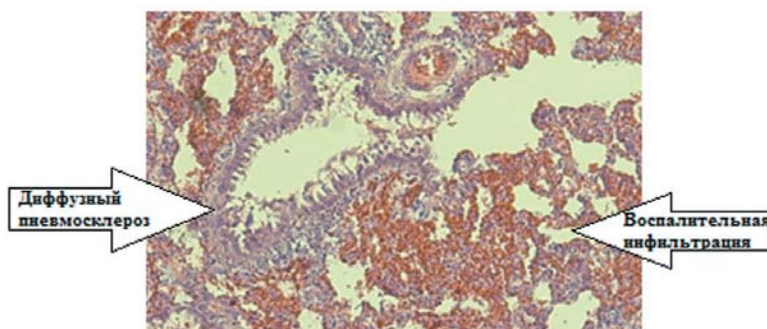


Рис. 2. Контрольная группа животных. Резко выраженный перибронхиальный и диффузный пневмосклероз, диффузно-выраженная воспалительная инфильтрация, деформация стенок бронхов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 50$.

острого катарального / острого катарально-гнойного бронхита, а также мелкоочаговой бронхопневмонии.

В интактной группе бронхи среднего калибра были выстланы двурядным эпителием. В подслизистом слое стенки бронха наблюдалась слабо выраженная инфильтрация лимфоцитами и макрофагами. Волокнисто-хрящевая оболочка лишена хряща и представлена пучками циркулярно расположенных гладкомышечных волокон. Адвентициальная оболочка образована тонкой прослойкой рыхлой волокнистой соединительной ткани. Признаки воспаления отсутствовали (рис. 3).

В экспериментальной группе животных, получавших референтный препарат амброксол в дозе 3,6 мг/кг, в слизистой оболочке бронхиального дерева встречалась преимущественно слабо выраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация. Слабая инфильтрация нейтрофилами встречалась в слизистом слое в большинстве случаев, в подслизистом слое преобладала слабо-выраженная инфильтрация нейтрофилами. Таким образом, в данной группе крыс имелась гистологическая картина острого катарально-гнойного бронхита.

При гистологическом исследовании среднего бронха у животных, получавших КГП в дозах 25 и 50 мкг/кг, толщина гиперплазированной слизистой была увеличена по сравнению с группой интактных крыс и снижена по сравнению с группой контрольных животных. В слизистой и подслизистом слоях бронхиального дерева регистрировали слабо и умеренно выраженную лимфо-макрофагальную инфильтрацию. Имела место также слабо выраженная инфильтрация нейтрофилами слизистого и подслизистого слоев, что соответствует гистологической картине преимущественно острого катарального бронхита и, в единичных случаях, острого катарально-гнойного бронхита.

Микроскопическая картина бронхов у животных, получавших КГП в максимальной дозе 100 мкг/кг, выглядела следующим образом: в слизистой бронхиального дерева отмечали лимфо-макрофагальную слабовыраженную инфильтрацию, в подслизистом слое инфильтрация также была слабо выражена. Инфильтрация нейтрофилами слизистого и подслизистого слоя – слабо выражена (рис. 4). Эти признаки соответствуют гистологической картине острого катарального бронхита.

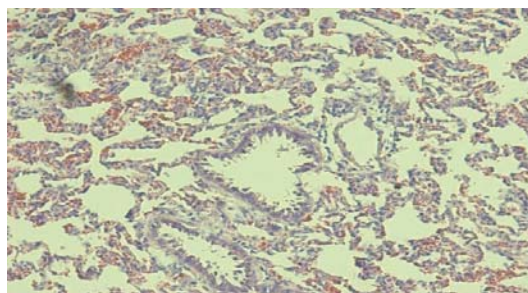


Рис. 3. Интактная группа животных. Изменения в пределах нормы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x50.

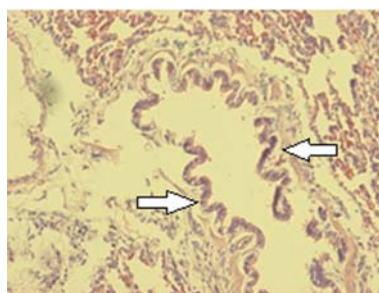


Рис. 4. КГП в дозе 100 мкг/кг. Слабо выраженная пролиферация мерцательного эпителия бронхов. Окраска гематоксилин-эозином (стрелки). Ув. x50.

По результатам гистологического исследования была проведена оценка степени выраженности воспалительного инфильтрата (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы) в ткани легких. Полученные данные представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3
Характеристика воспалительных изменений ткани легких в различных группах в баллах на 28-й день исследования (Ме (Q1;Q2)), n=6

Группа	Инфильтрация лимфоцитами и макрофагами (баллы)		Инфильтрация нейтрофилами, (баллы)	
	слизистая	подслизистая	слизистая	подслизистая
Интактная	0 (0;0)**	0 (0;0)**	0 (0;0)**	0 (0;0)**
Контрольная	2 (1;2)*	3 (3;3)*	1,5 (1;2)*	1 (1;2)*
Амброксол, 3,6 мг/кг	1 (0;1)* **	1 (0;1)* **	1 (0;1)* **	0,5 (0;1)*
КГП, 25 мкг/кг	1 (0;1)* **	1 (1;1)* **	1 (0;1)*	1 (0;1)*
КГП, 50 мкг/кг	1 (1;1)* **	1 (0;1)* **	1 (0;1)* **	0,5 (0;1)*
КГП, 100 мкг/кг	0,5 (0;1)* **	0 (0;1)**	0,5 (0;1)* **	0 (0;1)

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с интактными животными, тест Манна-Уитни, при $p \leq 0,05$; ** – различия статистически значимы по сравнению с контрольными животными, тест Манна-Уитни, при $p \leq 0,05$.

Таблица 4
Гистологический анализ воспалительного экссудата в просвете бронхов в различных группах в баллах на 28-й день исследования (Ме (Q1;Q2)), n=6

Группа	Экссудат в просвете бронхов (баллы)			Очаги некроза эпителия бронхов
	Нейтрофилы	Лимфоциты	Макрофаги	
Интактная	0 (0;0)**	0 (0;0)**	0 (0;0)**	0 (0;0)**
Контрольная	2 (2;3)*	2 (2;3)*	1,5 (0;3)*	1 (1;2)*
Амброксол, 3,6 мг/кг	0 (0;0)**	0 (0;0)**	0 (0;1)	0 (0;1)**
КГП, 25 мкг/кг	0,5 (0;1)* **	1 (0;1)* **	1 (0;1)*	0,5 (0;1)*
КГП, 50 мкг/кг	0,5 (0;1)* **	0,5 (0;1)**	1 (0;1)*	0,5 (0;1)**
КГП, 100 мкг/кг	0 (0;1)**	0 (0;0)**	0 (0;0)**	0 (0;0) **

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с интактными животными, тест Манна-Уитни, при $p \leq 0,05$; ** – различия статистически значимы по сравнению с контрольными животными, тест Манна-Уитни, при $p \leq 0,05$.

Таблица 5

Толщина слизистой бронхов, $M \pm m$, $n=6$

Группа	Толщина, мм
Интактная	39,5±2,8*
Контрольная	94,3±3,2
Амброксол, 3,6 мг/кг	61,2±4,2*
КГП, 25 мкг/кг	71,7±4,1
КГП, 50 мкг/кг	64,8±10,3*
КГП, 100 мкг/кг	57,2±9,0*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контрольными животными, тест Тьюки, при $p \leq 0,05$.

Также была проведена количественная оценка толщины слизистой в бронхах среднего калибра, взятых на уровне центрального отдела легких на протяжении 500 мкм. Полученные данные представлены в табл. 5.

Полученные результаты свидетельствуют о развитии выраженной патологии в контрольной группе. Толщина слизистой бронхов статистически значимо увеличивалась в 2,4 раза по сравнению с интактными животными, что характеризует наличие воспалительной гиперплазии эпителия бронхов (ANOVA, $p < 0,05$).

Амброксол и КГП во всех исследуемых дозах также статистически значимо снижали толщину слизистой бронхов по сравнению с контрольными животными.

Эти данные свидетельствуют о сравнимой эффективности референтного препарата и КГП на нормализацию состояния слизистой бронхиального дерева.

Заключение

Воспроизведенный ОБ характеризовался лейкоцитозом в крови. При ги-

стологическом исследовании в ответ на воспалительную реакцию выявлено утолщение слизистой бронхов и наличие острого катарального бронхита, острого катарально-гнойного бронхита, либо острого катарального бронхита + острой мелкоочаговой пневмонии. При этом в тканях легкого и БАЛ отмечена лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация. Все это свидетельствует о развитии воспалительной реакции в бронхах.

КГП во всех предложенных дозах улучшал течение острого катарального бронхита, развившегося у животных, защищал бронхи от негативного воздействия табачного дыма и снижал степень выраженности воспаления. Положительное действие КГП сопоставимо с действием референтного препарата амброксола, являющегося «золотым стандартом» в терапии ОБ. Максимальный эффект тестируемого комплекса был достигнут при применении в дозе 100 мкг/кг, что в 36 раз меньше терапевтической дозы амброксола и эквивалентно 18 мкг/кг для человека.

Список литературы

1. **Крыжановский С.П.** Биологически активные вещества морских ежей – основа для разработки лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций // Бюллетень СО РАМН. 2013. Т. 33. № 2. С. 39-48.
2. **Музыкян А.А., Макарова М.Н., Гуцин Я.А.** Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. 2014. № 2. С. 103-109.
3. **Чучалин А.Г.** Пульмонология: нац. рук-во. Кр. изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 800 с.
4. **Abubakar L., Mwangi C., Uku J., Ndirangu S.** Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* // Afr. J. Pharmacol. Ther. 2012. Vol. 1. No. 1. Pp. 19-23.
5. **Ahn C.B., Je J.Y., Cho Y.S.** Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis // Food Research International. 2012. Vol. 49. Pp. 92-98.
6. **Finkelstein R., Fraser R.S., Ghezze H., Cosio M.G.** Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995. No. 152(5 Pt 1). Pp. 1666-72.
7. **Jarvis M.J.** Smoking cessation // Eur. Respir. Rev. 1997. Vol. 7. No. 45. Pp. 230-234.
8. **Pinkerton K.E., Joad J.P.** Influence of air pollution on respiratory health during perinatal development // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2006. No. 33. Pp. 269-272.
9. **Sethi J.M., Rochester C.L.** Smoking and chronic obstructive pulmonary disease // Clin. Chest. Med. 2000. No. 21. Pp. 67-86.
10. **Sheean P., Hodges L.D., Kalafatis N., et al.** Bioactivity of extracts from gonadal tissue of the edible Australia purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* // J. Sci. Food Agric. 2007. Vol. 87. No. 4. Pp. 694-701.
11. **Yoshida T., Rubin T.** Pathobiology of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Physiol. Rev. 2007. Vol. 87. Pp. 1047-1082.
12. **farmatsevticheskikh substantsiy** [The urchin bioactive substances – framework for drugs and pharmaceutical materials development]. Bulletin of SB RAMS. 2013. V. 33. No. 2. Pp. 39-48. (In Russian).
13. **Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Guschin Ya.A.** Osobennosti gistologicheskoy obrabotki organov i tkaney laboratornykh zhivotnykh [Features histological processing of organs and tissues of laboratory animals]. Mezhdunarodnyj vestnik veterinarii [International Bulletin of Veterinary Medicine]. 2014. No. 2. Pp. 103-109. (In Russian).
14. **Chuchalin A.G.** Pulmonologiya: nats. ruk-vo. Kr. izd. [Pulmonology: National leadership. Short Edition]. Moscow: GEOTAR-Media. 2013. 800 p. (In Russian).
15. **Abubakar L., Mwangi C., Uku J., Ndirangu S.** Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla*. Afr. J. Pharmacol. Ther. 2012. Vol. 1. No. 1. Pp. 19-23.
16. **Ahn C.B., Je J.Y., Cho Y.S.** Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. Food Research International. 2012. Vol. 49. Pp. 92-98.
17. **Finkelstein R., Fraser R.S., Ghezze H., Cosio M.G.** Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995. No. 152(5 Pt 1). Pp. 1666-72.
18. **Jarvis M.J.** Smoking cessation. Eur. Respir. Rev. 1997. Vol. 7. No. 45. Pp. 230-234.
19. **Pinkerton K.E., Joad J.P.** Influence of air pollution on respiratory health during perinatal development. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2006. No. 33. Pp. 269-272.
20. **Sethi J.M., Rochester C.L.** Smoking and chronic obstructive pulmonary disease. Clin. Chest. Med. 2000. No. 21. Pp. 67-86.
21. **Sheean P., Hodges L.D., Kalafatis N., et al.** Bioactivity of extracts from gonadal tissue of the edible Australia purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. J. Sci. Food Agric. 2007. Vol. 87. No. 4. Pp. 694-701.
22. **Yoshida T., Rubin T.** Pathobiology of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Physiol. Rev. 2007. Vol. 87. Pp. 1047-1082.

References

1. **Kryzhanovskiy S.P.** Biologicheski aktivnyie veschestva morskikh ezhey – osnova dlya razrabotki lekarstvennykh preparatov i

Specific pharmacological activity study of glycosylated polypeptide complex extracted from sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in the model of acute bronchitis in rats

A.E. Katelnikova, K.L. Kryshen, M.N. Makarova, V.G. Makarov,
V.V. Vorobieva, A.N. Shikov

The anti-inflammatory activity of glycosylated polypeptide complex (GPC) extracted from sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* was studied in the model of acute bronchitis induced by a cigarette smoke in rats.

The experiment was performed in Wistar male rats. All animals were divided into six groups: four experimental, one control and one intact group. Animals in experimental groups were inhaled by GPC at 25, 50 and 100 µg/kg and also by a reference drug Ambrobene in 3.6 mg/kg, once a day, starting from the 14th day from acute bronchitis induction and during the following 14 days. Pathology induction was performed by an exposure to a cigarette smoke using special equipment. Hematological analysis, bronchopulmonary lavage cell composition and histological study of the left lung tissue at the level of the middle third (lung hilum) were used as the criteria for evaluation.

GPC at all tested doses reduced the number of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid by 58%, and at 50 and 100 µg/kg reduced the number of leukocytes in blood by 44% compared to control group. Microscopic observation of bronchial tissue evidenced about a dose-dependent reduction of bronchi thickness after administration of GPC. Maximal thickness reduction was observed at 100 µg/kg and reached 61% comparing with control group.

Key words: glycosylated polypeptide complex; acute bronchitis, cigarette smoke; sea urchins (*S. droebachiensis*).



Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы

Ю.И. Сысоев, С.В. Оковитый, Б. Узугбунам

ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Контактная информация: Сысоев Юрий Игоревич, susoyev92@mail.ru

Оценено влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологических нарушений у крыс после черепно-мозговой травмы (ЧМТ) на модели контролируемого кортикального ударного повреждения «Controlled cortical impact injury». Установлено, что повреждение зоны сенсомоторной коры у крыс вызывает стойкий неврологический дефицит, наиболее выраженный в первые сутки после операции, с постепенным улучшением состояния животных в течение последующих дней. Проведено сравнение нейропротекторного действия изучаемого соединения с другими средствами, используемыми при ЧМТ. Применение нового производного диэтиламиноэтанола у травмированных животных приводило к улучшению состояния моторной функции передней и задней конечностей, расположенных контрлатерально к месту повреждения, а также к увеличению показателей общей двигательной и поисково-исследовательской активности.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, нейропротекторные средства, производные аминокислот.

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является актуальной медико-социальной и экономической проблемой для всех стран, затрагивающей более 10 млн человек ежегодно. Также она связана с высокими показателями летальности, стойкой нетрудоспособностью, инвалидизацией наиболее социально активной части общества. В России на долю ЧМТ приходится $\geq 60\%$ травм тяжелой степени, она занимает второе место среди всех причин летальности, а среди причин развития инвалидиза-

ции – первое место. Огромны и экономические потери в связи с временной или стойкой утратой трудоспособности у пострадавших с ЧМТ. Например, в США ежегодные расходы, которые включают в себя потерю потенциального дохода пациента и родственников, стоимость неотложной помощи, а также другие медицинские расходы, такие как постоянный амбулаторный уход и реабилитация, оценивают в среднем в 4 млрд долларов [7].

Одной из групп нейропротекторных и ноотропных средств, представ-

ляющих большой интерес в качестве базисных средств фармакотерапии у больных с черепно-мозговой травмой, являются производные аминокетанол. К ним относятся деанола ацеглумат, холина альфосцерат, а также цитиколин.

Эти препараты способны оптимизировать холинергическую передачу в ЦНС [11], снижать выраженность воспаления и окислительного стресса в поврежденных нейронах [6], а также стимулировать нейро- [10] и ангиогенез [13].

Целью исследования явилось изучение нейрореабилитационной активности нового соединения диэтиламиноэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) на модели черепно-мозговой травмы у крыс.

Материалы и методы

Все эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде. Все животные были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14 сут.

Исследования выполнены на 75-ти белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Контрольная группа включала 20 крыс, опытные группы – по 10, интактная – 15 животных. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии ФГОУ ВО СПХФА Минздрава России.

Черепно-мозговую травму моделировали путем нанесения удара по участку сенсомоторной коры. Локализацию зоны сенсомоторной коры определяли по атласу стереотаксических координат Paxinos G. и Watson C. [19]. Для создания травмы животных наркотизировали внутривентральным введением р-ра хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего проводили трепанацию в левой лобной части черепа над зоной сенсомоторной коры (рис. 1). Центр трепанационного отверстия находился на 5 мм роstralнее и 2,5 мм медиальнее брегмы. В

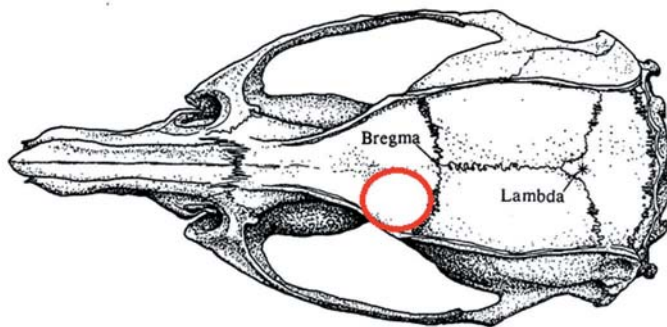


Рис. 1. Область трепанации черепа над зоной сенсомоторной коры [19].

трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3 мм с ходом 4 мм, по которому с высоты 10 см ударял скользящий в стальной трубке груз массой 50 г. Выверленную пластину возвращали на место и зашивали разрез кожи [15].

В первые сутки после операции у животных оценивали выраженность неврологического дефицита в тесте «Стимулирование конечностей». Тест заключался в ответе задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. Процесс тестирования состоял из семи различных испытаний, результаты выражали в сумме баллов. Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание; 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 сек и/или не полностью; 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Максимально возможное суммарное количество баллов было равно 14-ти [4]. На третьи сутки тест повторяли.

В тесте «Открытое поле» использовалась видеокомпьютерная регистрация и автоматическая обработка движений животных. Определяли общую двигательную активность (ОДА), складывающуюся из горизонтальных и вертикальных перемещений, груминга и заглядываний в норки, и поисково-исследовательскую активность (ПИА), которую рассчитывали как сумму вертикальных перемещений и заглядываний.

На седьмые сутки проводили тесты «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Стимулирование конечностей», «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка».

В тесте «Цилиндр» оценивали асимметрию использования животным передних конечностей в процессе исследования стенок цилиндра. Для тестирования крысу помещали в цилиндр и проводили видеорегистрацию движений животного в течение 8-10 мин. Просмотр видеозаписи проводили в покадровом режиме, подсчитывая количество независимого использования латеральной и контралатеральной к месту повреждения конечностей во время исследования стенки цилиндра после подъема на задние лапы, а также одновременное (совместное) использование обеих лап. Данные представляли как процент использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов по формуле:

$$\frac{(\text{контр} + \frac{1}{2} \times \text{одновр})}{(\text{ипси} + \text{контр} + \text{одновр})} \times 100,$$

где контр – контралатеральная к месту повреждения конечность, одновр – одновременное использование передних конечностей, ипси – ипсилатеральная к месту повреждения конечность [4].

Тест «Сужающаяся дорожка» использовался для оценки сенсомоторной функции передних и задних конечностей. Установка представляет собой две сужающиеся дорожки длиной 165 см, расположенные друг под другом, причем нижняя имеет бортики для расположения конечностей животного во время соскальзывания с верхней доски. В конце установки располагается черная коробка, являющаяся конечной целью перемещения животного. Точка старта освещается ярким светом, мотивируя крыс бежать к концу доски в черную коробку. Перед моделированием ЧМТ животных в течение трех дней приуча-

ли пересекать «сужающуюся дорожку». Во время тестирования движения крыс записывались на видеокамеру. В показовом режиме просмотра видео для каждой конечности отдельно подсчитывали количество постановок конечности на нижнюю доску (ошибок), количество соскальзываний с верхней доски на нижнюю, а также общее количество шагов. Полученные по трем попыткам данные усреднялись, степень выраженности сенсомоторного дефицита рассчитывалась по формуле в процентах:

$$\frac{\text{ошибки} + 0,5 \times \text{соскальзывания}}{\text{общее кол-во шагов}} \times 100.$$

В тесте ПКЛ у крыс оценивали время нахождения в открытых (ОР) и закрытых «рукавах» (ЗР), а также ОДА, складывающуюся из количества заходов в темные/светлые «рукава», стоек, выглядываний из темных «рукавов», свисаний и грумингов.

В качестве объекта исследования было выбрано соединение диэтиламиноэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) в дозах 10 и 75 мг/кг. В качестве референсных препаратов использовали традиционно применяемые в терапии ЧМТ и нарушений мозгового кровообращения средства – производные аминокетанола – холина альфосцерат («СотексФармФирма», Россия) в дозе 100 мг/кг и цитиколин («ФеррерИнтернасьональ С.А.», Испания) в дозе 500 мг/кг. Выбор доз был основан на ранее проведенных экспериментах [5]. Все лекарственные средства вводили спустя 1 ч после нанесения травмы и далее каждый день в одно и то же время в течение семи дней.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Осу-

ществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью t-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде среднего арифметического (M) $\pm$ ошибка среднего (m). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты исследований

В ходе эксперимента установлено, что ударное повреждение зоны сенсомоторной коры у крыс вызывает стойкий неврологический дефицит, наиболее выраженный в первые сутки после операции и постепенно редуцирующийся в течение последующих дней.

В тесте «Стимулирование конечностей» показатели контрольной группы в первые, третьи и седьмые сут были достоверно ниже показателей здоровых животных в 12,7, 2,7 и 1,8 раза соответственно (табл. 1). На 3-й день в тесте «Открытое поле» у крыс контрольной группы также наблюдалось достоверное снижение ОДА и ПИА по сравнению с группой интактных животных (табл. 2), что согласуется с данными, полученными при исследовании с использованием модели закрытой ЧМТ [1]. В тесте ПКЛ на седьмые сут после травмы время нахождения в ЗР в контрольной и интактной группах достоверно не различалось.

Таблица 1

Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей»

Группа	1-й день	3-й день	7-й день
Интактные	14±0,0*	14±0,0*	14±0,0*
Контроль	1,1±0,4	5,2±0,3	7,8±0,4
Холина альфосцерат	1,9±0,4	6,4±0,2*	9,8±0,7*
Цитиколин	1,7±0,7	8,3±0,6*	11,3±0,3*
ФДЭС, 75 мг/кг	1,9±0,6	8,3±1,0*	9,6±0,6*
ФДЭС, 10 мг/кг	1,2±0,5	8,2±0,3*	10,2±0,6*

Примечание: * – достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 2

Характеристики животных в тесте «Открытое поле» на третьи сут после травмы

Группа	ОДА	ПИА
Интактные	27,5±2,6*	9,1±1,5*
Контроль	4,8±1,1	0,6±0,3
Холина альфосцерат	5,1±2,3	0,8±0,5
Цитиколин	7,5±2,1	0,7±0,3
ФДЭС, 75 мг/кг	8,8±2,8	0,9±0,5
ФДЭС, 10 мг/кг	23,9±5,4*	1,8±0,4*

Примечание: * – достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Однако у травмированных крыс наблюдалось некоторое уменьшение времени нахождения в ОР, что характерно для ЧМТ [1]. ОДА в тесте ПКЛ также не имела достоверных различий между группами интактных животных и контролем (табл. 3). В тесте «Цилиндр» на седьмые сут у травмированных животных можно было наблюдать статистически значимое снижение частоты использования передней лапы, расположенной контралатерально к месту повреждения (табл. 4). ЧМТ также вызывала у крыс развитие выраженного сенсомоторного дефицита передней и задней контралатеральных конечностей, фиксируемого в тесте «Сужающаяся дорожка» (табл. 5).

Все тестируемые ЛС на седьмые сут способствовали достоверному улучше-

нию функции передних и задних конечностей в тесте «Стимулирование конечностей». Наиболее высокий результат показали крысы, получавшие цитиколин: они имели менее выраженные двигательные нарушения передних и задних лап (сумма баллов, присвоенных данной группе в третий и седьмой день после травмы, в 1,6 и 1,4 раза больше по сравнению с контрольной группой). ФДЭС, вводимый в дозе 10 мг/кг, также достоверно ускорял восстановление двигательной функции конечностей по сравнению с контролем, при этом его активность статистически значимо не отличалась от таковой цитиколина. Достоверных различий между активностью вводимых ЛС ни на третьи, ни на седьмые сут получено не было.

В тесте «Открытое поле» группа, получавшая ФДЭС в дозе 10 мг/кг, имела достоверно более высокие значения ОДА и ПИА по сравнению с контролем в 5 и 3 раза соответственно. Кроме того, результаты данных животных были достоверно выше, чем у крыс, получавших холина альфосцерат. Статистически значимых отличий от результатов цитиколина и ФДЭС 75 мг/кг у группы ФДЭС 10 мг/кг зафиксировано не было (табл. 2).

В тесте ПКЛ холина альфосцерат и цитиколин достоверно снижали время нахождения крыс в ОР по сравнению с контролем. При этом они, также как и ФДЭС в дозе 10 мг/кг, несколько увеличивали продолжительность нахождения в ЗР, но статистической достоверности данные отличия не имели (табл. 3).

У крыс, получавших холина альфосцерат и цитиколин, происходило достоверное снижение показателя ОДА по сравнению с контрольными животными. ФДЭС, вводимый в обеих исследуемых дозах, снижал данный показатель, но отличия от контроля не были статистически значимыми.

В тесте «Цилиндр» достоверное улучшение по сравнению с контрольной группой наблюдалось у крыс, получавших ФДЭС в дозе 10 мг/кг (в 1,8 раза). Другие ЛС, вводимые травмированным животным, не давали увеличения частоты использования контралатеральной конечности (табл. 4).

ФДЭС в дозах 10 и 75 мг/кг способствовал статистически значимому улучшению состояния двигательной

Таблица 3

Характеристики животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на седьмые сут после травмы

Группа	Время в ОР, сек	Время в ЗР, сек	ОДА
Интактные	13,4±5,1	153,5±6,5	12,8±1,5
Контроль	20,7±5,1	158,8±6,3	13,2±1,9
Холина альфосцерат	4,4±4,4*	166,1±7,8	2,5±0,8*
Цитиколин	3,6±3,6*	172,1±5,1	3,4±0,7*
ФДЭС, 75 мг/кг	7,4±5,6	156,7±6,3	7,6±1,8
ФДЭС, 10 мг/кг	10,0±6,5	169,1±7,1	7,1±2,4

Примечание: * – достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 4

Частота использования передней контралатеральной конечности животными в тесте «Цилиндр» на седьмые сут после травмы

Группа	КЛ, %
Интактные	47,2±2,9*
Контроль	20,1±2,4
Холина альфосцерат	22,6±5,3
Цитиколин	25,6±6,5
ФДЭС, 75 мг/кг	21,7±3,0
ФДЭС, 10 мг/кг	36,3±4,9*

Примечание: * – достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 5

Степень выраженности сенсомоторного дефицита передней (СД-П) и задней (СД-З) контралатеральных конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка» на седьмые сутки после травмы

Группа	СД-П, %	СД-З, %
Интактные	1,6±0,5*	2,3±0,5*
Контроль	22,0±2,3	26,8±3,0
Холина альфосцерат	27,3±2,8	41,3±1,4*
Цитиколин	10,0±2,1*	26,8±3,9
ФДЭС, 75 мг/кг	8,3±1,2*	16,7±1,9*
ФДЭС, 10 мг/кг	4,8±0,8*	12,6±1,8*

Примечание: * – достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

функции конечностей в тесте «Стимулирование конечностей», причем, при меньшей дозе улучшение проявлялось в большей степени. Цитиколин достоверно улучшал моторику передней контралатеральной конечности по сравнению с контролем, однако не превосходил эффекты ФДЭС (табл. 5).

Обсуждение результатов

Положительный эффект аминокетанольных холинотропных средств при ЧМТ может быть обусловлен различными механизмами.

Во-первых, благодаря субстратному механизму действия происходит усиление синтеза ацетилхолина, выполняющего важную нейротрансмиттерную роль в пределах головного мозга.

Кроме того, накапливающийся ацетилхолин может действовать не только в пределах синапса и синаптической щели, но и диффузно распространяться парасинаптически, оказывая дополнительные эффекты [9], включающие нейропротекторное действие [14, 18], стимуляцию нейрогенеза [8], индукцию нейрональной пластичности и функциональную перестройку коры головного мозга [12, 17].

Изучаемые производные аминокетанола улучшали ответ конечностей на тактильную и проприорецептивную стимуляцию, увеличивали частоту использования контралатеральной конечности, способствовали нормализации моторно-координационной функции, а также увеличивали ОДА и ПИА травмированных крыс. При этом изменения в поведении наблюдались только у животных, которым вводились данные ЛС в субстратных дозах (холина альфосцерат и цитиколин).

Поскольку ФДЭС оказывал нейро-реабилитационное действие в несубстратных дозах, можно предположить, что положительный эффект данного средства связан не только с возможным накоплением ацетилхолина, но и с имеющимися в строении молекулы остатками фумарата и сукцината. Однако для действия фумарата и сукцината как субстратов цикла трикарбоновых кислот требуются их высокие концентрации, что противоречит полученным в данном исследовании результатам. Возможно, образующийся в процессе метаболизма молекулы ФДЭС сукцинат напрямую взаимодействует с сукцинатными ре-

цепторами SUCNR 1, расположенными в нейронах коры головного мозга. Как было показано, эти рецепторы участвуют в экспрессии основных проангиогенных факторов и регуляции активности NMDA-рецепторов [3], что также может вносить вклад в нейропротекторное действие ФДЭС.

Также не исключено, что комплекс аминокетанольных производных с субстратами цикла Кребса является эффективным носителем холиноподобных соединений через гематоэнцефалический барьер, т.к. сопоставимые с цитиколином нейротропные эффекты отмечаются в существенно более низкой дозе (10 мг/кг для ФДЭС против 500 мг/кг для цитиколина).

Снижение ОДА и времени нахождения в ОР лабиринта при увеличении времени нахождения в ЗР у травмированных животных на 7-й день курсового введения холина альфосцерата и цитиколина в субстратных дозах можно связать с изменением баланса между центральными адренергическими и холинергическими влияниями. Авторы работы [16] выдвинули гипотезу, что холинергическая и адренергическая системы в пределах ЦНС работают реципрокно, и выраженное превалирование холинергических влияний может приводить к развитию депрессивного состояния, в то время как преобладание катехоламинергических или серотонинергических – к формированию гиперактивности.

Исходя из того, что ФДЭС не оказывал влияния на поведение травмированных животных в тесте ПКЛ, можно сделать предположение, что данное средство не приводит к нарушению баланса между холинергической и

адренергической системами в головном мозге.

Обращает на себя внимание дозозависимое различие в эффективности ФДЭС. Проведенными экспериментами установлено, что доза препарата 10 мг/кг превосходит по своей эффективности дозу 75 мг/кг. Возможно, такая закономерность является характерной для сукцинатсодержащих препаратов, т.к. ранее было показано, что профилактическое внутривенное введение этилметилгидроксипиридина сукцината (Мексидол) в дозе 50 мг/кг уменьшает размер формирующегося инфаркта миокарда при окклюзии коронарной артерии, в отличие от дозы 100 мг/кг, использование которой не давало кардиопротекторного эффекта [3].

Сравнение профилей фармакологического эффекта изученных препаратов представлено на рис. 2. Анализ диаграммы показывает, что общая направленность действия всех изученных препаратов имеет сходные черты, а наибольшая эффективность отмечается при применении ФДЭС в дозе 10 мг/кг. Однако достоверных различий между эффективностью ФДЭС в дозе 10 мг/кг и средствами сравнения – цитиколином и холина альфосцератом (в тестах, где они давали статистически значимые улучшения состояния животных по сравнению с контролем) – не было. Кроме того, в тесте «Стимулирование конечностей» не наблюдалось достоверных различий между группами животных, получавших ФДЭС в дозах 10 и 75 мг/кг.

Таким образом, применение нового производного диэтиламиноэтанола в дозе 10 мг/кг у животных после ЧМТ

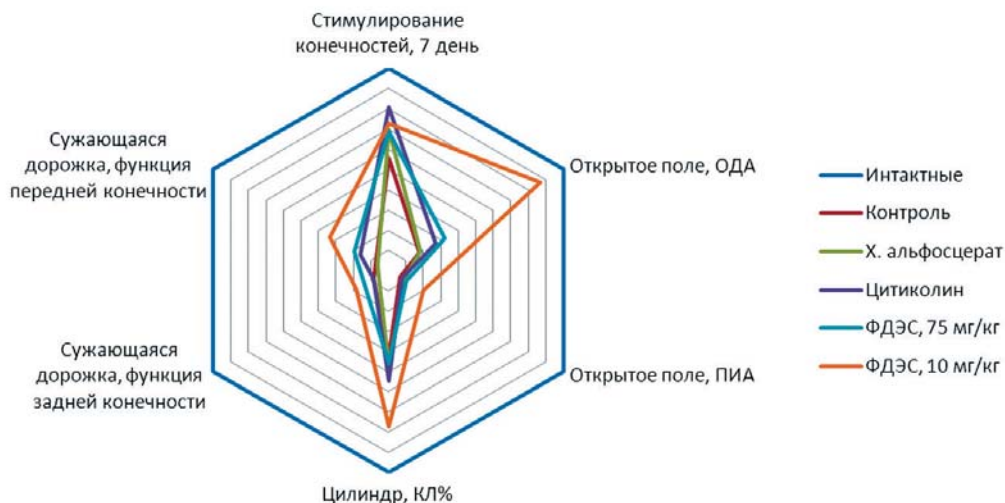


Рис. 2. Профиль фармакологической активности тестируемых средств.

позволило достичь улучшения состояния моторной функции передней и задней конечностей, расположенных контрлатерально к месту повреждения, а также повышения показателей ОДА и ПИА.

Выводы

1. При курсовом 7-дневном внутрибрюшинном введении (2Е)-4-[2-(диэтиламино)этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоат (2:1) способствует снижению неврологического дефицита и улучшению ориентировочно-исследовательского поведения у крыс на фоне черепно-мозговой травмы, вызванной методом контролируемого кортикального ушиба.

2. Наибольшая эффективность нового соединения наблюдается в дозе 10 мг/кг.

3. Нейрореабилитационная активность ФДЭС в дозе 10 мг/кг сопоставима с таковой цитиколина в дозе 500 мг/кг.

4. Изучаемое соединение не оказывает влияния на поведение травмирован-

ных животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», в отличие от холина альфосцерата и цитиколина.

Список литературы

1. Воронков А.В., Калашикова С.А., Хури Е.И., Поздняков Д.И. Моделирование черепно-мозговой травмы в условиях эксперимента у крыс // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 75.
2. Галагудза М.М., Сыренский А.В., Влагов Т.Д. и др. Эффекты изолированного и комбинированного использования этилметилгидроксипиридина сукцината и ишемического preconditionирования на выраженность ишемического реперфузионного повреждения миокарда у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72. – № 3. – С. 22-26.
3. Оковитый С.В., Радько С.В., Шустов Е.Б. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49. – № 9. – С. 1-7.
4. Силачев Д.Н. Изучение новых нейропротекторов на модели фокальной ишемии головного мозга: дис. ... канд. биол. наук. – МГУ им. М.В. Ломоносова. – М., 2009.
5. Титович И.А., Сысоев Ю.И., Болотова В.Ц., Оковитый С.В. Нейротропная активность но-

- вого производного аминэтанол в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80. – № 5. – С. 73-76.
6. **Adibhatla R., Hatcher J.** Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia // J. Neurosci. Res. – 2003. – Vol. 73. – No. 3. – Pp. 308-315.
 7. **Amcheslavsky V.G.** The use of citicoline (ceraxon) in the treatment of brain injuries // Therapy. – 2016. – Vol. 2. – No. 6. – Pp. 76-80.
 8. **Cooper-Kuhn C., Winkler J., Kuhn H.** Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat // J. Neurosci. Res. – 2004. – Vol. 77. – No. 2. – Pp. 155-165.
 9. **Descarries L., Gisiger V., Steriade M.** Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS // Prog. Neurobiol. – 1997. – Vol. 53. – No. 5. – Pp. 603-625.
 10. **Diederich K., Frauenknecht K., Minnerup J., et al.** Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats // Stroke. – 2012. – Vol. 43. – No. 7. – Pp. 1931-1940.
 11. **Freeman J., Jenden D.** The source of choline for acetylcholine synthesis in brain // Life Sci. – 1976. – Vol. 19. – No. 7. – Pp. 949-962.
 12. **Gu Q.** Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity // Neuroscience. – 2002. – Vol. 111. – No. 4. – Pp. 815-835.
 13. **Gutierrez-Fernandez M., Rodriguez-Frutos B., Fuentes B., et al.** CDPcholine treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke // Neurochem. Int. – 2012. – Vol. 60. – No. 3. – Pp. 310-317.
 14. **Hashimoto M., Kazui H., Matsumoto K., et al.** Donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease // Am. J. Psychiatry. – 2005. – Vol. 162. – No. 4. – Pp. 676-682.
 15. **Isaev N.K., Novikova S.V., Stelmashook E.V., et al.** Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant skqr1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat // Biochemistry (Moscow). – 2012. – Vol. 77. – No. 9. – Pp. 996-999.
 16. **Janowsky D., Davis J., El-Yousef M., et al.** A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression // Lancet. – 1972. – No. 7778II. – Pp. 632-635.
 17. **Kilgard M., Merzenich M.** Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity // Science. – 1998. – Vol. 279. – No. 5357. – Pp. 1714-1718.
 18. **O'Neill M., Murray T., Lakics V., et al.** The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration // Curr. drug targets CNS neurol. disorder. – 2002. – Vol. 1. – No. 4. – Pp. 399-411.
 19. **Paxinos G., Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th edition. – Academic press. – 2013. – P. 12.
 20. **Warburton E., Koder T., Cho K., et al.** Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory // Neuron. – 2003. – Vol. 38. – No. 6. – Pp. 987-996.

References

1. **Voronkov A.V., Kalashnikova S.A., Huri E.I., Pozdnjakov D.I.** Modelirovanie cherepno-mozgovoy travmy v usloviyah jeksperimenta u krysa [Modeling of craniocerebral trauma under experimental conditions in rats]. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]. 2016. No. 5. P. 75. (In Russian).
2. **Galagudza M.M., Syrenskij A.V., Vlasov T.D., et al.** Jeffekty izolirovannogo i kombinirovannogo ispol'zovaniya jetilmetilgidroksipiridina sukcinata i ishemicheskogo pre Kondicionirovaniya na vyrazhennost' ishemicheskogo reperfuzionnogo povrezhdeniya miokarda u krysa [Effects of isolated and combined use of ethylmethylhydroxypyridine succinate and ischemic preconditioning on the severity of ischemic reperfusion injury of the myocardium in rats]. Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija [Experimental and clinical pharmacology]. 2009. T. 72. No. 3. Pp. 22-26. (In Russian).
3. **Okovityj S.V., Rad'ko S.V., Shustov E.B.** Sukcinatnye receptory (SUCNR1) kak perspektivnaja mishaen' farmakoterapii [Succinate receptors (SUCNR1) as a perspective target of pharmacotherapy]. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal [Chemical and pharmaceutical journal]. 2015. T. 49. No. 9. Pp. 1-7. (In Russian).
4. **Silachev D.N.** Izuchenie novyh nejroprotektorov na modeli fokal'noj ishemii golovnogogo mozga [The study of new neuroprotectors on the model of focal cerebral ischemia]: dis. ... kand. biol. nauk [the dissertation ... candidate of biological sciences]. Lomonosov Moscow State University. Moscow, 2009. (In Russian).
5. **Titovich I.A., Sysoev Ju.I., Bolotova V.C., Okovityj S.V.** Nejrotropnaja aktivnost' novogo proizvodnogo aminojetanola v usloviyah jeksperimental'noj ishemii golovnogogo mozga [Neurotropic activity of the new aminoethanol derivative under conditions of experimental cerebral ischemia]. Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija [Experimental and clinical pharmacology]. 2017. T. 80. No. 5. Pp. 73-76. (In Russian).

6. *Adibhatla R., Hatcher J.* Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2003. Vol. 73. No. 3. Pp. 308-315.
7. *Amcheslavsky V.G.* The use of citicoline (ceraxon) in the treatment of brain injuries. *Therapy.* 2016. Vol. 2. No. 6. Pp. 76-80.
8. *Cooper-Kuhn C., Winkler J., Kuhn H.* Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J. Neurosci. Res.* 2004. Vol. 77. No. 2. Pp. 155-165.
9. *Descarries L., Gisiger V., Steriade M.* Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 1997. Vol. 53. No. 5. Pp. 603-625.
10. *Diederich K., Frauenknecht K., Minnerup J., et al.* Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats. *Stroke.* 2012. Vol. 43. No. 7. Pp. 1931-1940.
11. *Freeman J., Jenden D.* The source of choline for acetylcholine synthesis in brain. *Life Sci.* 1976. Vol. 19. No. 7. Pp. 949-962.
12. *Gu Q.* Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience.* 2002. Vol. 111. No. 4. Pp. 815-835.
13. *Gutierrez-Fernandez M., Rodriguez-Frutos B., Fuentes B., et al.* CDPcholine treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke. *Neurochem. Int.* 2012. Vol. 60. No. 3. Pp. 310-317.
14. *Hashimoto M., Kazui H., Matsumoto K., et al.* Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry.* 2005. Vol. 162. No. 4. Pp. 676-682.
15. *Isaev N.K., Novikova S.V., Stelmashook E.V., et al.* Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant skqr1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat. *Biochemistry (Moscow).* 2012. Vol. 77. No. 9. Pp. 996-999.
16. *Janowsky D., Davis J., El-Yousef M., et al.* A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. *Lancet.* 1972. No. 7778II. Pp. 632-635.
17. *Kilgard M., Merzenich M.* Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science.* 1998. Vol. 279. No. 5357. Pp. 1714-1718.
18. *O'Neill M., Murray T., Lakics V., et al.* The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr. drug targets CNS neurol. disord.* 2002. Vol. 1. No. 4. Pp. 399-411.
19. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th edition. Academic press. 2013. P. 12.
20. *Warburton E., Koder T., Cho K., et al.* Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron.* 2003. Vol. 38. No. 6. Pp. 987-996.

The influence of new diethylaminoethanol compound on the neurologic deficit in rats after traumatic brain injury

Y.I. Sysoev, S.V. Okovityi, B. Uzuegbunam

The influence of the new diethylaminoethanol derivative on the neurological deficit in rats after traumatic brain injury in the model «Controlled cortical impact injury» was evaluated. It was found, that damage of sensorimotor cortex cause the steady neurologic deficit in rats, which is mostly pronounced on the first day after the operation with the gradient improvement of condition of animals during the next days. Also, neuro-protective properties of the studying agent were compared with existing analogues. The use of the new diethylaminoethanol compound in traumatized rats led to improvement of hindlimb and forelimb motor function, which are situated contralaterally to the damaged area of the brain. Also the overall movement activity and research-exploratory activity were normalized.

Key words: traumatic brain injury, neuroprotective drugs, aminoethanol derivatives.

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, общепиологических 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.

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.

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, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр.10

ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

www.laboratorkorm.ru

на правах рекламы



БИОМЕДИЦИНА

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

Филиал «Столбовая»

Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (до 2002 года – Питомник лабораторных животных Столбовая РАМН) ведёт свою историю с 1929 года. По настоящее время питомник обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируруемыми по генетическим, экологическим, физиологическим, морфологическим признакам и состоянию здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества

лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев).

С Филиалом сотрудничает множество потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ, в т.ч. научно-исследовательские учреждения ФМБА, РАН, Минздрава и Минобороны России, учебные заведения медико-биологического профиля, производители и испытатели лекарственных средств.

Филиал «Столбовая» предлагает следующих животных:

I. Инбредные мыши линий:

- **BALB/c** (окраска шерсти: белая, альбиносы; генотип: b, c, d) – используются во всех медико-биологических исследованиях, характеризуются высокой частотой опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком, служат моделью для изучения потенциальных фибринолитических компонентов, лизисов и процессов формирования тромбозов, рекомендуются при изучении нарушений репродуктивной функции, обусловленной микоплазмами;

- **CBA/Jac** (окраска шерсти: агутти; генотип: k) – используются в радиологии, для изучения спонтанных опухолей печени, могут быть рекомендованы как долгожители, являются хорошей моделью для изучения зависимости течения беременности от возраста;

- **C57BL/6J** (окраска шерсти: чёрная; генотип: a, b) – используются практически во всех медико-биологических исследованиях, в т.ч. для изучения скелетных аномалий, дефектов развития головы и глаз, являются стандартной линией для поддержания мутаций, применяются в качестве эталона для сравнения с особенностями других линий в исследовании культур тканей, загрязнения атмосферы, гематологии, химиотерапии рака, радиации, питания;

- **DBA/2J** (окраска шерсти: светло-коричневая; генотип: a, b, d) – особенно широко используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях.

II. Межлинейные гибриды мышей:

- гибриды первого поколения (F1) генетически и фенотипически однородны, обладают большей устойчивостью к условиям внешней среды, чем животные инбредных линий, наследуют генетические особенности родительских линий, но не сохраняют всех их характеристик. Ответ организма на экспериментальное воздействие – однотипный и стабильный, воспроизводимость результатов исследований – высокая. Особенно широко используются в исследованиях онкологии, радиации.

III. Аутбредные животные (генетически контролируемые закрытые колонии нелинейных животных):

- **мыши линии ICR** (окраска шерсти: белая) – гетерозиготны по неопределённому числу генов, используется для оценки безопасности лекарственных препаратов, биологически активных добавок, косметических средств;

- **крысы Wistar** (окраска шерсти: белая, альбиносы) – используются в онкологических исследованиях, тератологии, для изучения проблем питания и старения;

- **хомяки сирийские** (окраска шерсти: умеренно желто-коричневая) – используются для наработки вакцин в токсикологии, для изучения поведенческих реакций, канцерогенеза;

- **морские свинки** (окраска шерсти: альбиносы и пестрые).



**142350, Московская обл., Чеховский р-н,
пос. Столбовая, ул. Мира, д. 1а
Тел.: 8(495)996-59-52; 8(496)726-95-16
Закупка животных: 8(964)768-25-40; 8(916)021-02-50
E-mail: biomaus@mail.ru**

