

3

2018

MEDICINE
ISSN 2074-5982

2018

3

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

75

Поздравляем с юбилеем

Редколлегия, редакционный совет, коллектив Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России сердечно поздравляет с юбилеем научного руководителя, главного редактора журнала «Биомедицина» – академика РАН, члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Николая Николаевича Каркищенко.

Выдающемуся советскому и российскому ученому-фармакологу Каркищенко Николаю Николаевичу исполнилось 75 лет. В родном Ростовском медицинском институте Николай Николаевич прошел путь от студента и ассистента до ректора. На созданной впервые в СССР Николаем Николаевичем в Ростовском медицинском институте кафедре клинической фармакологии прошли подготовку многие из ныне действующих фармакологов



России, успешно работающие не только в Российской Федерации, но и за рубежом. Активная научно-исследовательская и педагогическая работа была продолжена в ранге заместителя министра здравоохранения РФ. При активном участии Николая Николаевича был организован Институт повышения квалификации Минздрава СССР для врачей и специалистов Третьего главного управления, ныне – ФМБА России, в котором он также создал кафедру клинической фармакологии и возглавил ее. В 2002 году Николай Николаевич создал и возглавил Научный центр биомедицинских технологий РАМН, учредил научный журнал «Биомедицина». Под его руководством и при личном участии разработаны принципы доклинической и клинической оценки инновационных лекарственных средств, разработаны и внедрены новые средства лечения и профилактики социально значимых заболеваний, создана научная фармакологическая школа.

Каркищенко Николай Николаевич – автор около 600 научных трудов и патентов, им написано 18 монографий, учебников и руководств, под его руководством подготовлены и успешно защищены 44 кандидатских и 13 докторских диссертаций. Каркищенко Николай Николаевич является научным руководителем Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Им открыты научно-педагогические школы по созданию биомоделей, разработке методов исследования инновационных фармакологических средств и медицинских технологий.

Каркищенко Николай Николаевич является лауреатом Премии Ленинского комсомола, Государственных премий СССР и Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники, только за последние 10 лет он награжден премией Президиума РАМН, Орденом Почета, медалью ФМБА России «За отличие в медицинском обеспечении спортсменов сборных команд России» и Медалью за вклад в науку, а также другими наградами за достижения в области науки и техники. Каркищенко Николай Николаевич избран академиком Международной Академии астронавтики (Париж), академиком Российской академии ракетных и артиллерийских наук, членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук и Российской академии наук.

*Редколлегия, редакционный совет журнала «Биомедицина»,
коллектив Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России
сердечно поздравляет бессменного главного редактора
Николая Николаевича Каркищенко с 75-летним юбилеем
и желает долгих лет жизни, здоровья, творческого полета мысли,
удачи в делах и свершениях.*

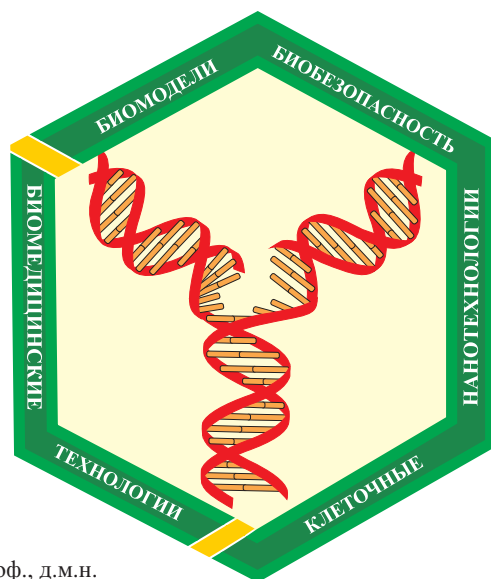
Научный журнал.

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)



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Н.Н. Каркищенко – акад. РАН, чл.-корр. РАН, проф., д.м.н.

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

В.Н. Каркищенко – проф., д.м.н.

ОТВ. СЕКРЕТАРЬ

Н.В. Станкова – к.б.н.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М.Т. Гасанов, Г.Д. Капанадзе, С.Л. Люблинский, Е.Л. Матвеев, Г.В. Раменская, А.О. Ревякин, Х.Х. Семенов, Ю.В. Фокин, Д.Б. Чайванов, Е.Б. Шустов

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

К.В. Анохин – чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Москва), **Е.Е. Ачкасов** – проф., д.м.н. (Москва), **В.М. Баранов** – акад. РАН, проф., д.м.н. (Москва), **И.А. Берзин** – проф., д.м.н. (Москва), **А.Т. Быков** – чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Сочи), **В. Влахов** – акад. Болгарской академии наук и искусств (София, Болгария), проф., д.м.н., **М.И. Воевода** – акад. РАН, проф., д.м.н. (Новосибирск), **А.М. Дыгай** – акад. РАН, проф., д.м.н. (Томск), **А.Л. Зефирова** – чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Казань), **Р.С. Кузденбаева** – акад. НАН Казахстана, проф., д.м.н. (Алматы, Казахстан), **В.Г. Кукес** – акад. РАН, проф., д.м.н. (Москва), **Т.А. Лежава** – проф., д.б.н. (Тбилиси, Грузия), **Ю.С. Макляков** – проф., д.м.н. (Ростов-на-Дону), **А.И. Мирошников** – акад. РАН, д.х.н. (Пушино, МО), **А.Н. Мурашев** – проф., д.б.н. (Пушино, МО), **С.В. Оковитый** – проф., д.м.н. (Санкт-Петербург), **С.Ю. Пчелинцев** – проф., д.м.н. (Любучаны, МО), **Б.Д. Цыганков** – чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Москва), **В.И. Цысь** – акад. РАЕН, проф., д.с.-х.н. (Смоленск), **В.П. Рябых** – проф., д.б.н. (Боровск, МО), **В.П. Фисенко** – акад. РАН, проф., д.м.н. (Москва), **Д.А. Сычев** – чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Москва), **Д.Ф. Хритинин** – чл.-корр. РАН, проф., д.м.н. (Москва), **Е.В. Ших** – проф., д.м.н. (Москва)

Адрес редакции:

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

Отпечатано в типографии «Айсинг»
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18.
Подписано в печать 27.09.2018
Тираж 3 000 экз.

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.

Содержание

НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Р.А. Агельдинов, Н.В. Петрова, Ю.В. Фокин, Д.В. Хвостов
Анализ профиля экспрессии генов NOS2, PDE5A и HIF-1 α методом цифровой капельной ПЦР4

И.А. Помыткин, И.А. Красильникова, В.Г. Пинелис, Н.Н. Каркищенко
Инсулиновый рецептор в мозге: новая мишень в лечении центральной инсулиновой резистентности17

А.Ф. Газизова, Е.Р. Курбатов, И.П. Рудакова, А.А. Курбатова, Е.В. Зверева, А.А. Бобылева, Ю.В. Фокин
Поиск биологически активных соединений в ряду гидразонов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты35

МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В.М. Абрамов, В.С. Хлебников, И.В. Косарев, Т.В. Припутневич, Л.А. Любасовская, Р.Н. Василенко, В.К. Сакулин, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, С.Ю. Пчелинцев, А.В. Карлышев, В.А. Самойленко, А.В. Мачулин
Антагонистическая активность консорциума штаммов *Lactobacillus fermentum* BKM B-2793D и *Lactobacillus reuteri* BKM B-3144D, выделенных из женского молока, к мастит-индуцирующим патогенам46

Г.С. Тархнишвили, Г.Д. Капанадзе, И.А. Берзин
Нарушения сердечного ритма при ингаляции бутана 55

А.В. Попков, Г.Н. Филимонова, Н.А. Кононович, Е.Н. Горбач, Д.А. Попков
Морфологическая характеристика мышц голени в условиях высокоскоростного дистракционного остеосинтеза в сочетании с внутрикостным титановым стержнем, напыленным гидроксиапатитом62

ФАРМАКОНУТРИЕНТЫ И СПОРТИВНОЕ ПИТАНИЕ

Т.В. Блинова, Л.А. Страхова, Р.С. Рахманов, С.А. Колесов, Р.С. Хайров, А.В. Тарасов
Улучшение антиоксидантной защиты фармнутриентом, полученным по криогенной технологии74

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

О.А. Зейналов, Т.С. Савинова, В.А. Андрияшина, М.А. Петросян
Синтетические аналоги прогестерона в *in vitro* и *in vivo* моделях80

В.Н. Крылов, Е.П. Лобкаева, Л.В. Ошевенский, О.М. Лабынцева, О.А. Захарова, В.Д. Федотов, Ю.Е. Ананьева, Е.Г. Рохмистрова
Возможность применения импульсного магнитного поля в качестве протектора повреждающего действия гипоксии90

С.В. Радько, С.В. Оковитый, Е.О. Горшкова, М.М. Любишин, Ю.Д. Болотина, И.А. Берзин
Влияние нового производного аминокетанола и дикарбоновых кислот на физическую работоспособность при аэробных тренировочных нагрузках 101

Б.Н. Сельская, Л.А. Мусина, Г.В. Иванова, Ф.Х. Камилов
Влияние интрадермального введения немодифицированного коллагена на пролиферативную активность клеток кожи экспериментальных животных 110

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, R.A. Ageldinov, N.V. Petrova, Yu.V. Fokin, D.V. Khvostov**
Analysis of the gene expression profile NOS2, PDE5A and HIF-1 α by the digital droplet PCR.....4
- I.A. Pomytkin, I.A. Krasil'nikova, V.G. Pinelis, N.N. Karkischenko**
Insulin signaling system in the brain: new target in the treatment of central insulin resistance17
- A.F. Gazizova, E.R. Kurbatov, I.P. Rudakova, A.A. Kurbatova, E.V. Zvereva, A.A. Bobyleva, Yu.V. Fokin**
Search for biologically active compounds in a series of hydrasons of NH-benzoyl-5-iodoantranylic acid.....35

BIOMEDICAL METHODS

- V.M. Abramov, V.S. Khlebnikov, I.V. Kosarev, T.V. Priputnevich, L.A. Lyubasovskaya, R.N. Vasilenko, V.K. Sakulin, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, S.Yu. Pchelintsev, A.V. Karlyshev, V.A. Samojlenko, A.V. Machulin**
Antagonistic activity of a consortium of strains *Lactobacillus fermentum* BKM B-2793D and *Lactobacillus reuteri* BKM B-3144D isolated from human milk to mastitis-inductioning pathogens.....46
- G.S. Tarhnishvili, G.D. Kapanadze, I.A. Berzin**
Heart rhythm disorders of butane inhalation.....55

- A.V. Popkov, G.N. Filimonova, N.A. Kononovich, E.N. Gorbach, D.A. Popkov**
Morphological characteristics of tibial muscles in the conditions of high rate distraction osteosynthesis in combination with intramedullary hydroxyapatite-coated titanium nail62

PHARMACONUTRIENTS AND SPORTS NUTRITION

- T.V. Blinova, L.A. Strakhova, R.S. Rakhmanov, S.A. Kolesov, R.S. Khayrov, A.V. Tarasov**
Improvement of antioxidant protection by nutrition products prepared of using cryogenic technology74

NON-CLINICAL RESEARCHES

- O.A. Zeynalov, T.S. Savinova, V.A. Andryushina, M.A. Petrosyan**
Synthetic analogues of progesterone in *in vitro* and *in vivo* models.....80
- V.N. Krylov, E.P. Lobkaeva, L.V. Oshevenskiy, O.M. Labyntseva, O.A. Zakharova, V.D. Fedotov, Yu.E. Ananieva, E.G. Rohmistrova**
The possibility of applying a pulsed magnetic field as a protector of damage action of hypoxia90
- S.V. Radko, S.V. Okovitiy, E.O. Gorshkova, M.M. Lyubishin, Yu.D. Bolotina, I.A. Berzin**
Effect of a new aminoethanol and dicarboxylic acid derivative on physical performance in aerobic training loads 101
- B.N. Selskaya, L.A. Musina, G.V. Ivanova, F.Kh. Kamilov**
Influence of intradermal administration of unmodified collagen on proliferative activity of skin cells of experimental animals..... 110



Анализ профиля экспрессии генов NOS2, PDE5A и HIF-1 α методом цифровой капельной ПЦР

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

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

Контактная информация: Дуля Максим Сергеевич, mduliya@gmail.com;
Агельдинов Руслан Андреевич, ageldinov@gmail.com

Исследовано влияние продукта выделения мускусных желез кабарги *Moschus moschiferus* путем определения уровней экспрессии генов молекул субъединицы 1 α гипоксией индуцибельного фактора, индуцибельной изоформы синтазы оксида азота и циклического гуанозинмонофосфата – специфической фосфодиэстеразы типа 5A у экспериментальных животных в условиях стресса, вызванного физической нагрузкой. В работе были исследованы биологические материалы (мозг, сердце и легкие) крыс Wistar, получавших изучаемое вещество и подвергавшихся тесту вынужденного плавания с грузом. Профиль экспрессии генов определялся методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции. На фоне введения тестируемых веществ уровни экспрессии изучаемых генов характеризуются ожидаемыми значениями, что демонстрирует ускоренный запуск многофакторных механизмов адаптации организма и усиливает способность тканей переживать неблагоприятные условия при введении активных компонентов мускусных желез кабарги *Moschus moschiferus*.

Ключевые слова: кабарга сибирская *Moschus moschiferus*, мускус, цифровая капельная полимерная цепная реакция, субъединица 1 α гипоксией индуцибельного фактора, индуцибельная синтаза оксида азота, циклический гуанозинмонофосфат – специфическая фосфодиэстераза типа 5A, экспрессия.

Введение

Живые организмы на протяжении всей жизни взаимодействуют с окружающей средой и обеспечивают своё выживание в ней, проявляя стабильность к различного рода изменениям путем адаптации. Адаптация, как известно, – динамический процесс, включающий в себя мониторинг отклонений от нормы, а также проявление надлежащего ответа для корректировки влияния стрессорирующего фактора [1]. Наиболее

существенной, с точки зрения решения повседневных проблем, является физиологическая адаптация, т.к. она демонстрирует ответную реакцию организма на повседневные трудности в течение всей жизни путем поддержания энергетической результативности и установлением оптимального пути для возвращения организма в динамическое равновесие [5]. В исследовательских работах физиологическая адаптация подвергается анализу как стратегия, при

которой различные параметры биологической системы восстанавливаются до значений, предшествующих влиянию, оказанному на изучаемый организм [2]. Адаптацию, как адаптационный ответ, можно постигать на всевозможных уровнях организации жизни (клетка, орган, организм и т.д.). В представленной работе изучено влияние внешних и внутренних факторов на внутриклеточный уровень организации организма. Стоит уделить большой интерес фактору стремительности возвращения к равновесию как одному из наиболее значимых в данном вопросе.

Эволюция позвоночных требовала новых стратегий для обеспечения адекватной доставки молекулярного кислорода и метаболитических субстратов ко всем клеткам. Одним из решений представленной проблемы было формирование системы кровообращения, состоящей из трех основных компонентов:

- «транспортного средства» для транспортировки O₂ (эритроцит);
- системы «шоссе», по которой «транспортное средство» было бы способно перемещаться во все потенциальные места назначения (сосудистая сеть);
- «двигательной силовой установкой» (сердце).

Данная уникальная физиологическая система обеспечивает механизм, снабжающий каждую клетку организма необходимым количеством кислорода и глюкозы для полного удовлетворения ее метаболитических потребностей. Существует также и прямая связь между адаптационными процессами и модификациями, происходящими в сердечно-сосудистой сети, где роль связующего между ними элемента выполняет стресс [8]. Как известно, сердечно-со-

судистая система является одной из важнейших структур у высших организмов. Она объединяет все органы и ткани организма, обеспечивая циркуляцию крови в них. Помимо этого, она способствует поддержанию гомеостаза в динамических условиях окружающей среды. Одним из наиболее существенных для нее факторов является стресс. А одной из значимых систем при стрессе является гуморальная система, влияние которой активно распространяется по всему организму путем циркуляции по сердечно-сосудистой системе. Стресс может быть определен как субъективное восприятие неблагоприятных трансформаций окружающей среды, которые, как правило, приводят к стрессовой реакции, позволяющей адаптироваться к новым условиям жизни. Многообразные стрессовые факторы – в частности, физиологического характера – способны стимулировать активный биохимический отклик, распространяющийся по сердечно-сосудистой системе, проявляя таким образом воздействие на функции многих органов [8].

В проведенном исследовании показателями динамики стабилизации нормальных значений для адаптации к стрессовым условиям были избраны следующие молекулы генов:

гипоксией индуцируемый фактор 1 (HIF-1) является транскрипционным и гетеродимерным фактором, важнейшая функция которого выражается в адаптивном отклике на дефицит кислорода в клетках млекопитающих. Молекула HIF-1 объединяет в себе две макромолекулы, субъединицы 1 α и 1 β (HIF-1 α и HIF-1 β , соответственно). Основная макромолекула накапливается при гипоксических

условиях, и ее экспрессия жёстко регулируется концентрацией клеточного кислорода, в то время как вторая – конститутивно экспрессируется и служит в роли гетеродимеризационного партнера для нескольких других факторов транскрипции. HIF-1 α беспрерывно деградирует в нормоксических условиях с помощью убиквитин-протеасомной системы. Возвращение HIF-1 α к исходным величинам может быть вызвано благополучным восстановлением интенсивности кислорода в ткани [6, 14].

Ген HIF-1 α кодирует макромолекулу, которая [18]:

- проявляет себя через связывание с белковыми комплексами; белковую гетеродимеризационную активность; связывание с последовательностью ДНК и т.д.;
- участвует в процессах острого фазового ответа; клеточного ответа на монооксид углерода и ион кобальта; участвует в пути индуцируемого гипоксией факторов; сигнальном пути фактора роста эндотелия сосудов; mTOR сигнальном пути; артериальном тромбозе и т.д.;
- локализуется в цитоплазме, ядре, цитозоле.

Многие исследования HIF-1 подтверждают то, что данный транскрипционный фактор играет значимую роль в физиологии сердечно-сосудистой системы.

Следующим объектом изучения стал полипептид синтазы оксида азота (NOS). Впервые NOS был описан в качестве эндотелиального релаксирующего фактора, в дальнейшем – стал основным сигнальным устройством, регулирующим практически каждую критическую клеточную функцию, а также мощным медиатором клеточного повреждения в широком диапазоне

условий [10]. Мозг оказался первым богатым источником синтезируемой молекулы NO, что способствовало открытию первой NO-синтазы (нейронная NOS, nNOS или NOS1). Следующая молекула NOS была выделена из макрофагов и известна как **NOS2, или iNOS (индуцибельная NOS)**, потому что она без труда индуцируется во многих тканях с помощью проникающих цитокинов. Последней идентифицированной синтазой представленного типа стала эндотелиальная NO-синтаза, которая известна также как eNOS, или NOS3 [13].

Продукт указанных синтаз – оксид азота. Он представляет собой молекулу «посланника» макрофагов с широким спектром функций во всем организме. Например, в мозге и периферической нервной системе представленное производное играет роль нейромедиатора, данная молекула также косвенно связана с регуляцией гладких мышц, охватывая перистальтику и эрекцию полового члена, также связана с модулированием кровотока и тромбоза. Важнейшим отличием молекулы NOS2 от прочих NOS является то, что ее активность не регулируется изменениями внутриклеточного содержания кальция, и белок может временно индуцироваться при нормальных величинах Ca²⁺, достаточных для полной активации NOS2. iNOS является биологическим демпфером, который проявляется в тканях-мишенях через действия цГМФ, устанавливая уровень реакции на стресс. NOS также выполняет множество существенных физиологических ролей в регуляции функции сердца, охватывая коронарную вазодилатацию, ингибирование тромбоцитов, адгезию

и активацию нейтрофилов, модуляцию сердечной сократительной функции и ингибирующего потребления кислорода сердцем [12].

Ген NOS2 кодирует белок, который [17]:

- проявляется через связывание с актином, β -катенином, кадгерином;
- описан в процессах старения, реконструкции кровеносного сосуда, клеточном ответе на стимул цитокинов;
- участвует в пути передачи сигналов эндотелина, гипоксического индукцибельного фактора, сигнальном пути интерлейкина-12;
- обнаружен в цитоплазме, цитозоле, внеклеточном пространстве.

Циклический гуанозинмонофосфат – специфическая фосфодиэстераза типа 5 (PDE5A) представляет собой фермент из класса фосфодиэстераз. Он встречается в различных тканях, интенсивнее всего наблюдается в сердце, пещеристом теле и сетчатке. Недавно было установлено, что он играет существенную роль в работе сердечно-сосудистой системы. PDE5 представляет собой фермент, который приводит к деградации молекулы цГМФ [7, 15, 16].

Было продемонстрировано, что связывание цГМФ с GAF-A доменом полипептида PDE5A стимулирует ферментативную каталитическую активность примерно в 10 раз, а его блокада, соответственно, ингибирует активность. На основании этого предполагается, что фермент в большинстве своем неактивен в отсутствии связывания с лигандом. Однако, учитывая высокое сродство сайта GAF-A с цГМФ, предполагается, что при нормальных физиологических условиях данный домен будет взаимодейство-

вать с лигандом, что, в свою очередь, будет способствовать проявлению его специфической активности.

Ингибирование PDE5A демонстрирует положительные эффект при повреждении сердца. Излишняя экспрессия данной молекулы способствует ухудшению патологического ремоделирования после того, как мышечные кардиомиоциты испытали инфаркт миокарда. Роль PDE5A в сердечной недостаточности и ее терапии с участием соответствующих ингибиторов были существенными сферами интересов как для лабораторных, так и для клинических исследований. Было продемонстрировано, что специфические ингибиторы PDE5A (силденафил, варденафил, тадалафил и т.д.) улучшают характеристики памяти и/или усиливают синаптическую пластичность и когнитивную функцию на различных моделях животных [9, 11]. Доказано, что угнетение PDE5A ингибирует рост раковых клеток.

Ген PDE5A кодирует белок, который [19]:

- проявляет себя как 3', 5'-циклическая-ГМФ фосфодиэстераза; 3', 5'-циклически-нуклеотидная фосфодиэстераза;
- участвует в развитии нервной системы, положительной регуляции апоптотического процесса, позитивном регулировании хронического воспалительного ответа, пуриновом метаболическом пути;
- экспериментально изучается при эректильной дисфункции, потере слуха;
- обнаружен в цитозоле.

Мускус кабарги *Moschus moschiferus* в широком смысле давно известен во многих странах как природный био-

стимулятор, являющийся основой народных медицинских лекарственных средств. Ему приписывают обширный спектр действия: иммуностимулирующее, регенерационное, противовосанемическое, нейропротекторное, ноотропное, психоэнергизирующее, противоопухолевое. На сегодняшний день доказано влияние на произвольные мышечные сокращения, анальгезирующее и противовоспалительное действия. Согласно последним проведенным исследованиям он способен проявлять антиоксидантные эффекты, чем зарекомендовал себя как потенциальный препарат для профилактики и лечения нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней дыхательной системы и т.д.

Ранее нами было установлено, что в мускусе кабарги содержится более 20-ти различных химических соединений, среди которых значительную долю составляют простые липиды (17-38%), стероидные гормоны (38-47%) и производные андростана (10-20%). Исследования демонстрируют, что наибольшая эффективность влияния мускуса проявляется при введении животным его активных компонентов [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния продукта выделения мускусных желез кабарги путем определения уровней экспрес-

сии генов молекул субъединицы 1 α гипоксией индуцибельного фактора, индуцибельной изоформы синтазы оксида азота и циклического гуанозинмонофосфата – специфической фосфодиэстеразы типа 5А у экспериментальных животных в условиях стресса, вызванного физической нагрузкой, методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR).

Материалы и методы

Объекты исследования и дизайн эксперимента

Исследование проводили на 15-ти белых крысах Wistar обоего пола массой 200-300 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Животных разделили на 5 групп в зависимости от способа введения и вводимого вещества (табл. 1). Условия работы с экспериментальными животными соответствовали Приказу Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и директиве ЕС от 22.09.2010 «По охране животных, используемых в научных целях».

Животные содержались по 6 особей в клетках «Rair Iso System» при температуре воздуха 20-22°C и относительной влажности воздуха 40-60%, световом режиме 12/12, на стандартном комбикорме со свободным доступом к пище

Таблица 1

Дизайн эксперимента

Номер группы	Условия эксперимента (вводимые субстанции, способ введения)
1-2	Активные компоненты мускуса, внутрижелудочно
3-4	Очищенная вода, внутрижелудочно
5	Активные компоненты мускуса, ректально

и водопроводной очищенной воде. Депривация корма осуществлялась за 2 ч до начала теста.

Стрессовые условия создавались с использованием методики «**Вынужденное плавание с грузом**» [4], представляющей собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты. Плавание крыс осуществляли с грузом 10% от массы тела, прикрепленным резиновой лигатурой к кончику хвоста животного. Предварительно массу животных определяли взвешиванием с точностью до 1 г. Моментом окончания эксперимента считали утомление – неспособность всплыть на поверхность воды или погружение на дно более чем на 10 с. Тест проводили в сосудах из оргстекла с внутренним диаметром 30 см и высотой 75 см. Высота столба воды равнялась 60 см, температура воды составляла $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Постановку теста проводили в утренние часы. Предварительно животным вводили мускус кабарги (согласно схеме, табл. 1). В течение 20 мин после проведения теста животных подвергали эвтаназии с помощью эфирного наркоза и осуществляли забор внутренних органов (мозг, легкие и сердце) для последующего анализа. Органы помещали в морозильную камеру до следующего этапа.

Гомогенизация и выделение РНК

Отбирали ткани органов массой 0,1-0,2 г в пробирки объемом 1,5 мл. Далее добавляли 1 мл натрий-фосфатного буфера (pH=7,4) для гомогенизации на механическом гомогенизаторе. После каждой пробы гомогенизатор прочищали и промывали водой и спиртовым р-ром для исключения побоч-

ных контаминаций. Гомогенизированные пробы центрифугировали в течение 5 мин на 13 тыс. об./мин и отбирали в пробирки надосадочную жидкость в объеме 100 мкл. Далее в отобранные аликвоты добавляли реагенты из набора РИБО-сорб («ИнтерЛабСервис», Россия), согласно инструкции. В результате всех манипуляций из каждой пробы получали супернатант, содержащий смесь ДНК и РНК. Все стадии проводили на льду.

Обратная транскрипция на матрице РНК

Полученную ранее надосадочную жидкость из каждой пробы подвергали процессу обратной транскрипции. Данную процедуру проводили с помощью набора реагентов РИВЕРТА-L («ИнтерЛабСервис», Россия) и согласно приложенной к нему инструкции. В результате получили пробы по 20 мкл, содержащие кДНК в ДНК-буфере. Все манипуляции проводили на льду. Готовые пробы кДНК заморозили при температуре не выше -68°C .

Подбор пар «праймеры-зонд»

До постановки теста вынужденного плавания были подобраны системы праймеров и зондов на представленные гены, за исключением HIF-1 α , на который они уже были получены нами в НЦБМТ ФМБА России ранее. С помощью базы данных NCBI были получены данные об изучаемых генах. В программе «Beacon Designer 7» были подобраны праймеры и зонды, с предварительными анализами в «Ensembl» (для выявления участков сшивки экзонов), «BioGPS» (для определения наиболее значимых для анализа тканей), с проверкой полученных систем через «Blast NCBI» (на специфичность подобранных пар). По-

Таблица 2

Праймеры и зонды для ddPCR

Исследуемая мишень	Олигонуклеотидные праймеры и зонды, 5'-3' последовательность	
NOS2	Прямой праймер	GGAACAGTATAAGGCAAAC
	Обратный праймер	CAGAGATTTCTTCAGAGTC
	Флуоресцентный зонд	FAM-CCTTGGAAGAGGAACAAC TACTGCT-BHQ1
PDE5a	Прямой праймер	TGGAGAACAAAAGAAATCA
	Обратный праймер	GAAGGAGATAATAGTGGC
	Флуоресцентный зонд	FAM-TTACTTCCAATGACTGCTGCTCCT-BHQ1

сле аналитического анализа и проверки данные системы были заказаны в фирме “ДНК-синтез” (Россия) (табл. 2).

Постановка цифровой капельной ПЦР

Полученные ранее пробы, содержащие кДНК, были исследованы методом цифровой капельной ПЦР. Амплифи-

кацию с последующим определением уровней экспрессии изучаемых генов проводили с помощью термоциклера C1000 touch и ридера капель QX200 (табл. 3).

Подготовка образцов для ПЦР – соединение исследуемых образцов нуклеиновой кислоты (кДНК), праймеров и

Таблица 3

Состав реакционной смеси для ПЦР и условия амплификации

Состав смеси для ПЦР				
Компонент		Объем на реакцию, мкл	Финальная концентрация	
2x ddPCR Supermix for Probes		10	1x	
20x праймеры и зонд		2	900 nM / 250 Nm	
Анализируемый образец		Вариабельно	до 300 Nm	
Очищенная вода		Вариабельно	-	
Итоговый объем		20	-	
Условия амплификации				
Шаг	Температура, °C	Период	Скорость изменения температуры	Число циклов
Активация энзима	95	10 мин	2°C в сек	1
Денатурация	94	30 с		40
Отжиг	55-65*	1 мин		40
Деактивация энзима	98	10 мин		1
Задержка	4	∞		1

Примечания: * – вариабельный диапазон, зависящий от подобранных праймеров.

зондов (FAM) с супермиксом Bio-Rad для ddPCR, в соответствии с инструкцией, прилагаемой к супермиксу (табл. 3).

Создание капель – загрузка 20 мкл реакции ddPCR в контейнер генератора капель DG8, далее – загрузка контейнера в генератор капель QX200 для разделения образца на капли нанолитрового объема, требуемых для анализа ddPCR.

Проведение ПЦР: капли из контейнера с помощью дозатора помещаются в 96-луночный планшет для ПЦР, который запечатывается с помощью приспособления для заклеивания планшетов PX1.

Считывание капель – загрузка планшета в ридер капель QX200 и запуск программы «QuantaSoft».

Анализ результатов: ридер капель подключается к ноутбуку с запущенным

программным обеспечением «QuantaSoft». Программное обеспечение определяет «положительные» и «отрицательные» капли в каждом образце и представляет в графическом виде по-капельное изменение флуоресценции: доля положительных капель в образце определяет концентрацию мишени в копиях/мкл.

После получения массива данных был проведен оценочный анализ результатов с использованием вышеуказанной программы, а полученные в ней данные были конвертированы для последующего анализа в программе Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Были получены следующие данные (рис. 1-3):

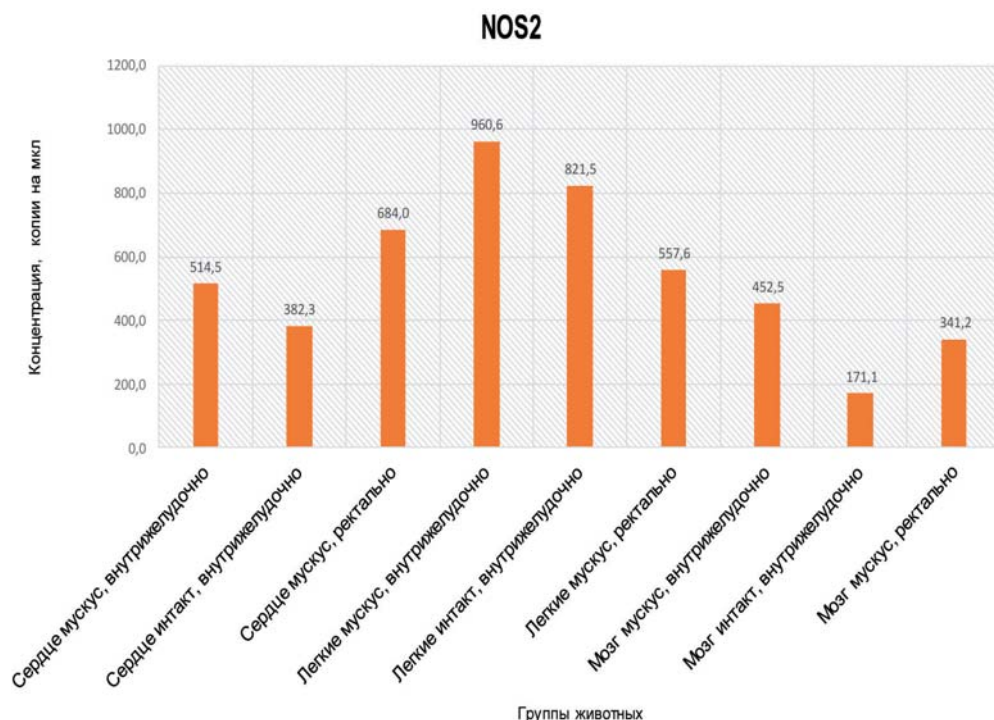


Рис. 1. Результаты анализа экспрессии по гену NOS2.

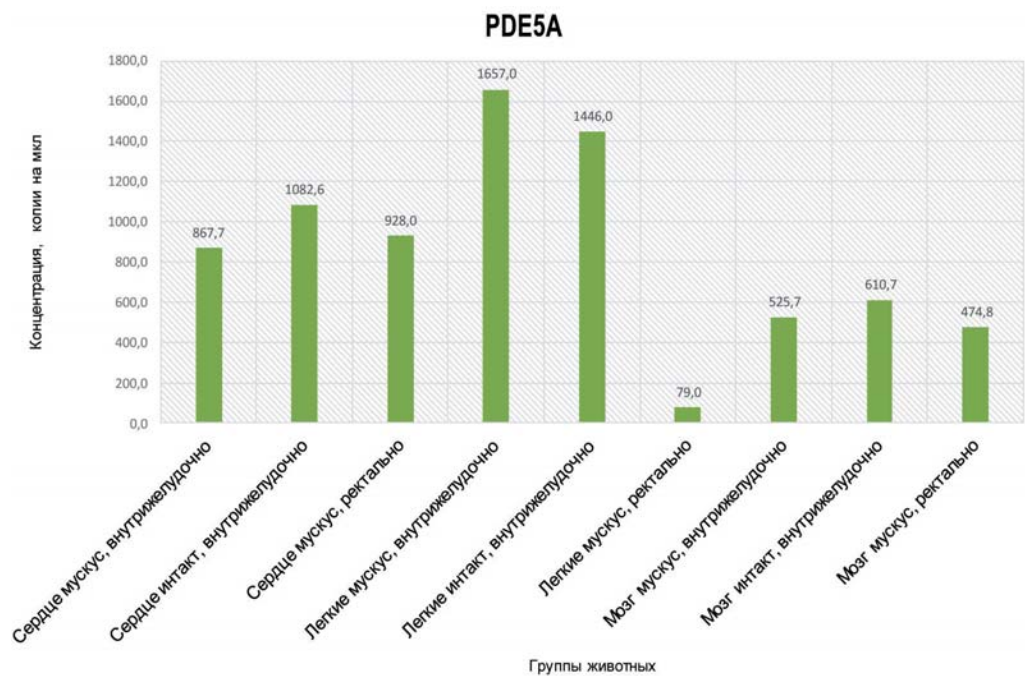


Рис. 2. Результаты анализа экспрессии по гену PDE5A.

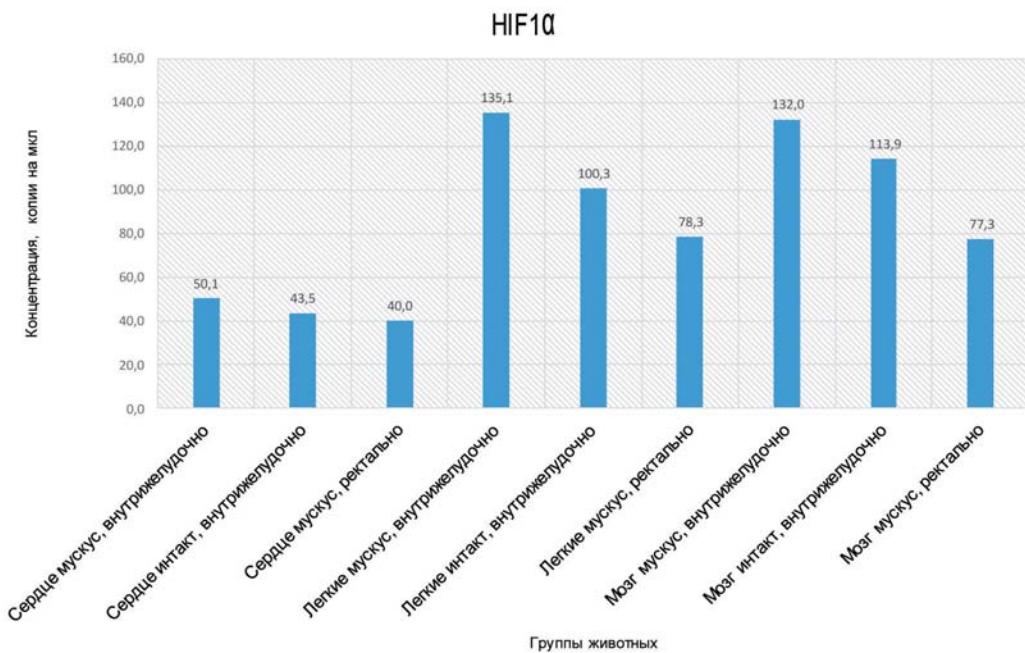


Рис. 3. Результаты анализа экспрессии по гену HIF-1α.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Активные компоненты мускуса лучше проявляются при внутрижелудочном способе введения, ректальное введение демонстрирует более слабый эффект.

2. Уровень экспрессии PDE5A понижается в сердце и мозге, в то время как в легких наблюдается противоположный эффект, но только при внутрижелудочном введении.

3. Уровень экспрессии NOS2 повышается во всех представленных тканях. В тканях мозга уровень экспрессии возрастает по сравнению с интактными образцами. При ректальном введении в легких наблюдается противоположная зависимость.

4. Уровень экспрессии HIF-1 α повышается в тканях более стабильно, без резких проявлений. При внутрижелудочном введении отмечается повышение уровня экспрессии, в то время как при ректальном – противоположная картина.

5. В легких и сердце наблюдается наибольший уровень экспрессии генов PDE5A и NOS2. В мозге и легких похожая картина наблюдается у третьего исследуемого гена – HIF-1 α .

Сравнение методик двух поколений ПЦР-анализа позволяет говорить о том, что система ddPCR, в отличие от real-time PCR, обладает рядом преимуществ:

1) возможность анализа профиля экспрессии гена без использования гена-стандарта;

2) мгновенный подсчет образовавшихся копий на 1 мкл реакции;

3) стабильность ПЦР, связанная с минимизацией контаминации при сборке смеси, использованием уже готового

для постановки микса, а также наличие множества капель исключает возможность получения ошибочных результатов;

4) практически полная автоматизация процессов анализа полученных данных;

5) крайне высокая точность анализа, опирающаяся на положительные и отрицательные результаты от каждой капли из в среднем 20000 шт. и на алгоритм подсчета, заложенный в прилагаемое программное обеспечение.

Выводы

1. Наиболее выраженное положительное влияние мускуса кабарги отмечается при внутрижелудочном введении.

2. Статистически более стабильная картина анализа наблюдается по генам NOS2 и HIF-1 α .

3. Проанализированные ткани одинаково хорошо демонстрируют экспрессию генов.

4. Изучаемое вещество ускоряет адаптацию организма в среднем на 37% по сравнению с интактными образцами.

5. Понижение уровня экспрессии PDE5A свидетельствует о расширении сосудов и прочих подобных эффектах, демонстрируемых ингибиторами данной белковой молекулы.

6. Повышение уровня экспрессии NOS2 демонстрирует ускорение процессов взаимодействия между клетками, способствующих физиологическому восстановлению организма.

7. Повышение уровня экспрессии HIF-1 α показывает ускоренную способность организма использовать встроенные механизмы адаптации.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что:

- активные компоненты мускуса кабарги *Moschus moschiferus* способствуют увеличению скорости адаптации животных (крыс) к стрессовым условиям при физических нагрузках;
- профиль экспрессии генов соответствует предполагаемым уровням, при которых увеличивается способность к перенесению неблагоприятных условий.

Список литературы

1. Агаджанян Н.А., Труханов А.И., Шендеров Б.А. Этюды об адаптации и путях сохранения здоровья. – М.: Изд-во «Сирин». – 2002. – 156 с.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов н/Д: Изд. РГУ. – 1990. – 224 с.
3. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором // Биомедицина. – 2018. – № 1. – С. 19-39.
4. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Фокин Ю.В., Алимкина О.В. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой // Биомедицина. – 2016. – № 4. – С. 34-46.
5. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α как критерий развития гипоксии тканей // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 4-15.
6. Chávez J.C., Agani F., Pichiule P., LaManana J.C. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the brain of rats during chronic hypoxia // J. Appl. Physiol. – 2000. – No. 89(5). – Pp. 1937-1942.
7. Fertel R., Weiss B. Properties and drug responsiveness of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat lung (abstract) // Mol. Pharmacol. – 1976. – No. 12(4). – Pp. 678-687.
8. Garg A., Xu D., Laurin A., Blaber A.P. Physiological interdependence of the cardiovascular and postural control systems under orthostatic stress // Am. J. of physiology. – 2014. – Vol. 307. – No. 2. – Pp. 259-264.
9. Li-Yun Z., Yao Z., Yu-Ren J., Xiong-Jie Z., Dong G. Design, synthesis and biological evaluation of dual acetylcholinesterase and phosphodiesterase 5A inhibitors in treatment for Alzheimer's disease // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – No. 27(17). – Pp. 4180-4184.
10. Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1992. – No. 89(15). – Pp. 6711-6715.
11. Nardoza A., Cabrini M.R. Daily use of phosphodiesterase type 5 inhibitors as prevention for recurrent priapism // Rev. Assoc. Med. Bras. – 2017. – No. 63(8). – Pp. 689-692.
12. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease // Physiological Reviews. – 2007. – No. 87(1). – Pp. 315-424.
13. Porasuphatana S., Weaver J., Rosen G.M. Inducible nitric oxide synthase catalyzes ethanol oxidation to alpha-hydroxyethyl radical and acetaldehyde // Toxicology. – 2006. – No. 223. – Pp. 167-174.
14. Semenza G.L., Agani F., Iyer N., Kotch L., Laughner E., Leung S., Yu A. Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1 // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1999. – No. 874. – Pp. 262-268.
15. Uzunov P., Weiss B. Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. – No. 284(1). – Pp. 220-226.
16. Weiss B. Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase // Adv. Cyclic Nucleotide Res. – 1975. – Vol. 5. – Pp. 195-211.
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24599>
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29560>
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/171115>

References

1. **Agadzhanian N.A., Trukhanov A.I., Shenderov B.A.** Etyudy ob adaptatsii i putyakh sokhraneniya zdorov'ya [Etudes about the adaptation system and ways of maintaining health]. Moscow: Izd-vo «Sirin». 2002. 156 p. (In Russian).
2. **Garkavi L.Kh., Kvakina E.B., Ukolova M.A.** Adaptatsionnyye reaktsii i rezistentnost' organizma [Adaptation reactions and resistance of the body]. Rostov-on-Don: Izd. RGU. 1990. 224 p. (In Russian).
3. **Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lublinsky S.L.** Analiz biologicheskii aktivnykh soyedineniy muskusa kabargi (*Moschus moschiferus*) metodom gazovoy khromatografii s mass-selektivnym detektorom [Analysis of biologically active musk from *Moschus moschiferus* by gas chromatography with mass-selective detector]. Biomedicine. 2018. No. 1. Pp. 19-39. (In Russian).
4. **Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B., Berzin I.A., Fokin Yu.V., Alimkina O.V.** Osobennosti interpretatsii pokazatelej rabotosposobnosti laboratornykh zhivotnykh po plavatel'nykh testam s nagruzkoj [Features of the interpretation of the performance indicators of laboratory animals in swimming tests with load]. Biomedicine. 2016. No. 4. Pp. 34-46. (In Russian).
5. **Shustov E.B., Karkischenko N.N., Dulya M.S.** Ekspressiya gipoksiya-inducibel'nogo faktora HIF1 α kak kriterij razvitiya gipoksii tkanej [Expression of hypoxia-inducible factor HIF-1 α as a criterion for the development of tissue hypoxia]. Biomedicine. 2015. No. 4. Pp. 4-15. (In Russian).
6. **Chávez J.C., Agani F., Pichiule P., LaManna J.C.** Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the brain of rats during chronic hypoxia. J. Appl. Physiol. 2000. No. 89(5). Pp. 1937-1942.
7. **Fertel R., Weiss B.** Properties and drug responsiveness of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat lung (abstract). Mol. Pharmacol. 1976. No. 12(4). Pp. 678-687.
8. **Garg A., Xu D., Laurin A., Blaber A.P.** Physiological interdependence of the cardiovascular and postural control systems under orthostatic stress. Am. J. of physiology. 2014. Vol. 307. No. 2. Pp. 259-264.
9. **Li-Yun Z., Yao Z., Yu-Ren J., Xiong-Jie Z., Dong G.** Design, synthesis and biological evaluation of dual acetylcholinesterase and phosphodiesterase 5A inhibitors in treatment for Alzheimer's disease. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. No. 27(17). Pp. 4180-4184.
10. **Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H.** Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1992. No. 89(15). Pp. 6711-6715.
11. **Nardoza A., Cabrini M.R.** Daily use of phosphodiesterase type 5 inhibitors as prevention for recurrent priapism. Rev. Assoc. Med. Bras. 2017. No. 63(8). Pp. 689-692.
12. **Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L.** Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease. Physiological Reviews. 2007. No. 87(1). Pp. 315-424.
13. **Porasuphatana S., Weaver J., Rosen G.M.** Inducible nitric oxide synthase catalyzes ethanol oxidation to alpha-hydroxyethyl radical and acetaldehyde. Toxicology. 2006. No. 223. Pp. 167-174.
14. **Semenza G.L., Agani F., Iyer N., Kotch L., Laughner E., Leung S., Yu A.** Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1. Annals of the New York Academy of Sciences. 1999. No. 874. Pp. 262-268.
15. **Uzunov P., Weiss B.** Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta. 1972. No. 284(1). Pp. 220-226.
16. **Weiss B.** Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1975. Vol. 5. Pp. 195-211.
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24599>
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29560>
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/171115>

Analysis of the gene expression profile NOS2, PDE5A and HIF-1 α by the digital droplet PCR

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

The effect of the release product of the musk glands of *Moschus moschiferus* was determined by determining the expression levels of the molecules of the 1 α subunit of the hypoxia inducible factor, inducible nitric oxide synthase and cyclic guanosine monophosphate -specific phosphodiesterase type 5A in experimental animals under stress caused by forced activity. The biological materials (brain, heart and lungs) of Wistar rats that received the substance under study and undergone a forced swim test with a cargo were examined in the work. The gene expression profile was determined by droplet digital polymerase chain reaction. Against the background of the introduction of test substances, the expression levels of the studied are characterized by the expected values, which demonstrate the accelerated start of multifactorial mechanisms of adaptation of the organism and amplifies the ability of tissues to experience unfavorable conditions upon administration of active components of the musk glands of *Moschus moschiferus*.

Key words: Siberian musk *Moschus moschiferus*, droplet digital polymerase chain reaction, subunit 1 α of the hypoxia inducible factor, inducible nitric oxide synthase, cyclic guanosine monophosphate - specific phosphodiesterase type 5A, expression.

Инсулиновый рецептор в мозге: новая мишень в лечении центральной инсулиновой резистентности

И.А. Помыткин¹, И.А. Красильникова², В.Г. Пинелис²,
Н.Н. Каркищенко³

¹ – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

² – ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

³ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: к.х.н. Помыткин Игорь Анатольевич, ipomytkin@gmail.ru

Настоящий обзор посвящен сигнальной системе инсулинового рецептора в мозге, которая имеет ряд существенных отличий от периферической системы. В клетках мозга преобладает, а в нейронах – экспрессируется исключительно высокоафинная короткая изоформа А рецептора (IR-A), которая способна связывать не только инсулин, но и инсулиноподобный фактор 2 (IGF-2). IR-A участвует в регуляции синаптической пластичности, росте дендритов и аксонов, в регуляции взрослого нейрогенеза. Инсулиновая система в мозге играет роль в процессах формирования памяти и регуляции пищевого поведения. Нарушения инсулиновой сигнализации приводят к развитию центральной инсулиновой резистентности, наиболее известным проявлением которой является болезнь Альцгеймера. Разработка средств лечения центральной инсулиновой резистентности с учетом специфики инсулиновой сигнализации в мозге является новым многообещающим подходом в терапии заболеваний центральной нервной системы.

Ключевые слова: инсулин, инсулиновый рецептор, центральная нервная система, мозг.

Введение

С открытия глюкозопонижающего действия в 1916 г. инсулин рассматривается как основной гормональный регулятор метаболизма глюкозы в периферических тканях [55]. При этом мозг долгое время считался нечувствительным к инсулину органом. Это мнение было пересмотрено после открытия инсулина и рецепторов инсулина в головном мозге в 1978 г. [34]. Последующие 40 лет исследований показали, что инсулин играет огромную роль в центральной нервной системе (ЦНС). Снижение биологического ответа на инсулин в ЦНС, или центральная инсу-

линовая резистентность, имеет другие проявления в периферических тканях и вносит, например, вклад в нарушения памяти, тревожность, снижение настроения. Недостаточная активация инсулинового рецептора в мозге в ответ на инсулин является фактором центральной инсулиновой резистентности – например, при болезни Альцгеймера.

Цель настоящего обзора – обобщение основных фактов о структуре, свойствах и функциях инсулиновых рецепторов в ЦНС, а также анализ перспектив в лечении центральной инсулиновой резистентности.

Инсулиновый рецептор в ЦНС

Инсулиновый рецептор (IR) – это трансмембранный протеин, относящийся к семейству рецепторных тирозинкиназ. IR состоит из двух белковых α - и двух β -субъединиц, связанных дисульфидными связями [81]. Внеклеточные α -субъединицы имеют сайты связывания инсулина. Цитоплазматическая часть β -субъединиц обладает тирозинкиназной активностью. Рецепторы к инсулину найдены во всех отделах мозга, с наивысшей плотностью в обонятельных луковицах, гипоталамусе, гиппокампе, коре головного мозга, и мозжечке [1, 34, 76]. Инсулиновый рецептор представлен двумя изоформами. Во взрослых периферических тканях (мышцы, печень, почки и жир) низкоафинная изоформа В (IR-B) является основной [57]. В ЦНС преобладает короткая высокоафинная изоформа А (IR-A), которая получается альтернативным сплайсингом экзона 11 и у которой отсутствуют 12 аминокислот, прилегающих к карбоксильному концу α -субъединицы рецептора [54]. Нейроны экспрессируют исключительно высокоафинную изоформу IR-A [27, 28, 35]. Рецепторы обнаруживаются как в соме, так и в периферических участках нейрона, но с наивысшей плотностью – в постсинаптическом пространстве дендритных шипиков, что указывает на важную роль инсулиновой сигнализации в функционировании синапсов [1]. Астроциты экспрессируют обе изоформы, с преобладанием изоформы А [36, 28]. IR-A имеет двукратно повышенную афинность к инсулину и не имеет отрицательной кооперативности при связывании инсулина по сравнению с изоформой В [54, 84]. Это делает

IR-A более эффективным рецептором к инсулину, чем IR-B. Помимо инсулина, IR-A способна связывать инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF2) с физиологической релевантной афинностью [21, 84, 85]. Однако роль IGF2 в активации сигнализации IR-A в ЦНС почти не изучена и доказана только для специфического процесса активации взрослого нейрогенеза в субвентрикулярной зоне мозга. В подавляющем большинстве исследований эффекты IR-A в ЦНС интерпретируются как эффекты инсулина.

Транспорт инсулина в ЦНС

Инсулин поджелудочной железы считается основным источником инсулина в ЦНС. Инсулин поступает в мозг через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) при помощи специализированной транспортной системы [5]. На транспорт могут влиять многие факторы, в т.ч. диета и метаболический статус. Потребление пищи с высоким содержанием насыщенных жиров уменьшает эффективность транспорта и приводит к аномально низкому содержанию инсулина в мозге крыс [30, 39]. Диета с низким содержанием жиров или голодание в течение 48 ч, напротив, улучшают транспорт инсулина через ГЭБ [8, 77]. Ожирение также уменьшает эффективность транспорта инсулина. Это было показано на модели генетического ожирения у крыс Zucker [7]. У людей с висцеральным ожирением также был обнаружен аномально низкий уровень инсулина в церебро-спинальной жидкости [41]. Таким образом, относительный дефицит инсулина в мозге может наблюдаться при метаболическом синдроме и несбалансированной диете «западного» типа.

Синтез инсулина в ЦНС

Мозг сам способен производить инсулин. В ранних работах было показано, что инсулин и С-пептид совместно локализируются в нервных клетках в концентрациях, превышающих соответствующие уровни в крови [22], причем на субклеточном уровне иммунореактивность инсулина и С-пептида ограничиваются клеточной сомой и проксимальными дендритами [23]. Позднее способность клеток мозга производить инсулин в значимых количествах была подвергнута сомнению [3]. Однако результаты самых последних исследований показали, что относительный вклад мозга в производство инсулина может быть даже сравним с вкладом поджелудочной железы. Так, прогениторные нейрональные клетки гиппокампа и обонятельных луковиц производят инсулин на уровне, достаточном, чтобы обеспечить достоверное снижение уровней инсулина и глюкозы в крови после трансплантации этих клеток в

поджелудочную железу диабетическим крысам [45]. Инсулин в ЦНС производят как астроциты, так и нейроны [59, 72], причем секреция инсулина нейронами происходит в ответ на деполяризацию [17, 80]. Продукция инсулина в мозге падает с возрастом и при спорадической болезни Альцгеймера (БА) [26]. Особенно значительное снижение уровней экспрессии и содержания инсулина при БА было обнаружено в гиппокампе, фронтальной коре и гипоталамусе [67].

Эффекты инсулина в мозге

Обычное для периферии влияние инсулина на утилизацию глюкозы и транслокацию транспортера GLUT4 в ЦНС было доказано только для гиппокампа [56, 57]. Инсулин в мозге выполняет множество других функций, неизвестных для периферических тканей (рис.).

В гипоталамусе инсулин участвует в уменьшении выработки глюкозы печенью [60] и является центральным регулятором энергетического гомеостаза [75]. В гиппокампе и коре мозга инсулин

Префронтальная кора:

- Интеграция сенсорной информации
- Когнитивная функция
- Контроль потребления пищи

Гиппокамп:

- Формирование памяти
- Взрослый нейrogenез

Обонятельные луковицы:

- Регуляция чувствительности к пищевым запахам
- Регуляция аппетита и сигнал насыщения

Гипоталамус:

- Контроль продукции глюкозы печенью
- Контроль потребления пищи
- Регуляция энергетического гомеостаза



Рис. Функции инсулинового рецептора в мозге.

является регулятором процессов формирования памяти. В обонятельной системе инсулин выполняет роль сигнала насыщения, подавляя чувствительность к пищевым запахам. Инсулин участвует в регуляции синаптической пластичности [14, 15] и способствует выживанию нейронов [52, 71]. IGF2 также может активировать изоформу А инсулинового рецептора при физиологически релевантных концентрациях [21, 84, 85]. Однако к настоящему времени известен лишь единственный пример такого рода, опосредуемый IGF2/IR-A сигнализацией, а именно – активация деления нейрональных стволовых клеток в субвентрикулярной зоне мозга [88, 89]. Наибольшее число исследований в области центральных эффектов инсулина посвящено регуляции пищевого поведения и процессов формирования памяти.

Инсулин как регулятор пищевого поведения

Постпрandiaльный инсулин играет роль анорексигенного сигнала, или сигнала насыщения. Этот эффект реализуется в двух зонах мозга, обонятельной системе и гипоталамусе. Среди всех структур мозга обонятельные луковицы имеют наивысшую плотность инсулиновых рецепторов, наивысшую активность рецепторной тирозинкиназы, а также наибольшие скорости транспорта и деградации инсулина [4, 6, 37]. Повышение концентрации инсулина после приема пищи играет роль сигнала насыщения и снижает чувствительность к запахам, особенно к пищевым, у здоровых людей [13, 42] и здоровых крыс [1, 38]. Инсулин быстро и обратимо снижает амплитуду ответа на запах на электроофлактограмме [46]. Этот эффект является сложным. Инсулиновый рецептор

IR-A фосфорилирует и, так, снижает активность потенциал-зависимых калиевых каналов Kv1.3 в митральных клетках обонятельных луковиц [25]. Помимо этого, инсулин модулирует ГАМК-эргическую и глутаматэргическую активность в этих клетках [44]. Метаболические нарушения – такие, как хроническое повышение уровня инсулина и ожирение – изменяют восприятие запахов на уровне регуляции Kv1.3 каналов [24]. Ожирение вызывает инсулиновую резистентность и снижает фосфорилирование Kv1.3 в ответ на инсулин [50]. Как результат, крысы Zucker fa/fa с ожирением и выраженной инсулиновой резистентностью имеют более высокую чувствительность к запахам, чем «худые» крысы той же линии [2]. Уровень экспрессии рецепторов IR-A увеличивается при голодании [46] и снижается в условиях потребления пищи с высоким содержанием жиров [47].

Инсулиновые рецепторы экспрессируются в гипоталамусе – как в анорексигенных проопиомеланокортиновых нейронах (РОМС) [53, 83], так и в орексигенных нейронах, выделяющих нейропептид Y (NPY) и агутин-подобный белок AgPR [12, 66]. Инсулин вызывает гиперполяризацию и ингибирование NPY/AgPR секретирующих нейронов путем активации КАТР-каналов, деполяризуя и возбуждая в то же время РОМС-нейроны через активацию канонических каналов TRPC5 (canonical transient receptor potential channel 5) [63, 64]. Таким образом, инсулин подавляет аппетит, действуя согласованно на анорексигенные и орексигенные нейроны гипоталамуса. Нарушения инсулиновой сигнализации наблюдаются при ожирении. Центральное введение инсулина

крысам Zucker fa/fa с ожирением не подавляло секрецию орексигенного пептида NPY, в отличие от «худых» крыс этой линии [66]. В целом, инсулин является сигналом насыщения как в обонятельной системе, так и в гипоталамусе, и его действие направлено на снижение аппетита и уменьшение потребления пищи.

Следует отметить, что ответ на инсулин существенно различается для мужчин и женщин. Введение инсулина назально за 1-2 ч до еды снижало потребление пищи в условиях свободного доступа у мужчин с нормальным весом тела [11]. У женщин инсулин усиливал насыщение и уменьшал потребление пищи только в постпрандиальном состоянии, когда вводился через 30 мин после начала приема пищи [33].

Инсулин как регулятор процессов формирования памяти

Инсулин участвует в регуляции синаптической пластичности коры и гиппокампа, влияя таким образом на память и обучение [51]. Эффекты инсулина на процессы долгосрочной потенциации (LTP) и долгосрочной депрессии (LDP) осуществляются через модуляцию рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [51, 78]. Введение инсулина интраназально здоровым добровольцам вызывало немедленный эффект повышения декларативной памяти у женщин, но не у мужчин [11, 43]. Ежедневное интраназальное введение инсулина в суммарной дозе 160 МЕ/день (4x40 МЕ) в течение 8-ми недель здоровым людям достоверно улучшало некоторые виды памяти как у мужчин, так и у женщин [9, 10]. Введение инсулина интраназально мужчинам с ожирением в течение 8-ми недель в суммарной

дозе 160 МЕ/день достоверно улучшило декларативную память, уменьшило тревожность, снизило уровни АКТГ и кортизола в крови, но не влияло на массу тела и массу жировой ткани [32]. Таким образом, инсулиновая сигнализация играет важную роль в формировании памяти.

Система инсулиновой сигнализации в ЦНС

Система инсулиновой сигнализации в ЦНС включает инсулиновый рецептор, субстраты инсулинового рецептора (IRS) и сигнальные пути, опосредующие ответы клетки на действие инсулина. В ЦНС реализуются как классические сигнальные пути – IR/IRS-1/PI3K/mTOR и IR/IRS-1/Grb2/Raf/Mek/Erk, так и специфические, характерные только для ЦНС. Например, в постсинаптической плотности дендритных шипиков инсулиновый рецептор фосфорилирует необычный субстрат – белок-адаптор IRSp53 [1, 87], который взаимодействует с множеством партнеров, участвующих в регуляции нейрональной функции синапсов, включая F-актин, мембрану, Kank1, Rac1, Cdc42, BAI1, Cypin, DRPLA/Atrophin1, Dynamin, Rps8, Espin, Shank1, Shank3, Spin90, Synaptopodin, Tiam1, PSD-93, PSD-95, Wave-1/2, VASP [40]. Нокаут IRSp53 ведет к снижению плотности дендритных шипиков, а повышение экспрессии IRSp53, напротив, увеличивает плотность и размер шипиков [16]. Нокаутные мыши IRSp53^{-/-} имеют измененный электрофизиологический и поведенческий фенотип, характеризующийся гиперактивностью NMDA-рецепторов, нарушением социального взаимодействия, поведенческой гиперактивностью, а также нарушением когнитивной функ-

ции, выявляемым в лабиринте Морриса и тесте распознавания новых объектов [40]. В целом, вклад сигнального пути инсулин/IR/IRSp53 в синаптогенез и регуляцию когнитивной функции требует дополнительного изучения. Это тем более важно, что точный молекулярный механизм участия инсулина в стабилизации синапсов и формировании памяти до сих пор не известен, хотя его роль в этих процессах хорошо известна. Нарушения инсулиновой сигнализации в ЦНС являются главной причиной центральной инсулиновой резистентности.

Центральная инсулиновая резистентность

Термин «центральная инсулиновая резистентность» определяется как нарушенный биологический ответ на эндогенный или экзогенный инсулин в ЦНС. Этому типу инсулиновой резистентности посвящено множество исследований – в основном, на экспериментальных моделях, но первое прямое доказательство существования этого явления у человека было опубликовано только в 2012 г. [74]. В постмортальных *ex vivo* / *in vitro* исследованиях, выполненных на срезах мозга, пораженного БА, было показано, что одна и та же доза инсулина вызывает достоверно меньший ответ в пораженном мозге, чем в здоровом мозге примерно того же возраста и при той же плотности инсулиновых рецепторов. Снижение ответа выражалось в снижении концентрации активных фосфорилированных компонентов инсулиновой сигнальной системы. Автофосфорилирование рецепторов было снижено на 29-34%, фосфорилирование IRS-1, субстрата IR-A, было снижено на 90%, активация Акт (pS) была снижена на 89%, и активация mTOR(pS) была снижена на

74% [73, 74]. Таким образом, центральная инсулиновая резистентность при БА выражалась в снижении способности к активации инсулинового рецептора и нижележащих сигнальных путей, приводящих к биологическим ответам инсулина в ЦНС. Сниженная активация IR-A является самым первым нарушением и потенциальной терапевтической мишенью для лечения центральной инсулиновой резистентности.

Активация инсулинового рецептора в нейронах

Инсулиновый рецептор принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ. Связывание инсулина (или IGF2) с внеклеточной частью рецептора приводит к автофосфорилированию трех остатков тирозина в активационной петле рецептора, после чего активность тирозинкиназы увеличивается на два порядка и начинается фосфорилирование субстратов инсулинового рецептора, приводящее к запуску сигнальных путей, опосредующих ответы клетки на инсулин [82]. Наличие инсулина (или IGF2) является абсолютным требованием для активации IR-A, однако недавние исследования показали наличие дополнительных механизмов, контролирующих активацию инсулинового рецептора в ЦНС.

Митохондрия контролирует активацию инсулинового рецептора в ЦНС

В 2007 г. было впервые показано, что стимуляция нейронов инсулином приводит к немедленному выбросу митохондриальной перекиси водорода (H_2O_2) [69]. Выброс H_2O_2 достигает максимума в первые 5 с и предшествует автофосфорилированию (активации) инсулинового рецептора [58, 61].

Было показано, что сигнальная H_2O_2 играет роль разрешающего сигнала в активации IR-A [58]. Если магнитуа H_2O_2 -сигнала превышает определенное пороговое значение, то рецептор активируется инсулином. Если величина H_2O_2 -сигнала не достигает этого порогового значения, то IR-A не активируется даже наивысшей дозой инсулина. Такой тип регуляции часто называют «всё или ничего» и интерпретируют как принятие клеткой «судьбоносных» решений (fate cell decision). Биологический смысл такой регуляции в нейронах, по-видимому, связан с ролью инсулина и митохондрий в образовании и функционировании синапсов. Известно, что максимальная плотность инсулиновых рецепторов в нейронах концентрируется в постсинаптической плотности дендритных шипиков [1], и инсулин выбрасывается нейронами в ответ на деполяризацию, связанную с активностью нейронов [17, 80]. Эта же нейрональная активность рекрутирует митохондрии в область шипиков, которые в отсутствие активности бедны митохондриями (менее 10% шипиков имеют митохондрии) [48]. Таким образом, механизм митохондриального контроля активации IR-A может являться фактором, позволяющим локализовать активацию IR-A в пределах только активных синапсов, которые рекрутируют митохондрии, и запрещать активацию в неактивных синапсах.

Наличие механизма митохондриального контроля выявляет особую роль митохондрий в развитии центральной инсулиновой резистентности. Дисфункция митохондрий прямо ведет к потере способности рецепторов активироваться в ответ на инсулин. Ингибиторы ком-

плексов респираторной цепи, разобщители (FCCP), или агенты, снижающие потенциал внутренней мембраны митохондрий, прямо запрещают активацию IR-A в нейронах, снижая выброс сигнальной H_2O_2 в ответ на инсулин [58, 69]. Таким образом, наличие функционально полноценных митохондрий является необходимым условием для активации IR-A в ЦНС.

Сенситизация нейронального инсулинового рецептора

Открытие вышеуказанного механизма открывает перспективы в разработке средств лечения центральной инсулиновой резистентности. Митохондриальный субстрат – сукцинат участвует в генерации сигнальной перекиси водорода в ответ на инсулин [58, 69], поэтому соли янтарной кислоты являются классом соединений, потенциально способных улучшить активацию IR-A. Основная проблема создания эффективных средств на основе сукцинатов связана с их малой биодоступностью и отсутствием механизмов эффективного транспорта через ГЭБ. Тем не менее, одна из янтарнокислых солей (дихолинсукцинат) была идентифицирована по результатам скрининга как соединение, достоверно улучшающее активацию инсулиновых рецепторов в нейронах в ответ на низкие субоптимальные дозы инсулина [58, 69]. Это первая полезная молекула в этом классе, имеющая высокую биодоступность и способная прямо улучшать автофосфорилирование (активацию) инсулинового рецептора в нейронах в ответ на инсулин. Эффективность дихолинсукцината была показана в доклинических исследованиях на экспериментальных моделях БА, сосудистой деменции, че-

репно-мозговой травмы, ишемического инсульта, моделях тревожности и депрессии [18, 19, 20, 62, 68, 70].

Перспективы лечения центральной инсулиновой резистентности

Центральная инсулиновая резистентность необязательно является следствием периферической инсулиновой резистентности, но может иметь место и в отсутствие последней, как это было показано для БА [74]. Тем не менее, коммерчески доступные периферические инсулин-сенситайзеры рассматриваются в числе возможных кандидатов для лечения заболеваний ЦНС. Недавний мета-анализ ($n=544093$) показал, что в целом инсулин-сенситайзеры снижают совокупный относительный риск заболеваемости деменцией у диабетиков на 22% ($p=0,015$) [86], причем, метформин – на 21% ($p=0,064$) и тиазолидиндионы – на 25% ($p=0,05$) [86]. Однако их эффективность в лечении когнитивных нарушений невелика. Метформин в наивысшей дозе 2000 мг в день в течение 12-ти мес. достоверно улучшал вербальную память у лиц с мягкими когнитивными нарушениями ($n=80$) по сравнению с контролем, но только 10% пациентов переносили эту высокую дозу [49]. Тиазолидиндион розиглитазон не дал никаких доказательств эффективности в фазе трех клинических испытаний [31] после обнадеживающих результатов в небольшом исследовании вторичной профилактики когнитивного спада у лиц с ранней БА в отсутствии диабета [79]. Также было показано, что тиазолидиндион пиоглитазон демонстрирует когнитивные и функциональные улучшения и стабилизацию заболевания только у диабетиков с БА [65], но

не оказывает существенного влияния на пациентов с БА без диабета [29]. В целом клинические испытания коммерчески доступных периферических инсулин-сенситайзеров показали их эффективность для снижения риска деменций и лечения нарушений памяти у лиц с диабетом, но не показали какого-либо эффекта у пациентов без диабета.

Лечение центральной инсулиновой резистентности, по-видимому, требует разработки препаратов с учетом специфики инсулиновой сигнализации в ЦНС, в т.ч. с учетом механизма митохондриального контроля активации рецептора. Такие центральные инсулин-сенситайзеры могут быть направлены на улучшение функциональных характеристик митохондрий, участвующих в активации IR-A, или улучшение транспортных функций митохондрий. Эффективность такого типа сенситайзеров уже была показана в экспериментальных исследованиях дихолинсукцината – средства, улучшающего автофосфорилирование (активацию) IR-A в нейронах путем воздействия на вышеуказанный механизм митохондриального контроля.

Синаптическая инсулиновая резистентность является малоизученным, но важным критерием центральной инсулиновой резистентности. Дальнейшее изучение роли необычных сигнальных каскадов (инсулин/IRSp53) в процессах синаптогенеза может стать основой для прогресса в области создания средств лечения заболеваний ЦНС, связанных с нарушениями когнитивной функции, в т.ч. БА.

Работа выполнена при поддержке РФФИ: Грант РФФИ № 15-04-07885. Грант РНФ № 17-15-01487.

Список литературы

1. **Abbott M.A., Wells D.G., Fallon J.R.** The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. Pp. 7300-7308.
2. **Aime P., Hegoburu C., Jaillard T., Degletagne C., Garcia S., Messaoudi B., Thevenet M., Lorsignol A., Duchamp C., Mouly A.M., Julliard A.K.** A physiological increase of insulin in the olfactory bulb decreases detection of a learned aversive odor and abolishes food odor-induced sniffing behavior in rats // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e51227.
3. **Aimé P., Palouzier-Paulignan B., Salem R., Al Koborssy D., Garcia S., Duchamp C., Romestaing C., Julliard A.K.** Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats // *Front. Behav. Neurosci.* 2014. V. 8. P. 326.
4. **Banks W.A.** The source of cerebral insulin // *Eur. J. Pharmacol.* 2004. V. 490. No. 1-3. Pp. 5-12.
5. **Banks W.A., Kastin A.J., Pan W.** Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb // *Peptides.* 1999. V. 20. Pp. 373-378.
6. **Banks W.A., Owen J.B., Erickson M.A.** Insulin in the brain: there and back again // *Pharmacol. Ther.* 2012. V. 136. Pp. 82-93.
7. **Baskin D.G., Porte D.Jr., Guest K., Dorsa D.M.** Regional concentrations of insulin in the rat brain // *Endocrinology.* 1983. V. 112. Pp. 898-903.
8. **Baskin D.G., Stein L.J., Ikeda H., Woods S.C., Figlewicz D.P., Porte D.Jr., Greenwood M.R., Dorsa D.M.** Genetically obese Zucker rats have abnormally low brain insulin content // *Life. Sci.* 1985. V. 36. No. 7. Pp. 627-633.
9. **Begg D.P., Mul J.D., Liu M., Reedy B.M., D'Alessio D.A., Seeley R.J., Woods S.C.** Reversal of diet-induced obesity increases insulin transport into cerebrospinal fluid and restores sensitivity to the anorexic action of central insulin in male rats // *Endocrinology.* 2013. V. 154. No. 3. Pp. 1047-1054.
10. **Benedict C., Hallschmid M., Hatke A., Schultes B., Fehm H.L., Born J., Kern W.** Intranasal insulin improves memory in humans // *Psychoneuroendocrinology.* 2004. V. 29. Pp. 1326-1334.
11. **Benedict C., Hallschmid M., Schmitz K., Schultes B., Ratter F., Fehm H.L., Born J., Kern W.** Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart // *Neuropsychopharmacology.* 2007. V. 32. No. 1. Pp. 239-243.
12. **Benedict C., Kern W., Schultes B., Born J., Hallschmid M.** Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. No. 4. Pp. 1339-1344.
13. **Benoit S.C., Air E.L., Coolen L.M., Strauss R., Jackman A., Clegg D.J., Seeley R.J., Woods S.C.** The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. Pp. 9048-52.
14. **Brunner Y.F., Benedict C., Freiherr J.** Intranasal insulin reduces olfactory sensitivity in normosmic humans // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013. V. 98. Pp. E1626-30.
15. **Cheng C.M., Mervis R.F., Niu S.L., Salem N. Jr., Witters L.A., Tseng V., Reinhardt R., Bondy C.A.** Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth // *J. Neurosci. Res.* 2003. V. 73. No. 1. Pp. 1-9.
16. **Chiu S.L., Cline H.T.** Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function // *Neural. Dev.* 2010. No. 5. P. 7.
17. **Choi J., Ko J., Racz B., Burette A., Lee J.R., Kim S., Na M., Lee H.W., Kim K., Weinberg R.J., Kim E.** Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. Pp. 869-879.
18. **Clarke D.W., Mudd L., Boyd F.T.Jr., Fields M., Raizada M.K.** Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture // *J. Neurochem.* 1986. V. 47. Pp. 831-836.
19. **Cline B.H., Costa-Nunes J.P., Cespuglio R., Markova N., Santos A.I., Bukhman Y.V., Kubatiev A., Steinbusch H.W., Lesch K.P., Strekalova T.** Dicholine succinate, the neuronal insulin sensitizer, normalizes behavior, REM sleep, hippocampal pGSK3 beta and mRNAs of NMDA receptor subunits in mouse models of depression // *Front. Behav. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 37.
20. **Cline B.H., Steinbusch H.W., Malin D., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Cespuglio R., Strekalova T.** The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2 // *BMC Neurosci.* 2012. V. 13. P. 110.
21. **Costa-Nunes J.P., Cline B.H., Araújo-Correia M., Valença A., Markova N., Dolgov O.,**

- Kubatiev A., Yeritsyan N., Steinbusch H.W., Strekalova T.* Animal models of depression and drug delivery with food as an effective dosing method: evidences from studies with celecoxib and dicholine succinate // *Biomed. res. int.* 2015. V. 2015. P. 596126.
22. *Denley A., Bonython E.R., Booker G.W., Cosgrove L.J., Forbes B.E., Ward C.W., Wallace J.C.* Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR // *Mol. Endocrinol.* 2004. V. 18. Pp. 2502-2512.
23. *Dorn A., Bernstein H.G., Rinne A., Ziegler M., Hahn H.J., Ansorge S.* Insulin- and glucagonlike peptides in the brain // *Anat. Rec.* 1983. V. 207. No. 1. Pp. 69-77.
24. *Dorn A., Rinne A., Bernstein H.G., Hahn H.J., Ziegler M.* Insulin and C-peptide in human brain neurons (insulin / C-peptide / brain peptides / immunohistochemistry / radioimmunoassay) // *J. Hirnforsch.* 1983. V. 24. No. 5. Pp. 495-499.
25. *Fadool D.A., Tucker K., Pedarzani P.* Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel // *PLoS One.* 2011. V. 6. No. 9. P. e24921.
26. *Fadool D.A., Tucker K., Phillips J.J., Simmen J.A.* Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3 // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 83. Pp. 2332-2348.
27. *Frölich L., Blum-Degen D., Bernstein H.G., Engelsberger S., Humrich J., Laufer S., Muschner D., Thalheimer A., Türk A., Hoyer S., Zöchling R., Boissl K.W., Jellinger K., Riederer P.* Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease // *J. Neural. Transm.* 1998. V. 105. No. 4-5. Pp. 423-438.
28. *Gammeltoft S., Fehlmann M., Van Obberghen E.* Insulin receptors in the mammalian central nervous system: binding characteristics and subunit structure // *Biochimie.* 1985. V. 67. No. 10-11. Pp. 1147-1153.
29. *Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Morgan S.V., Simpson J.E., Owens H., Vazquez-Villaseñor I., Heath P.R., Romero I.A., Ince P.G., Wharton S.B.* Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors // *Mol. Brain.* 2015. No. 8. P. 51.
30. *Geldmacher D.S., Fritsch T., McClendon M.J., Landreth G.* A randomized pilot clinical trial of the safety of pioglitazone in treatment of patients with Alzheimer disease // *Arch. Neurol.* 2011. V. 68. No. 1. Pp. 45-50.
31. *Gerozissis K., Rouch C., Lemierre S., Nicolaidis S., Orosco M.* A potential role of central insulin in learning and memory related to feeding. A potential role of central insulin in learning and memory related to feeding // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2001. V. 21. No. 4. Pp. 389-401.
32. *Gold M., Alderton C., Zvartau-Hind M., Egginton S., Saunders A.M., Irizarry M., Craft S., Landreth G., Linnamagi U., Sawchak S.* Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate alzheimer's disease: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2010. V. 30. Pp. 131-146.
33. *Hallschmid M., Benedict C., Schultes B., Born J., Kern W.* Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling // *Int. J. Obes.* 2008. V. 32. No. 2. Pp. 275-282.
34. *Hallschmid M., Higgs S., Thienel M., Ott V., Lehnert H.* Postprandial administration of intranasal insulin intensifies satiety and reduces intake of palatable snacks in women // *Diabetes.* 2012. V. 61. Pp. 782-789.
35. *Havrankova J., Roth J., Brownstein M.* Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat // *Nature.* 1978. V. 272. Pp. 827-829.
36. *Heidenreich K.A., Zahniser N.R., Berhanu P., Brandenburg D., Olefsky J.M.* Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. No. 14. Pp. 8527-8530.
37. *Heni M., Hennige A.M., Peter A., Siegel-Axel D., Ordelheide A.M., Krebs N., et al.* Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes // *PLoS One.* 2011. V. 6. No. 6. P. e21594.
38. *Hill J.M., Lesniak M.A., Pert C.B., Roth J.* Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas // *Neuroscience.* 1986. V. 17. No. 4. Pp. 1127-1138.
39. *Julliard A.K., Chaput M.A., Apelbaum A., Aime P., Mahfouz M., Duchamp-Viret P.* Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation // *Behav. Brain. Res.* 2007. V. 183. Pp. 123-129.

40. **Kaiyala K.J., Prigeon R.L., Kahn S.E., Woods S.C., Schwartz M.W.** Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs // *Diabetes*. 2000. V. 49. No. 9. Pp. 1525-1533.
41. **Kang J., Park H., Kim E.** IRSp53/BAIAP2 in dendritic spine development, NMDA receptor regulation, and psychiatric disorders // *Neuropharmacology*. 2016. V. 100. Pp. 27-39.
42. **Kern W., Benedict C., Schultes B., Plohr F., Moser A., Born J., Fehm H.L., Hallschmid M.** Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans // *Diabetologia*. 2006. V. 49. No. 11. Pp. 2790-2792.
43. **Ketterer C., Heni M., Thamer C., Herzberg-Schafer S.A., Haring H.U., Fritsche A.** Acute, short-term hyperinsulinemia increases olfactory threshold in healthy subjects // *Int. J. Obes*. 2011. V. 35. Pp. 1135-1138.
44. **Krug R., Benedict C., Born J., Hallschmid M.** Comparable sensitivity of postmenopausal and young women to the effects of intranasal insulin on food intake and working memory // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2010. V. 95. No. 12. Pp. E468-472.
45. **Kuczewski N., Fourcaud-Trocmé N., Savigner A., Thevenet M., Aimé P., Garcia S., Duchamp-Viret P., Palouzier-Paulignan B.** Insulin modulates network activity in olfactory bulb slices: impact on odour processing // *J. Physiol*. 2014. V. 592. No. 13. Pp. 2751-69.
46. **Kuwabara T., Kagalwala M.N., Onuma Y., et al.** Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb // *EMBO Mol. Med*. 2011. V. 3. Pp. 742-754.
47. **Lacroix M.C., Badonnel K., Meunier N., Tan F., Schlegel-Le Poupon C., Durieux D., Monnerie R., Baly C., Congar P., Salesse R., Caillol M.** Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation // *J. Neuroendocrinol*. 2008. V. 20. No. 10. Pp. 1176-1190.
48. **Lacroix M.C., Caillol M., Durieux D., Monnerie R., Grebert D., Pellerin L., Repond C., Tolle V., Zizzari P., Baly C.** Long-lasting metabolic imbalance related to obesity alters olfactory tissue homeostasis and impairs olfactory-driven behaviors // *Chem. Senses*. 2015. V. 40. No. 8. Pp. 537-556.
49. **Li Z., Okamoto K., Hayashi Y., Sheng M.** The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses // *Cell*. 2004. V. 119. Pp. 873-887.
50. **Luchsinger J.A., Perez T., Chang H., Mehta P., Steffener J., Pradabhan G., Ichise M., Manly J., Devanand D.P., Bagiella E.** Metformin in amnesic mild cognitive impairment: results of a pilot randomized placebo controlled clinical trial // *J. Alzheimers. Dis*. 2016. V. 51. No. 2. Pp. 501-514.
51. **Marks D.R., Tucker K., Cavallin M.A., Mast T.G., Fadool D.A.** Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors // *J. Neurosci*. 2009. V. 29. No. 20. Pp. 6734-6751.
52. **McNay E.C., Recknagel A.K.** Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes // *Neurobiol. Learn. Mem*. 2011. V. 96. No. 3. Pp. 432-442.
53. **Mielke J.G., Taghibiglou C., Wang Y.T.** Endogenous insulin signaling protects cultured neurons from oxygen-glucose deprivation-induced cell death // *Neuroscience*. 2006. V. 143. No. 1. Pp. 165-173.
54. **Morton G.J., Cummings D.E., Baskin D.G., Barsh G.S., Schwartz M.W.** Central nervous system control of food intake and body weight // *Nature*. 2006. V. 443. Pp. 289-295.
55. **Mosthaf L., Grako K., Dull T.J., Coussens L., Ullrich A., McClain D.A.** Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing // *EMBO J*. 1990. V. 9. No. 8. Pp. 2409-2413.
56. **Paulesco N.C.** Recherche sur le rôle du pancréas dans l'assimilation nutritive // *Archives Internationales de Physiologie*. 1921. V. 17. Pp. 85-103.
57. **Pearson-Leary J., Jahagirdar V., Sage J., McNay E.C.** Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4 // *Behav. Brain. Res*. 2018. V. 338. Pp. 32-39.
58. **Pearson-Leary J., McNay E.C.** Novel roles for the insulin-regulated glucose transporter-4 in hippocampally dependent memory // *J. Neurosci*. 2016. V. 36. No. 47. Pp. 11851-64.
59. **Persiyantseva N.A., Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Gorbacheva L.R., Pinelis V.G., Pomytkin I.A.** Mitochondrial H₂O₂ as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons // *J. Mol. Signal*. 2013. V. 8. No. 1. P. 11.

60. Pitt J., Wilcox K.C., Tortelli V., Diniz L.P., Oliveira M.S., Dobbins C., Yu X.W., Nandamuri S., Gomes F.C.A., DiNunno N., Viola K.L., De Felice F.G., Ferreira S.T., Klein W.L. Neuroprotective astrocyte-derived insulin/IGF-1 stimulate endocytic processing and extracellular release of neuron-bound A β oligomers // *Mol. Biol. Cell.* 2017. pii: mbc. E17-06-0416.
61. Plum L., Schubert M., Bruning J.C. The role of insulin receptor signaling in the brain // *Trends. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 16. Pp. 59-65.
62. Pomytkin I.A. H₂O₂ signalling pathway: A possible bridge between insulin receptor and mitochondria // *Curr. Neuropharmacol.* 2012. V. 10. No. 4. Pp. 311-320.
63. Pomytkin I.A., Semenova N.A. Study of the effect of preconditioning with succinic acid salt of choline (1:2) on the disturbances of energy metabolism in the brain during ischemia by ³¹P NMR in vivo // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2005. V. 403. Pp. 289-292.
64. Qiu J., Wagner E.J., Ronnekleiv O.K., Kelly M.J. Insulin and leptin excite anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of TRPC5 channels // *J. Neuroendocrinol.* 2018. V. 30. No. 2.
65. Qiu J., Zhang C., Borgquist A., Nestor C.C., Smith A.W., Bosch M.A., Ku S., Wagner E.J., Ronnekleiv O.K., Kelly M.J. Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels // *Cell. Metab.* 2014. V. 19. Pp. 682-693.
66. Sato T., Hanyu H., Hirao K., Kanetaka H., Sakurai H., Iwamoto T. Efficacy of ppar-gamma agonist pioglitazone in mild alzheimer disease // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. Pp. 1626-1633.
67. Schwartz M.W., Marks J.L., Sipols A.J., Baskin D.G., Woods S.C., Kahn S.E., Porte D. Jr. Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats // *Endocrinology.* 1991. V. 128. Pp. 2645-47.
68. Steen E., Terry B.M., Rivera E.J., et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – Is this type 3 diabetes? // *J. Alzheimers. Dis.* 2005. V. 7. Pp. 63-80.
69. Storozheva Z.I., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Semenova N.A., Zakharova E.I., Pomytkin I.A. Dicholine salt of succinic acid, a neuronal insulin sensitizer, ameliorates cognitive deficits in rodent models of normal aging, chronic cerebral hypoperfusion, and beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia // *BMC Pharmacol.* 2008. V. 8. P. 1.
70. Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Pomytkin I.A. Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons // *BMC Neurosci.* 2007. V. 8. P. 84.
71. Strekalova T., Costa-Nunes J.P., Veniaminova E., Kubatiev A., Lesch K.P., Chekhonin V.P., Evans M.C., Steinbusch H.W. Insulin receptor sensitizer, dicholine succinate, prevents both Toll-like receptor 4 (TLR4) upregulation and affective changes induced by a high-cholesterol diet in mice // *J. Affect. Disord.* 2016. V. 196. Pp. 109-116.
72. Sun X., Yao H., Douglas R.M., Gu X.Q., Wang J., Haddad G.G. Insulin/PI3K signaling protects dentate neurons from oxygen-glucose deprivation in organotypic slice cultures // *J. Neurochem.* 2010. V. 112. No. 2. Pp. 377-388.
73. Takano K., Koarashi K., Kawabe K., Itakura M., Nakajima H., Moriyama M., Nakamura Y. Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid β // *Neurochem. Int.* 2017. pii: S0197-0186(17)30253-X.
74. Talbot K., Wang H.Y. The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease // *Alzheimers. Dement.* 2014. V.10 (1 Suppl). Pp. S12-25.
75. Talbot K., Wang H.Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., Fuino R.L., Kawaguchi K.R., Samoyedny A.J., Wilson R.S., Arvanitakis Z., Schneider J.A., Wolf B.A., Bennett D.A., Trojanowski J.Q., Arnold S.E. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. No. 4. Pp. 1316-38.
76. Timper K., Brüning J.C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity // *Dis. Model. Mech.* 2017. V. 10. No. 6. Pp. 679-689.
77. Unger J., McNeill T.H., Moxley R.T. 3rd, White M., Moss A., Livingston J.N. Distribution

- of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain // *Neuroscience*. 1989. V. 31. No. 1. Pp. 143-157.
78. **Urayama A., Banks W.A.** Starvation and triglycerides reverse the obesity-induced impairment of insulin transport at the blood-brain barrier // *Endocrinology*. 2008. V. 149. No.7. Pp. 3592-3597.
 79. **van der Heide L.P., Ramakers G.M., Smidt M.P.** Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive // *Prog. Neurobiol.* 2006. V. 79. Pp. 205-221.
 80. **Watson G.S., Cholerton B.A., Reger M.A., Baker L.D., Plymate S.R., Asthana S., Fishel M.A., Kulstad J.J., Green P.S., Cook D.G., Kahn S.E., Keeling M.L., Craft S.** Preserved cognition in patients with early alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: A preliminary study // *Am. J. Geriatr. Psychiatry*. 2005. V. 13. Pp. 950-958.
 81. **Wei L.T., Matsumoto H., Rhoads D.E.** Release of immunoreactive insulin from rat brain synaptosomes under depolarizing conditions // *J. Neurochem*. 1990. V. 54. Pp. 1661-65.
 82. **White M.F., Kahn C.R.** The insulin signaling system // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. No. 1. Pp. 1-4.
 83. **Wilden P.A., Kahn C.R., Siddle K., White M.F.** Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. No. 23. Pp. 16660-68.
 84. **Xu A.W., Kaelin C.B., Takeda K., Akira S., Schwartz M.W., Barsh G.S.** PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. Pp. 951-958.
 85. **Yamaguchi Y., Flier J.S., Yokota A., Benecke H., Backer J.M., Moller D.E.** Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells // *Endocrinology*. 1991. V. 129. Pp. 2058-66.
 86. **Yamaguchi Y., Flier J.S., Benecke H., Ransil B.J., Moller D.E.** Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor // *Endocrinology*. 1993. V. 132. Pp. 1132-38.
 87. **Ye F., Luo Y.J., Xiao J., Yu N.W., Yi G.** Impact of insulin sensitizers on the incidence of dementia: A meta-analysis // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2016. V. 41. No. 5-6. Pp. 251-260.
 88. **Yeh T.C., Ogawa W., Danielsen A.G., Roth R.A.** Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. Pp. 2921-28.
 89. **Ziegler A.N., Chidambaram S., Forbes B.E., Wood T.L., Levison S.W.** Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-II analogs with enhanced insulin receptor-a binding affinity promote neural stem cell expansion // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. Pp. 4626-33.
 90. **Ziegler A.N., et al.** IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors // *Stem. Cells*. 2012. V. 30. Pp. 1265-76.

References

1. **Abbott M.A., Wells D.G., Fallon J.R.** The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J. Neurosci.* 1999. V. 19. Pp. 7300-7308.
2. **Aime P., Hegoburu C., Jaillard T., Degletagne C., Garcia S., Messaoudi B., Thevenet M., Lorsignol A., Duchamp C., Mouly A.M., Julliard A.K.** A physiological increase of insulin in the olfactory bulb decreases detection of a learned aversive odor and abolishes food odor-induced sniffing behavior in rats. *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e51227.
3. **Aimé P., Palouzier-Paulignan B., Salem R., Al Koborssy D., Garcia S., Duchamp C., Romestaing C., Julliard A.K.** Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats. *Front. Behav. Neurosci.* 2014. V. 8. P. 326.
4. **Banks W.A.** The source of cerebral insulin. *Eur. J. Pharmacol.* 2004. V. 490. No. 1-3. Pp. 5-12.
5. **Banks W.A., Kastin A.J., Pan W.** Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides*. 1999. V. 20. Pp. 373-378.
6. **Banks W.A., Owen J.B., Erickson M.A.** Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol. Ther.* 2012. V. 136. Pp. 82-93.
7. **Baskin D.G., Porte D.Jr., Guest K., Dorsa D.M.** Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology*. 1983. V. 112. Pp. 898-903.
8. **Baskin D.G., Stein L.J., Ikeda H., Woods S.C., Figlewicz D.P., Porte D.Jr., Greenwood M.R., Dorsa D.M.** Genetically obese Zucker rats have abnormally low brain insulin content. *Life. Sci.* 1985. V. 36. No. 7. Pp. 627-633.
9. **Begg D.P., Mul J.D., Liu M., Reedy B.M., D'Alessio D.A., Seeley R.J., Woods S.C.** Reversal of diet-induced obesity increases insulin transport into cerebrospinal fluid and

- restores sensitivity to the anorexic action of central insulin in male rats. *Endocrinology*. 2013. V. 154. No. 3. Pp. 1047-1054.
10. **Benedict C., Hallschmid M., Hatke A., Schultes B., Fehm H.L., Born J., Kern W.** Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 2004. V. 29. Pp. 1326-1334.
11. **Benedict C., Hallschmid M., Schmitz K., Schultes B., Ratter F., Fehm H.L., Born J., Kern W.** Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacology*. 2007. V. 32. No. 1. Pp. 239-243.
12. **Benedict C., Kern W., Schultes B., Born J., Hallschmid M.** Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. No. 4. Pp. 1339-1344.
13. **Benoit S.C., Air E.L., Coolen L.M., Strauss R., Jackman A., Clegg D.J., Seeley R.J., Woods S.C.** The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* 2002. V. 22. Pp. 9048-52.
14. **Brunner Y.F., Benedict C., Freiherr J.** Intranasal insulin reduces olfactory sensitivity in normosmic humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013. V. 98. Pp. E1626-30.
15. **Cheng C.M., Mervis R.F., Niu S.L., Salem N. Jr., Witters L.A., Tseng V., Reinhardt R., Bondy C.A.** Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J. Neurosci. Res.* 2003. V. 73. No. 1. Pp. 1-9.
16. **Chiu S.L., Cline H.T.** Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural. Dev.* 2010. No. 5. P. 7.
17. **Choi J., Ko J., Racz B., Burette A., Lee J.R., Kim S., Na M., Lee H.W., Kim K., Weinberg R.J., Kim E.** Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J. Neurosci.* 2005. V. 25. Pp. 869-879.
18. **Clarke D.W., Mudd L., Boyd F.T.Jr., Fields M., Raizada M.K.** Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. *J. Neurochem.* 1986. V. 47. Pp. 831-836.
19. **Cline B.H., Costa-Nunes J.P., Cespuglio R., Markova N., Santos A.I., Bukhman Y.V., Kubatiev A., Steinbusch H.W., Lesch K.P., Strekalova T.** Dicholine succinate, the neuronal insulin sensitizer, normalizes behavior, REM sleep, hippocampal pGSK3 beta and mRNAs of NMDA receptor subunits in mouse models of depression. *Front. Behav. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 37.
20. **Cline B.H., Steinbusch H.W., Malin D., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Cespuglio R., Strekalova T.** The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2. *BMC Neurosci.* 2012. V. 13. P. 110.
21. **Costa-Nunes J.P., Cline B.H., Araújo-Correia M., Valença A., Markova N., Dolgov O., Kubatiev A., Yeritsyan N., Steinbusch H.W., Strekalova T.** Animal models of depression and drug delivery with food as an effective dosing method: evidences from studies with celecoxib and dicholine succinate. *Biomed. res. int.* 2015. V. 2015. P. 596126.
22. **Denley A., Bonython E.R., Booker G.W., Cosgrove L.J., Forbes B.E., Ward C.W., Wallace J.C.** Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol. Endocrinol.* 2004. V. 18. Pp. 2502-2512.
23. **Dorn A., Bernstein H.G., Rinne A., Ziegler M., Hahn H.J., Ansorge S.** Insulin- and glucagonlike peptides in the brain. *Anat. Rec.* 1983. V. 207. No. 1. Pp. 69-77.
24. **Dorn A., Rinne A., Bernstein H.G., Hahn H.J., Ziegler M.** Insulin and C-peptide in human brain neurons (insulin / C-peptide / brain peptides / immunohistochemistry / radioimmunoassay). *J. Hirnforsch.* 1983. V. 24. No. 5. Pp. 495-499.
25. **Fadool D.A., Tucker K., Pedarzani P.** Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel. *PLoS One*. 2011. V. 6. No. 9. P. e24921.
26. **Fadool D.A., Tucker K., Phillips J.J., Simmen J.A.** Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J. Neurophysiol.* 2000. V. 83. Pp. 2332-2348.
27. **Frölich L., Blum-Degen D., Bernstein H.G., Engelsberger S., Humrich J., Laufer S., Muschner D., Thalheimer A., Türk A., Hoyer S., Zöchling R., Boissl K.W., Jellinger K., Riederer P.** Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 1998. V. 105. No. 4-5. Pp. 423-438.

28. *Gammeltoft S., Fehlmann M., Van Obberghen E.* Insulin receptors in the mammalian central nervous system: binding characteristics and subunit structure. *Biochimie*. 1985. V. 67. No. 10-11. Pp. 1147-1153.
29. *Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Morgan S.V., Simpson J.E., Owens H., Vazquez-Villaseñor I., Heath P.R., Romero I.A., Ince P.G., Wharton S.B.* Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. *Mol. Brain*. 2015. No. 8. P. 51.
30. *Geldmacher D.S., Fritsch T., McClendon M.J., Landreth G.* A randomized pilot clinical trial of the safety of pioglitazone in treatment of patients with Alzheimer disease. *Arch. Neurol*. 2011. V. 68. No. 1. Pp. 45-50.
31. *Gerozissis K., Rouch C., Lemierre S., Nicolaidis S., Orosco M.* A potential role of central insulin in learning and memory related to feeding. A potential role of central insulin in learning and memory related to feeding. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2001. V. 21. No. 4. Pp. 389-401.
32. *Gold M., Alderton C., Zvartau-Hind M., Egginton S., Saunders A.M., Irizarry M., Craft S., Landreth G., Linnamagi U., Sawchak S.* Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate alzheimer's disease: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*. 2010. V. 30. Pp. 131-146.
33. *Hallschmid M., Benedict C., Schultes B., Born J., Kern W.* Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int. J. Obes*. 2008. V. 32. No. 2. Pp. 275-282.
34. *Hallschmid M., Higgs S., Thienel M., Ott V., Lehnert H.* Postprandial administration of intranasal insulin intensifies satiety and reduces intake of palatable snacks in women. *Diabetes*. 2012. V. 61. Pp. 782-789.
35. *Havrankova J., Roth J., Brownstein M.* Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978. V. 272. Pp. 827-829.
36. *Heidenreich K.A., Zahniser N.R., Berhanu P., Brandenburg D., Olefsky J.M.* Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *J. Biol. Chem*. 1983. V. 258. No. 14. Pp. 8527-8530.
37. *Heni M., Hennige A.M., Peter A., Siegel-Axel D., Ordelheide A.M., Krebs N., et al.* Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS One*. 2011. V. 6. No. 6. P. e21594.
38. *Hill J.M., Lesniak M.A., Pert C.B., Roth J.* Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience*. 1986. V. 17. No. 4. Pp. 1127-1138.
39. *Julliard A.K., Chaput M.A., Apelbaum A., Aime P., Mahfouz M., Duchamp-Viret P.* Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav. Brain. Res*. 2007. V. 183. Pp. 123-129.
40. *Kaiyala K.J., Prigeon R.L., Kahn S.E., Woods S.C., Schwartz M.W.* Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes*. 2000. V. 49. No. 9. Pp. 1525-1533.
41. *Kang J., Park H., Kim E.* IRSp53/BAIAP2 in dendritic spine development, NMDA receptor regulation, and psychiatric disorders. *Neuropharmacology*. 2016. V. 100. Pp. 27-39.
42. *Kern W., Benedict C., Schultes B., Plohr F., Moser A., Born J., Fehm H.L., Hallschmid M.* Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia*. 2006. V. 49. No. 11. Pp. 2790-2792.
43. *Ketterer C., Heni M., Thamer C., Herzberg-Schafer S.A., Haring H.U., Frutische A.* Acute, short-term hyperinsulinemia increases olfactory threshold in healthy subjects. *Int. J. Obes*. 2011. V. 35. Pp. 1135-1138.
44. *Krug R., Benedict C., Born J., Hallschmid M.* Comparable sensitivity of postmenopausal and young women to the effects of intranasal insulin on food intake and working memory. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2010. V. 95. No. 12. Pp. E468-472.
45. *Kuczewski N., Fourcaud-Trocmé N., Savigner A., Thevenet M., Aimé P., Garcia S., Duchamp-Viret P., Palouzier-Paulignan B.* Insulin modulates network activity in olfactory bulb slices: impact on odour processing. *J. Physiol*. 2014. V. 592. No. 13. Pp. 2751-69.
46. *Kuwabara T., Kagawala M.N., Onuma Y., et al.* Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol. Med*. 2011. V. 3. Pp. 742-754.
47. *Lacroix M.C., Badonnel K., Meunier N., Tan F., Schlegel-Le Poupon C., Durieux D., Monnerie R., Baly C., Congar P., Salesse R., Caillol M.* Expression of insulin system in the

- olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J. Neuroendocrinol.* 2008. V. 20. No. 10. Pp. 1176-1190.
48. **Lacroix M.C., Caillol M., Durieux D., Monnerie R., Grebert D., Pellerin L., Repond C., Tolle V., Zizzari P., Baly C.** Long-lasting metabolic imbalance related to obesity alters olfactory tissue homeostasis and impairs olfactory-driven behaviors. *Chem. Senses.* 2015. V. 40. No. 8. Pp. 537-556.
 49. **Li Z., Okamoto K., Hayashi Y., Sheng M.** The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell.* 2004. V. 119. Pp. 873-887.
 50. **Luchsinger J.A., Perez T., Chang H., Mehta P., Steffener J., Pradabhan G., Ichise M., Manly J., Devanand D.P., Bagiella E.** Metformin in amnesic mild cognitive impairment: results of a pilot randomized placebo controlled clinical trial. *J. Alzheimers. Dis.* 2016. V. 51. No. 2. Pp. 501-514.
 51. **Marks D.R., Tucker K., Cavallin M.A., Mast T.G., Fadool D.A.** Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J. Neurosci.* 2009. V. 29. No. 20. Pp. 6734-6751.
 52. **McNay E.C., Recknagel A.K.** Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011. V. 96. No. 3. Pp. 432-442.
 53. **Mielke J.G., Taghibiglou C., Wang Y.T.** Endogenous insulin signaling protects cultured neurons from oxygen-glucose deprivation-induced cell death. *Neuroscience.* 2006. V. 143. No. 1. Pp. 165-173.
 54. **Morton G.J., Cummings D.E., Baskin D.G., Barsh G.S., Schwartz M.W.** Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006. V. 443. Pp. 289-295.
 55. **Mosthaf L., Grako K., Dull T.J., Coussens L., Ullrich A., McClain D.A.** Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* 1990. V. 9. No. 8. Pp. 2409-2413.
 56. **Paulesco N.C.** Recherche sur le rôle du pancréas dans l'assimilation nutritive. *Archives Internationales de Physiologie.* 1921. V. 17. Pp. 85-103.
 57. **Pearson-Leary J., Jahagirdar V., Sage J., McNay E.C.** Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behav. Brain. Res.* 2018. V. 338. Pp. 32-39.
 58. **Pearson-Leary J., McNay E.C.** Novel roles for the insulin-regulated glucose transporter-4 in hippocampally dependent memory. *J. Neurosci.* 2016. V. 36. No. 47. Pp. 11851-64.
 59. **Persiyantseva N.A., Storozhevskiy T.P., Senilova Y.E., Gorbacheva L.R., Pinelis V.G., Pomytkin I.A.** Mitochondrial H₂O₂ as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons. *J. Mol. Signal.* 2013. V. 8. No. 1. P. 11.
 60. **Pitt J., Wilcox K.C., Tortelli V., Diniz L.P., Oliveira M.S., Dobbins C., Yu X.W., Nandamuri S., Gomes F.C.A., DiNunno N., Viola K.L., De Felice F.G., Ferreira S.T., Klein W.L.** Neuroprotective astrocyte-derived insulin/IGF-1 stimulate endocytic processing and extracellular release of neuron-bound A β oligomers. *Mol. Biol. Cell.* 2017. pii: mbc. E17-06-0416.
 61. **Plum L., Schubert M., Bruning J.C.** The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 16. Pp. 59-65.
 62. **Pomytkin I.A.** H₂O₂ signalling pathway: A possible bridge between insulin receptor and mitochondria. *Curr. Neuropharmacol.* 2012. V. 10. No. 4. Pp. 311-320.
 63. **Pomytkin I.A., Semenova N.A.** Study of the effect of preconditioning with succinic acid salt of choline (1:2) on the disturbances of energy metabolism in the brain during ischemia by ³¹P NMR in vivo. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2005. V. 403. Pp. 289-292.
 64. **Qiu J., Wagner E.J., Rønnekleiv O.K., Kelly M.J.** Insulin and leptin excite anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of TRPC5 channels. *J. Neuroendocrinol.* 2018. V. 30. No. 2.
 65. **Qiu J., Zhang C., Borgquist A., Nestor C.C., Smith A.W., Bosch M.A., Ku S., Wagner E.J., Rønnekleiv O.K., Kelly M.J.** Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell. Metab.* 2014. V. 19. Pp. 682-693.
 66. **Sato T., Hanyu H., Hirao K., Kanetaka H., Sakurai H., Iwamoto T.** Efficacy of ppar-gamma agonist pioglitazone in mild alzheimer disease. *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. Pp. 1626-1633.
 67. **Schwartz M.W., Marks J.L., Sipols A.J., Baskin D.G., Woods S.C., Kahn S.E., Porte D.Jr.** Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not

- obese (fa/fa) Zucker rats. *Endocrinology*. 1991. V. 128. Pp. 2645-47.
68. **Steen E., Terry B.M., Rivera E.J., et al.** Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – Is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers. Dis.* 2005. V. 7. Pp. 63-80.
 69. **Storozheva Z.I., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Semenova N.A., Zakharova E.I., Pomytkin I.A.** Dicholine salt of succinic acid, a neuronal insulin sensitizer, ameliorates cognitive deficits in rodent models of normal aging, chronic cerebral hypoperfusion, and beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia. *BMC Pharmacol.* 2008. V. 8. P. 1.
 70. **Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Pomytkin I.A.** Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neurosci.* 2007. V. 8. P. 84.
 71. **Strekalova T., Costa-Nunes J.P., Veniaminova E., Kubatiev A., Lesch K.P., Chekhonin V.P., Evans M.C., Steinbusch H.W.** Insulin receptor sensitizer, dicholine succinate, prevents both Toll-like receptor 4 (TLR4) upregulation and affective changes induced by a high-cholesterol diet in mice. *J. Affect. Disord.* 2016. V. 196. Pp. 109-116.
 72. **Sun X., Yao H., Douglas R.M., Gu X.Q., Wang J., Haddad G.G.** Insulin/PI3K signaling protects dentate neurons from oxygen-glucose deprivation in organotypic slice cultures. *J. Neurochem.* 2010. V. 112. No. 2. Pp. 377-388.
 73. **Takano K., Koarashi K., Kawabe K., Itakura M., Nakajima H., Moriyama M., Nakamura Y.** Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid β . *Neurochem. Int.* 2017. pii: S0197-0186(17)30253-X.
 74. **Talbot K., Wang H.Y.** The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* 2014. V.10 (1 Suppl). Pp. S12-25.
 75. **Talbot K., Wang H.Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., Fuino R.L., Kawaguchi K.R., Samoyedny A.J., Wilson R.S., Arvanitakis Z., Schneider J.A., Wolf B.A., Bennett D.A., Trojanowski J.Q., Arnold S.E.** Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. No. 4. Pp. 1316-38.
 76. **Timper K., Brüning J.C.** Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis. Model. Mech.* 2017. V. 10. No. 6. Pp. 679-689.
 77. **Unger J., McNeill T.H., Moxley R.T. 3rd, White M., Moss A., Livingston J.N.** Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience*. 1989. V. 31. No. 1. Pp. 143-157.
 78. **Urayama A., Banks W.A.** Starvation and triglycerides reverse the obesity-induced impairment of insulin transport at the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 2008. V. 149. No.7. Pp. 3592-3597.
 79. **van der Heide L.P., Ramakers G.M., Smidt M.P.** Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog. Neurobiol.* 2006. V. 79. Pp. 205-221.
 80. **Watson G.S., Cholerton B.A., Reger M.A., Baker L.D., Plymate S.R., Asthana S., Fishel M.A., Kulstad J.J., Green P.S., Cook D.G., Kahn S.E., Keeling M.L., Craft S.** Preserved cognition in patients with early alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: A preliminary study. *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 2005. V. 13. Pp. 950-958.
 81. **Wei L.T., Matsumoto H., Rhoads D.E.** Release of immunoreactive insulin from rat brain synaptosomes under depolarizing conditions. *J. Neurochem.* 1990. V. 54. Pp. 1661-65.
 82. **White M.F., Kahn C.R.** The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. No. 1. Pp. 1-4.
 83. **Wilden P.A., Kahn C.R., Siddle K., White M.F.** Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. No. 23. Pp. 16660-68.
 84. **Xu A.W., Kaelin C.B., Takeda K., Akira S., Schwartz M.W., Barsh G.S.** PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. Pp. 951-958.
 85. **Yamaguchi Y., Flier J.S., Yokota A., Benecke H., Backer J.M., Moller D.E.** Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*. 1991. V. 129. Pp. 2058-66.

86. Yamaguchi Y., Flier J.S., Benecke H., Ransil B.J., Moller D.E. Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology*. 1993. V. 132. Pp. 1132-38.
87. Ye F., Luo Y.J., Xiao J., Yu N.W., Yi G. Impact of insulin sensitizers on the incidence of dementia: A meta-analysis. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2016. V. 41. No. 5-6. Pp. 251-260.
88. Yeh T.C., Ogawa W., Danielsen A.G., Roth R.A. Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. Pp. 2921-28.
89. Ziegler A.N., Chidambaram S., Forbes B.E., Wood T.L., Levison S.W. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-II analogs with enhanced insulin receptor- α binding affinity promote neural stem cell expansion. *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. Pp. 4626-33.
90. Ziegler A.N., et al. IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. *Stem. Cells*. 2012. V. 30. Pp. 1265-76.

Insulin signaling system in the brain: new target in the treatment of central insulin resistance

I.A. Pomytkin, I.A. Krasil'nikova, V.G. Pinelis, N.N. Karkischenko

This review relates to insulin signaling system in the brain, which differs from those in peripheral tissues. Brain cells express predominantly, and neurons exclusively, the high affinity short isoform A of the insulin receptor (IR-A). IR-A binds insulin and insulin-like growth factor 2 (IGF-2) with physiologically relevant affinity, in contrast to isoform B (IR-B), major isoform in adult peripheral tissues. IR-A is involved in the regulation of synaptic plasticity, the growth of dendrites and axons, and the regulation of adult neurogenesis. The insulin system in the brain plays a role in the processes of memory formation and the regulation of eating behavior. Impairments of insulin signaling in the brain lead to the development of central insulin resistance, the most prominent manifestation of which is Alzheimer's disease. The development of drugs specifically targeting central insulin resistance represents a new promising approach in the treatment of diseases of the central nervous system.

Key words: insulin, insulin receptor, central nervous system, brain.

Поиск биологически активных соединений в ряду гидразонов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты

А.Ф. Газизова¹, Е.Р. Курбатов¹, И.П. Рудакова¹, А.А. Курбатова¹,
Е.В. Зверева¹, А.А. Бобылева¹, Ю.В. Фокин²

¹ – ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь

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

Контактная информация: Газизова Асия Фаниловна, asiya_gazizova@mail.ru

Особый интерес в области синтеза представляют производные N-замещенной антраниловой кислоты (АК) в связи с их многогранностью биологических эффектов и низкой токсичностью. Структурная модификация производных АК влияет на расширение спектра фармакологического действия, поэтому они применялись и применяются в медицинской практике в качестве противовоспалительных, анальгетических, жаропонижающих и диуретических средств. Целью работы является компьютерный прогноз с помощью программы PASS Online, синтез и экспериментальное исследование биологической активности новых соединений из ряда замещенных гидразидов NH-ацил-5-йодантраниловой кислоты. Синтез новых соединений осуществили, используя методы циклизации, амидирования, конденсации. Чистоту полученных продуктов контролировали методом ТСХ на пластинках Sorbfil ПТСХ-П-В. Строение соединений установили методами ИК-спектроскопии и ЯМР ¹H-спектроскопии. В лабораторных условиях изучили их антибактериальную и противовоспалительную активности. Полученные данные по прогнозированию биологического действия и проведенные испытания свидетельствуют о перспективности поиска фармакологически активных соединений в ряду R-бензилиденгидразидов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты.

Ключевые слова: компьютерный прогноз биологической активности, противовоспалительная активность, антибактериальная активность, 5-йодантраниловая кислота.

Введение

Часто при лечении различных заболеваний назначаются препараты, относящиеся к группе нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) [10], однако большинство лекарственных средств этой группы, одновременно с положительными фармакологическими свойствами, обладают рядом побочных эффектов – например, ulcerогенное действие, гепатотоксичность, нефротоксичность [1, 9]. Поэтому актуальной задачей видится расширение

ряда НПВС препаратами, не уступающими по силе действия и с повышенным профилем безопасности, среди которых рассматриваются производные антраниловой кислоты (АК), известные своей низкой токсичностью. Для современных препаратов предпочтительно наличие многопрофильного, мультисимптомного воздействия: например, противовоспалительного – в комплексе с анальгетическим и жаропонижающим, противовирусного, совместно с иммуномодулирующим, адаптогенным

и антиоксическим действием. Известно, что производные АК проявляют противомикробное [5], противосудорожное [20], противотуберкулезное [23], антихолинэстеразное [25], противовоспалительное [17] действие.

Большой интерес вызывают программы компьютерного моделирования, которые позволяют прогнозировать возможное фармакологическое действие и механизм его проявления, побочные эффекты, взаимодействие с ферментами и т.д. уже синтезированных веществ с подтвержденной структурой [21]. Одной из таких программ, которая находится во всеобщем доступе, является Pass Online (Prediction of Activity Spectra for Substance). Средняя точность прогноза составляет более 95%. Таким образом, использование программы Pass Online позволяет заниматься целенаправленным поиском соединений, рациональным изучением биологических активностей, что приводит к экономии времени и средств современного ученого.

Целью работы явился компьютерный прогноз, синтез и экспериментальное исследование биологической активности новых соединений из ряда замещенных гидразидов NH-ацил-5-йодантраниловой кислоты.

Материалы и методы

Используя методики органического синтеза, а именно циклизации, амидирования и конденсации, нами было получено 10 соединений. Для подтверждения структуры использовали: ЯМР ^1H -спектры, записанные на ЯМР-спектрометре фирмы «Mercury Vx-300» (США): рабочая частота – 300 МГц в ДМСО- d_6 (дейтерированном диметилсульфоксиде),

внутренний стандарт – ГМДС. Расчёт химических сдвигов протонов вели по шкале δ , м.д.; ИК – спектры, записанные на приборе «Specord M-80» в табл. с калия бромидом. Ход реакций и чистоту полученных продуктов контролировали методом ТСХ на пластинках Sorbfil ПТСХ-П-В в системе растворителей бензол-хлороформ-ацетон (9:1:1), пятна детектировали парами йода, величина R_f находилась в интервале 0,3-0,6.

Методика получения гидразида NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты (I)

К 0,3 г (0,00088 моль) соединения II в 5 мл этанола добавляют 0,0013 моль гидразида гидрата. Смесь перемешивают в течение 1 ч при температуре 18-20°C. Полученный осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат и перекристаллизовывают из смеси этанола и ацетонитрила (1:1). Выход – 79,7% $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_3\text{I}$. $T_{\text{пл}}$ (температура плавления) = 188-190°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 4,62 уш.с. (2H, NH_2); 7,26-8,53 м (8+1H, 2Ar+CONH); 12,23 с (1H, NHCO).

Методика получения 4-хлорбензиденгидразида NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты (II)

К взвеси 0,001 моль гидразида NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты (I) в 5 мл этанола добавляют 0,0012 моль 4-бромбензальдегида и перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 ч при температуре 18-20°C. Полученный осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат и перекристаллизовывают из ацетонитрила. Выход – 51,2% $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_3\text{I}\text{Cl}$. $T_{\text{пл}}$ = 214-215°C. Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 7,53-8,40 м (13H, 3Ar+CH); 11,58 с (H, CONH); 12,24 с (H, NHCO). Соеди-

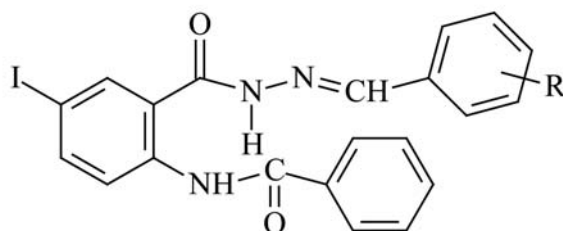


Рис. Общая структурная формула R-бензилиденгидразидов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты.

нения III-X получены аналогичным способом, общая структурная формула которых представлена на рис.

Для синтезированных веществ был осуществлен прогноз вероятности проявления биологической активности с использованием общедоступной компьютерной программы PASS Online, разработанной Институтом биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН [26].

Противовоспалительная активность

Исследования противовоспалительной активности проводились с разрешения локального этического комитета и соблюдением требований к работе с экспериментальными животными (ФЗ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г., Приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Директива Совета ЕЭС). Использовали модель каррагенинового отека. Эксперимент проводили на белых беспородных крысах массой 170-220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1% водного р-ра карраге-

нина (Betcon, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, США). Увеличение объема стопы, свидетельствующее о развитии отека, оценивали онкометрически до введения и через 3 ч после введения каррагенина. Исследуемые соединения вводили в количестве 50 мг/кг перорально, предварительно растворив в 2% крахмальной слизи. Контрольной группе животных перорально вводился эквимольный объем 2% крахмальной слизи за 1 ч до введения флоготенного агента.

Эффективность исследуемых соединений оценивали по степени подавления роста воспалительного отека в процентах к контролю [13, 14]. В качестве препарата сравнения был взят нимесулид (Нимесил, «Лабораториос Менарини С.А», Испания) – аналог по действию.

Антибактериальная активность

Антибактериальную активность полученных веществ по отношению к фармакопейным штаммам кишечной палочки (*Escherichia coli* ATCC 25922) и золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P) [11] определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [15]. Посев микроорганизмов производили в мясопептонный

бульон ($\text{pH}=7,0$) с различной концентрацией испытуемых соединений, при микробной нагрузке 250000 микробных тел на 1 мл. Учет результатов производили через 18-20 ч выдержки в термостате при температуре 37°C , после чего регистрировали наличие или отсутствие роста культур микроорганизмов под действием исследуемых веществ. В качестве эталонов сравнения использовали диоксидин, фурацилин, хлорамин Б. Лекарственные средства – диоксидин и фурацилин – на текущий момент применяются в медицинской практике и реализуются населению через аптечную сеть. Хлорамин Б является антисептиком и используется для дезинфекции. За действующую дозу принимали минимальную подавляющую концентрацию веществ (МПК, мкг/мл), которая задерживает рост микроорганизмов [15].

Статистическая обработка данных

Результаты обработаны способом вариационной статистики по методу Фишера – Стьюдента [12].

Результаты и их обсуждение

На протяжении многих лет на кафедре фармацевтической химии ФОО ПГФА ведется активный поиск новых соединений ряда производных АК и изучение их возможной биологической активности. Ранее были изучены амиды N-ацил-5-галоген(Н)антраниловых кислот и исследована их биологическая активность [8]. Среди данных соединений выявлены вещества, обладающие гипогликемическим [6], анальгетическим и противовоспалительным действием [7]. В меньшей степени изучены (не)замещенные гидразиды N-ацил-5-галоген(Н)антраниловых кислот. В одной из последних работ [2] представлены резуль-

таты поиска биологически активных веществ (БАВ) среди N-ацилзамещенных гидразидов моно(ди) галогенантраниловых кислот. В ходе исследования автором выявлена зависимость ПМД от природы галогена в 5-ом положении остатка антраниловой кислоты, I-производные оказались более активными, чем их Br-содержащие структурные аналоги. При изучении гипогликемического действия производных данного ряда обнаружены соединения, проявляющие сахароснижающую активность на уровне препарата сравнения – гликлазида. Активно ведется поиск БАВ в различных рядах антраниловых кислот учеными таких стран, как Индия [18], Украина [4], Китай [24], Канада [19]. Таким образом, изучение др. видов биологических активностей среди замещенных гидразидов N-ацил-5-галоген(Н)антраниловой кислоты является целесообразным и актуальным. Учитывая разнообразие фармакологических свойств производных антраниловой кислоты, мы изучили спектр возможных биологических активностей в ряду R-бензилиденгидразидов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты с помощью компьютерной программы PASS Online. Она является вспомогательным инструментом для оценки общего биологического потенциала органических молекул, для рационального поиска новых биологически активных соединений. С ее помощью можно прогнозировать более 4-х тыс. видов активностей, включая фармакологические эффекты, механизмы действия, токсические и побочные эффекты, для чего требуется только структурная формула соединения [16, 22].

Результаты исследований выражаются значениями P_a и P_i . P_a (probability

“to be active”) оценивает вероятность принадлежности изучаемого соединения к субклассу активных соединений на основе схожести структуры с теми молекулами, которые являются наиболее типичными в данном субнаборе «активные». P_i (probability «to be inactive») оценивает вероятность принадлежности изучаемого соединения к субклассу неактивных соединений «неактивные».

Полученные нами скрининговые данные возможных механизмов проявления противовоспалительной и антибактериальной активности приведены в табл. 1. Вероятности проявления в эксперименте «активности» (P_a) и «неактивности» (P_i) расположены по убыванию их разности.

Проведенные исследования показали, что исследуемые нами соединения с вероятностью до 36% могут проявить противовоспалительную активность, максимальная возможность непроявления составила 2,5%. Вероятность проявления веществами общего антибак-

териального действия – около 25%, при этом наблюдается высокая вероятность проявления противотуберкулезного действия, до 79,5%.

Исходя из вышеизложенного, нам представлялось актуальным осуществить синтез производных R-бензилиденгидразидов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты.

Гидразид NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты (I) получен амидированием 2-фенил-6-йод-3,1-бензоксазин-4-она гидразингидратом в среде этанола. Конденсацией соединения I с ароматическими альдегидами получены соответствующие гидразоны (II-X), которые представляют собой кристаллические или аморфные вещества белого с желтым, зеленым оттенком или желтого цвета. Структура соединений подтверждена данными ИК-спектроскопии и ЯМР ^1H -спектроскопии [3].

В спектрах ЯМР ^1H -соединений наблюдаются сигналы ароматических протонов в виде мультиплета в области

Таблица 1
Прогноз биологической активности в программе Pass Online

Соединение	Агонист интерлейкина 12		Агонист интерлейкина		Бактериостатическая активность		Противотуберкулезная активность	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
I	-	-	-	-	0,251	0,082	0,757	0,004
II	0,192	0,005	0,361	0,008	0,286	0,065	0,795	0,003
III	0,161	0,009	0,295	0,018	0,264	0,075	0,652	0,005
IV	0,163	0,008	0,308	0,016	0,264	0,076	0,757	0,004
V	0,192	0,005	0,361	0,008	0,286	0,065	0,776	0,003
VI	0,189	0,005	0,357	0,009	0,289	0,064	0,708	0,004
VII	0,143	0,014	0,266	0,025	0,231	0,094	0,735	0,004
VIII	0,0165	0,008	0,317	0,014	0,218	0,103	0,729	0,004
IX	0,155	0,038	0,284	0,020	0,209	0,109	0,690	0,004
X	0,154	0,004	0,286	0,020	0,215	0,105	0,683	0,004

6,57-8,77 м.д., синглеты протонов гидразидных групп – при 11,58-11,96 м.д., синглеты протонов амидных групп – при 11,91-12,28 м.д. В ИК-спектрах соединений присутствуют полосы валентных колебаний амидных групп при 3544-3280 см⁻¹, гидразидного карбонила

– при 1680-1640 см⁻¹, амидного карбонила – при 1695-1660 см⁻¹, азометиновой группы – при 1600-1590 см⁻¹.

Результаты экспериментального исследования биологического действия обобщены и представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Противовоспалительная и антибактериальная активность
R-бензилиденгидразидов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты**

Соединение	R	Противовоспалительная активность		Антибактериальная активность, МПК, мкг/мл	
		Прирост объема стопы через 3 ч, %	Торможение реакции через 3 ч, %	<i>St. aureus</i> ATCC6 6538-P	<i>E. coli</i> ATCC 25922
II	H	42,8±2,9* p<0,05	35,2	н/а	1000
III	4-Br	54,42±8,96 p>0,05	17,7	1000	1000
IV	4-N(CH ₃) ₂	48,3±6,49 p<0,05	26,9	>1000	>1000
V	4-I	40,95±4,46* p<0,05	38,0	>1000	>1000
VI	4-NO ₂	47,7±9,8 p>0,05	27,8	>1000	>1000
VII	2,4-OCH ₃	63,0±5,9 p>0,05	4,7	1000	1000
VIII	4-Cl	86,9±4,0 p<0,05	0	н/а	1000
IX	4-N(C ₂ H ₅) ₂	51,42±13,15 p>0,05	22,2	>1000	>1000
X	2-NO ₂	78,98±23,74 p>0,05	0	>1000	>1000
I		32,32±6,13* p<0,05	51,1	-	-
Нимесулид		33,9±6,8 p<0,05	48,7	-	-
Контроль		66,1±6,7	-	-	-
Диоксидин		-	-	500	31
Фурацилин		-	-	250	125
Хлорамин Б		-	-	500	250

Примечания: p<0,05 – достоверность в сравнении с контролем; н/а – нет активности; МПК – минимальная подавляющая концентрация.

Данные, полученные с помощью программы Pass Online, о возможности проявления биологического действия подтверждены экспериментально.

Исследования антибактериальной активности показали, что МПК полученных веществ составляет 1000 мкг/кг, что в 2-6 раз ниже, чем у препаратов сравнения. Бензилиденгидразид NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты (II) не проявил активности по отношению к золотистому стафилококку и оказал противомикробное действие (ПМД) в отношении кишечной палочки в концентрации 1000 мкг/мл. Введение в 4-е положение бензилиденового фрагмента атома хлора (VIII) не привело к изменению активности. Замена атома хлора в 4-ом положении на йод, диметиламино-, нитро-, диэтиламиногруппы привело к снижению активности в отношении обоих штаммов микроорганизмов. Перемещение нитрогруппы из 4-го положения во 2-е не привело к увеличению активности. Введение в 4-е положение атома брома или во 2-е и 4-е положение двух метоксигрупп привело к увеличению ПМД в отношении золотистого стафилококка при сохранении активности в отношении кишечной палочки. Таким образом, проведенные испытания показали, что замещенные гидразиды II-X проявляют слабую антибактериальную активность.

При исследовании противовоспалительного действия (ПВД) было установлено, что введение флогогенного агента вызывает увеличение объема стопы животных, которое получило максимальное развитие к третьему часу наблюдения. Прирост объема стопы у крыс при этом достигал 66,1% и был принят за контрольную величину.

Использование препарата сравнения (нимесулида) вызывало статистически достоверное по сравнению с контрольным показателем уменьшение прироста объема стопы у крыс до 33,9%, т.е. торможение воспаления составило 48,7%.

ПВД исходного гидразида NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты (I) оказалось на уровне препарата сравнения – нимесулида. Введение в аминогруппу гидразидного фрагмента бензилиденового заместителя (II) приводит к снижению ПВД на 13%. При введении в 4-е положение атома хлора (VIII), во 2-е – нитрогруппы (X) или двух метоксигрупп, во 2-е и 4-е положение – бензилиденового фрагмента (VII) приводит к потере ПВД. Замена атома хлора в 4-м (VIII) положении на бром (III) или йод (V) ведет к увеличению процента торможения отека до 17,7% и 38,0% соответственно. Перемещение нитрогруппы из 2-го положения (X) в 4-е (VI) приводит к появлению ПВД, и торможение развития отека составляет 27,8%. Введение в 4-е положение бензилиденового фрагмента (II) диметиламино- (IV) или диэтиламиногруппы (IX) приводит к снижению ПВД до 26,9% и 22,2% соответственно.

Заключение

Таким образом, целесообразно подтверждение данных, полученных с помощью программы Pass Online, экспериментальными исследованиями противотуберкулезного действия, а полученные результаты компьютерного прогноза и проведенные испытания ПВД свидетельствуют о перспективности поиска соединений, обладающих противовоспалительной активностью, в ряду R-бензилиденгидразидов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты.

Список литературы

1. Белоусова Е.А., Никитина Н.В. Химио-профилактика колоректального рака: молекулярные механизмы антиканцерогенного действия аминосалицилатов и нестероидных противовоспалительных препаратов // Фарматека. – 2006. – № 14. – С. 109.
2. Власова Н.А. Синтез, свойства и биологическая активность производных N-ацил-5(3,5) моно(ди)галогенантраниловых кислот, их эфиров, амидов, гидразидов, 3,1-бензоксазин-4-онов и хиназолин-4(3H)-онов: Автореф. дис. канд. фарм. наук. – Пермь, 2011. – С. 20.
3. Газизова А.Ф., Курбатов Е.Р., Бобылева А.А. Синтез, свойства и противомикробная активность R-бензилиденгидразидов NH-бензоил-5-йодантраниловой кислоты // Мат-лы III межд. науч.-практ. конф. «Современные проблемы развития фундаментальных и прикладных наук». – Прага, 2016. – Т. 1. – С. 31-35.
4. Григорьева Л.В. Поиск новых антипсихотических и психостимулирующих средств среди производных фенилантраниловой кислоты // Актуальні проблеми фармації та фармакотерапії. – 2014. – № 1. – С. 197-203.
5. Коркодинова Л.М., Курбатов Е.Р., Газизова А.Ф., Новикова В.В. Синтез, свойства и противомикробная активность NH-(N'-R-бензилиденгидразинооксалил) антраниловых кислот // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – № 1. – С. 160-163.
6. Курбатов Е.Р. Гипогликемическая активность замещенных амидов галогенантраниловых кислот // Хим.-фармац. журн. – 2014. – Т. 48, № 10. – С. 37-38.
7. Курбатов Е.Р. Исследование противовоспалительной, анальгетической активности и токсичности синтезированных амидов N – аллилоксамоил – 5-бром(Н) антраниловой кислоты // Вопр. биол., мед. и фармац. химии. – 2011. – № 11. – С. 60-63.
8. Курбатов Е.Р., Коркодинова Л.М., Гольдштейн А.Г. Синтез, противовоспалительная и анальгетическая активность замещённых амидов N-дихлорацетил-5-йодантраниловой кислоты // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – С. 63-64.
9. Насонов Е.Л. Кардиоваскулярные осложнения ингибиторов ЦОГ-2 – вопросов больше, чем ответов // Рус. мед. журн. – 2005. – № 13(7). – С. 383-391.
10. Насонов Е.Л. Клинические рекомендации. Ревматология. – М.: Гэотар-Медиа, 2006. – 288 с.
11. ОФС.1.2.4.0002.15 Микробиологическая чистота.
12. Прозоровский В.В. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – № 7(3-4). – С. 2090-2120.
13. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. – 358 с.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.
15. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Д.А. Хабриева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 516-522.
16. Филимонов Д.А., Порейков В.В. Прогноз спектра биологической активности органических соединений // Рос. хим. журн. – 2006. – Т. 50, № 2. – С. 66-75.
17. Abdel-Aziz A.A.-M., Abou-Zeid L.A., El Tahir K.E.H., Mohamed M.A., Abu El-Enin M.A., El-Azab A.S. Design, synthesis of 2,3-disubstituted 4(3H)-quinazolinone derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents: COX-1/2 inhibitory activities and molecular docking studies // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 24, No. 16. – Pp. 444-457.
18. Beniwal M., Lather V., Judge V. Anti-inflammatory, antimicrobial activity and QSAR studies of anthranilic acid derivative // World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences – 2015. – Vol. 4, No. 9. – Pp. 1443-1451.
19. Culf A.S., Yin H., Monro S., Ghosh A., Barnett D.A., Ouellette R.J., Čuperlović-Culf M., McFarland S.A. A spectroscopic study of substituted anthranilic acids as sensitive environmental probes for detecting cancer cells // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 24, No. 5. – Pp. 929-937.
20. El-Azab A.S., Abdel-Hamide S.G., Sayed-Ahmed M.M., Hassan G.S. Novel 4(3H)-quinazolinone analogs: synthesis and anticonvulsant activity // Med Chem Res. – 2013. – No. 22. – Pp. 2815-2827.
21. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V.,

- Poroikov V.V.* Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2014. – Vol. 3, No. 50. – Pp. 3818-3828.
22. *Habibyar A.F., Sharma N., Khurana N.* PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of hesperidin against scopolamine induced amnesia in mice // Eur. J. of Pharmacology. – 2016. – No. 789. – Pp. 385-394.
 23. *Myangar K.N., Akhaja T.N., Naik D.R., Raval J.P.* Thiazolidinyl-quinazolin-4-one derivatives: design, synthesis and in vitro evaluation of antitubercular // Chemistry & Biology Interface. – 2012. – No. 2(3). – Pp. 157-171.
 24. *Shi L.* Anthranilic acid-based diamides derivatives incorporating arylisoxazoline pharmacophore as potential anticancer agents: design, synthesis and biological evaluation // Eur. J. of Medicinal Chemistry. – 2012. – No. 54. – Pp. 549-556.
 25. *Uraz M., Karakuş S., Mohsen U.A., Kaplancıklı Z.A., Rolla S.* The synthesis and evaluation of anti-acetylcholinesterase activity of some 4(3H)-quinazolinone derivatives bearing substituted 1,3,4- thiadiazole // Marmara Pharm. J. – 2017. – No. 21. – Pp. 96-101.
 26. <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/index.php>.
- ### References
1. *Belousova E.A., Nikitina N.V.* Khimioprofilaktika kolorektal'nogoraka: molekulyarnyyemekhanizmy antikantserogennogo deystviya aminosaltislatov i nesteroidnykh protivovospalitel'nykh preparatov [Chemoprophylaxis of colorectal cancer: molecular mechanisms of anticarcinogenic action of aminosalticulates and non-steroidal antiinflammatory drugs]. Pharmatec. 2006. No. 14. P. 109. (In Russian).
 2. *Vlasova N.A.* Sintez, svoystva i biologicheskaya aktivnost' proizvodnykh N-atsil-5(3,5) mono(di) galogenantranilovykh kislot, ikhefirov, amidov, gidrazidov, 3,1-benzoksazin-4-onov i khinazolin-4(3H)-onov [Synthesis, properties and biological activity of N-acyl-5 (3,5) mono (di) halogenantranilic acid derivatives, their esters, amides, hydrazides, 3,1-benzoxazin-4-ones and quinazoline-4 (3H) –ones]: Avtoref. dis. kand. farm. nauk [Syn. of diss. of cand. pharm. sciences]. Perm', 2011. P. 20. (In Russian).
 3. *Gazizova A.F., Kurbatov E.R., Bobyleva A.A.* Sintez, svoystva i protivomikrobnaya aktivnost' R-benzilidengidrazidov NH-benzoil-5-yodantranilovoy kisloty [Synthesis, properties and antimicrobial activity of R-benzylidenehydrazides of NH-benzoyl-5-iodoanthranilic acid]. Mat-ly III mezhd. nauch.-prakt. konf. «Sovremennye problemy razvitiya fundamental'nykh i prikladnykh nauk» [Materials of the III international scientific-practical conference «The main directions in the development of basic and applied sciences»]. Prague. 2016. V. 1. Pp. 31-35. (In Russian).
 4. *Grigor'yeva L.V.* Poisk novykh antipsikhoticheskikh i psikhostimuliruyushchikh sredstv sredi proizvodnykh fenilantranilovoy kisloty [Search for new antipsychotic and psychostimulating agents among phenylantranilic acid derivatives]. Aktual'ni problem farmatsii ta farmakoterapii [Actual problems of pharmacy and pharmacotherapy]. 2014. No. 1. Pp. 197-203. (In Russian).
 5. *Korkodinova L.M., Kurbatov E.R., Gazizova A.F., Novikova V.V.* Sintez, svoystva i protivomikrobnaya aktivnost' NH-(N'-R-benzilidengidrazinooksali) antranilovykh kislot [Synthesis, properties and antimicrobial activity of NH-(N'-R-benzylidenehydrazinooxalyl) anthranilic acids]. Vestnik VGU, seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya [Bulletin of VSU, series: Chemistry. Biology. Pharmacy]. 2017. No. 1. Pp. 160-163. (In Russian).
 6. *Kurbatov E.R.* Gipoglikemicheskaya aktivnost' zameshchennykh amidov galogenantranilovykh kislot [Hypoglycemic activity of substituted amides of haloanthranilic acids]. Khim.-farmats. zhurn. [Chem.-farm. Journ.]. 2014. No. 10. Vol. 48. Pp. 37-38. (In Russian).
 7. *Kurbatov E.R.* Issledovaniye protivovospalitel'noy, anal'geticheskoy aktivnosti i toksichnosti sintetizirovannykh amidov N – alliloksamoil – 5-brom(N) antranilovoy kisloty [Research of anti-inflammatory, analgesic activity and toxicity of synthesized amides of N-allyloxamoyl-5-bromo (H) anthranilic acid]. Vopr. biol., med. i farmats. khimii [Questions of biol., med. and farm. chemistry]. 2011. No. 11. Pp. 60-63. (In Russian).
 8. *Kurbatov E.R., Korkodinova L.M., Gol'dshteyn A.G.* Sintez, protivovospalitel'naya i anal'geticheskaya aktivnost' zameshchonnykh amidov N-dikhloratsetil-5-yodantranilovoy kisloty [Synthesis, antiinflammatory and analgesic activity of substituted amides of

- N-dichloroacetyl-5-iodoanthranilic acid]. Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta [Bulletin of Volgograd State Medical University]. 2014. Pp. 63-64. (In Russian).
9. **Nasonov E.L.** Kardiovaskulyarnyye oslozhneniya ingibitorov TSOG-2 – voprosy bol'she, chem otvetov [Cardiovascular complications of COX-2 inhibitors – there are more questions than answers]. Rus. med. zhurnal [Rus. med. journal]. 2005. V. 13(7). Pp. 383-391. (In Russian).
10. **Nasonov E.L.** Klinicheskiye rekomendatsii. Revmatologiya [Clinical recommendations. Rheumatology]. Moscow: Geotar-Media, 2006. 288 p. (In Russian).
11. OFS.1.2.4.0002.15 Mikrobiologicheskaya chistota [GPA Microbiological purity]. (In Russian).
12. **Prozorovskiy V.V.** Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov farmakologicheskikh issledovaniy [Statistical processing of the results of pharmacological studies]. Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya [Psychopharmacology and biological narcology]. 2007. No. 7(3-4). Pp. 2090-2120. (In Russian).
13. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil'-2S. 2010. 358 p. (In Russian).
14. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [A guide to preclinical drug research]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Greef i K. 2012. 944 p. (In Russian).
15. Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Ed. by R.U. Khabriyev. Moscow: OAO «Izdatel'stvo «Meditsina». 2005. Pp. 516-522. (In Russian).
16. **Filimonov D.A., Poreykov V.V.** Prognoz spektra biologicheskoy aktivnosti organicheskikh soyedineniy [Forecast of the spectrum of biological activity of organic compounds]. Ros. khim. zhurn. [Russian chemical journal]. 2006. V. 50, No. 2. Pp. 66-75. (In Russian).
17. **Abdel-Aziz A.A.-M., Abou-Zeid L.A., El Tahir K.E.H., Mohamed M.A., Abu El-Enin M.A., El-Azab A.S.** Design, synthesis of 2,3-disubstituted 4(3H)-quinazolinone derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents: COX-1/2 inhibitory activities and molecular docking studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2016. Vol. 24, No. 16. Pp. 444-457.
18. **Beniwal M., Lather V., Judge V.** Anti-inflammatory, antimicrobial activity and QSAR studies of anthranilic acid derivative. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences 2015. Vol. 4, No. 9. Pp. 1443-1451.
19. **Culf A.S., Yin H., Monro S., Ghosh A., Barnett D.A., Ouellette R.J., Čuperlović-Culf M., McFarland S.A.** A spectroscopic study of substituted anthranilic acids as sensitive environmental probes for detecting cancer cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2016. Vol. 24, No. 5. Pp. 929-937.
20. **El-Azab A.S., Abdel-Hamida S.G., Sayed-Ahmed M.M., Hassan G.S.** Novel 4(3H)-quinazolinone analogs: synthesis and anticonvulsant activity. Med Chem Res. 2013. No. 22. Pp. 2815-2827.
21. **Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V.** Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2014. Vol. 3, No. 50. Pp. 3818-3828.
22. **Habibyar A.F., Sharma N., Khurana N.** PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of hesperidin against scopolamine induced amnesia in mice. Eur. J. of Pharmacology. 2016. No. 789. Pp. 385-394.
23. **Myangar K.N., Akhaja T.N., Naik D.R., Raval J.P.** Thiazolidinyl-quinazolin-4-one derivatives: design, synthesis and in vitro evaluation of antitubercular. Chemistry & Biology Interface. 2012. No. 2(3). Pp. 157-171.
24. **Shi L.** Anthranilic acid-based diamides derivatives incorporating arylisoxazoline pharmacophore as potential anticancer agents: design, synthesis and biological evaluation. Eur. J. of Medicinal Chemistry. 2012. No. 54. Pp. 549-556.
25. **Uraz M., Karakuş S., Mohsen U.A., Kaplancıklı Z.A., Rolla S.** The synthesis and evaluation of anti-acetylcholinesterase activity of some 4(3H)-quinazolinone derivatives bearing substituted 1,3,4- thiadiazole. Marmara Pharm. J. 2017. No. 21. Pp. 96-101.
26. <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/index.php>.

Search for biologically active compounds in a series of hydrazones of NH-benzoyl-5-iodoantranilyc acid

A.F. Gazizova, E.R. Kurbatov, I.P. Rudakova, A.A. Kurbatova,
E.V. Zvereva, A.A. Bobyleva, Yu.V. Fokin

Of particular interest in the field of synthesis are derivatives of N-substituted antranilic acid (AA), due to their versatility of biological effects and low toxicity. Structural modification of AA derivatives affects the expansion of the spectrum of pharmacological action; therefore, they have been used and are used in medical practice as antiinflammatory, analgesic, antipyretic and diuretic medicines. The aim of this work is a computer prediction using a computer program PASS Online, synthesis and experimental study of biological activity of new compounds, some substituted hydrazides of NH-acyl-5-iodoantranilyc acid. The synthesis of new compounds was carried out using methods of cyclization, amidation, condensation. The purity of the obtained products was controlled by TLC on plates Sorbfil PTSH-P-V. The structure of compounds was established by IR spectrometry and ^1H NMR spectroscopy. Antibacterial and antiinflammatory activities were studied in the laboratory. Thus, the obtained data on the prediction of the biological effect and the tests carried out testify to the prospect of searching for pharmacologically active compounds in the series of NH-benzoyl-5-iodoantranilic acid R-benzylidenhydrazides.

Key words: computer prediction of biological activity, antiinflammatory activity, antibacterial activity, 5-iodoantranilic acid.



Антагонистическая активность консорциума штаммов *Lactobacillus fermentum* VKM В-2793D и *Lactobacillus reuteri* VKM В-3144D, выделенных из женского молока, к мастит-индуцирующим патогенам

В.М. Абрамов¹, В.С. Хлебников¹, И.В. Косарев¹, Т.В. Припутневич², Л.А. Любасовская², Р.Н. Василенко¹, В.К. Сакулин¹, В.Н. Каркищенко³, Н.Н. Каркищенко³, С.Ю. Пчелинцев¹, А.В. Карлышев⁴, В.А. Самойленко⁵, А.В. Мачулин⁵

¹ – ОАО «Институт инженерной иммунологии», Московская область

² – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

³ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

⁴ – Кингстонский университет, Лондон, Великобритания

⁵ – ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» РАН, Московская область

Контактная информация: Косарев Игорь Васильевич, kosarev-52@mail.ru

Целью работы явилось изучение антагонистической активности штаммов *Lactobacillus fermentum* VKM В-2793D, *Lactobacillus reuteri* VKM В-3144D, выделенных из женского молока, а также их консорциума к патогенам, вызывающим мастит в лактационный период. Установлено, что лактобактерии и их консорциум проявляют антагонистическую активность к индикаторным культурам, использованным в работе, включая резистентные к антибиотикам патогены. Консорциум обладает более выраженной антагонистической активностью к мастит-индуцирующим патогенам по сравнению с отдельными штаммами лактобактерий, входящими в его состав. Консорциум защищает клетки MCF-7 молочной железы человека от адгезии и колонизации патогеном *S.aureus* 8325-4. Полученные результаты свидетельствуют о том, что лактобактерии *L.fermentum* VKM В-2793D, *L.reuteri* VKM В-3144D, а также их консорциум являются отличными кандидатами для разработки пробиотического препарата для профилактики и лечения лактационного мастита.

Ключевые слова: лактобактерии женского молока, антагонистическая активность, биомоделирование.

Введение

Лактационный мастит относят к важным социальным проблемам, связанным с преждевременным прекращением груд-

ного вскармливания детей и нарушением репродуктивного здоровья. Заболевание представляет собой воспаление молочной железы у матери в период грудно-

го вскармливания ребенка, вызываемое условно-патогенными микроорганизмами. Мастит является следствием дисбиоза молочной железы [7]. Несмотря на то, что лактобактерии относятся к субдоминирующим бактериям в женском молоке, они являются биомаркерами, свидетельствующими о наличии здоровой микробиоты в данном биотопе в лактационный период [18]. Дисбиоз характеризуется снижением уровня лактобактерий, участвующих в обеспечении колонизационной резистентности молочной железы матери, кормящей грудью, эволюционно адаптированных для вертикальной передачи ребёнку вместе с грудным молоком в условиях функционирования микрoэкологической системы «мать-дитя» [7,13, 18]. В результате дисбиоза из грудного молока исчезают лактобактерии, их место занимают микроорганизмы, индуцирующие мастит.

Согласно статистическим данным ВОЗ за 2000 г. 33% кормящих грудью матерей в мире болели маститом [20]. Многие исследователи отмечают тенденцию к росту заболевания, уровень которого в настоящее время достиг 35% [7, 4, 16].

Наиболее частыми инфекционными агентами, индуцирующими мастит у кормящих грудью женщин, являются *Staphylococcus epidermidis* [5] и *Staphylococcus aureus* [6]. *S.aureus* является этиологическим агентом острого лактационного мастита, который часто переходит в хроническую форму и трудно поддаётся лечению с помощью антибиотиков [3, 17]. Для лечения мастита применяются антибиотики. Штаммы стафилококков, индуцирующие мастит, характеризуются резистентностью к различным антибиотикам и способностью формировать би-

оплёнку на поверхности эпителиальных клеток выводных протоков молочной железы [5]. В последние десятилетия во всем мире отмечается рост антибиотикорезистентных патогенов, индуцирующих мастит. Метициллин- и гентамицин-резистентные штаммы *S.aureus* (MRSA, GRSA), относящиеся к внутрибольничным инфекциям, циркулируют также в родильных домах. Они представляют серьёзную угрозу здоровью матери и ребёнка [5, 10, 15].

В связи с вышеизложенным актуальной является разработка лекарственных средств на основе пробиотических штаммов лактобацилл, выделенных из женского молока, для профилактики и комплексного лечения лактационного мастита у кормящих грудью матерей. Подобные пробиотические препараты отсутствуют в России. Штамм *L.fermentum* ВКМ В-2793D и штамм *L.reuteri* ВКМ В-3144D первоначально были выделены из женского молока при изучении видового спектра лактобацилл в микрoэкологической системе «здоровая пара мать-дитя», затем были обнаружены и идентифицированы методом молекулярного фингерпринтинга также в кале у ребёнка и у матери в каждой паре мать-дитя, соответственно.

Целью настоящей работы явилось исследование антагонистической активности штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D, *L.reuteri* ВКМ В-3144D и их консорциума к мастит-индуцирующим антибиотикорезистентным патогенам.

Материалы и методы

Антагонистическую активность штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D, *L.reuteri* ВКМ В-3144D и их консор-

циума изучали методом отсроченного антагонизма [1] с использованием спектра индикаторных культур, включая клинические изоляты мастит-индуцирующих патогенов, обладающих антибиотикорезистентностью. Прямое противомикробное действие консорциума лактобактерий изучали также методом «конкурентного вытеснения» патогена [14]. В опытах использовали клеточную биомодель *in vitro*, включающую перевиваемую линию эпителиоцитов MCF-7 молочной железы человека и штамм *S.aureus* 8325-4 в качестве мастит-индуцирующего патогена, обладающий устойчивостью к гентамицину [2]. Культуру MCF-7 эпителиоцитов выращивали на среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки, 1% пенициллина и стрептомицина, 0,2 mM Hepes, 2mM L-глутамина, при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Эпителиоциты в концентрации 3,0x10⁵ кл/мл высевали на 6-луночные планшеты в объёме 2 мл на лунку и культивировали 24 ч. По достижению 70-80% монослоя эпителиоциты промывали трехкратно средой DMEM без сыворотки, и затем к ним была добавлена среда DMEM с L-глутамином. Перед добавлением к эпителиоцитам лактобактерии (18-часовая культура, выращенная на среде MRS, pH=6,5) были дважды промыты PBS (pH=7,2) путём центрифугирования при 5000 об./мин в течение 15 мин и ресуспендированы в среде DMEM с L-глутамином. Концентрацию бактерий для определения соотношения «бактерия / соматическая клетка» регулировали по оптической плотности и контролировали высеvom на плотную питательную среду. Множественность инфицирования (МОИ)

составляла 200 бактерий на одну соматическую клетку.

Планшеты, содержащие MCF-7 эпителиоциты с внесёнными к ним лактобактериями, были разделены на две группы. Обе группы планшетоов инкубировали 5 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

После 5-часовой инкубации в лунки одной группы планшетоов вносили *S.aureus*, и культивирование продолжали ещё 24 ч (для изучения роли лактобактерий консорциума в обеспечении колонизационной резистентности эпителиоцитов MCF-7 против *S.aureus*, в качестве контроля служили интактные эпителиоциты, к которым добавляли *S.aureus* и также культивировали 24 ч). В лунки второй группы планшетоов вносили PBS для удаления лактобактерий, не связавшихся с эпителиоцитами, фиксировали в холодном этаноле (3 мин), окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой, высушивали при комнатной температуре и исследовали микроскопически. Лунки первой группы планшетоов обрабатывали аналогичным способом после завершения 24-часового культивирования.

Адгезию штаммов лактобактерий, входящих в состав консорциума, оценивали по двум показателям:

1) активность адгезии – количество MCF-7 эпителиоцитов с адгезированными лактобактериями из 100 посчитанных, в процентах;

2) индекс адгезии – количество лактобактерий, адгезированных на одном MCF-7 эпителиоците.

Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента и программы Statistica 7.0.

Результаты и их обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о наличии антагонистической активности у штамма *L.fermentum* ВКМ В-2793D и штамма *L.reuteri* ВКМ В-3144D к мастит-индуцирующим патогенам. Наиболее частые инфекционные агенты, вызывающие мастит (*S.aureus* и *S.epidermidis*) и обладающие резистентностью к антибиотикам (гентамицин, метициллин, оксациллин, эритромицин, клиндамицин), оказались также чув-

ствительными к исследуемым лактобактериям. Консорциум лактобактерий *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D обладает более выраженной антагонистической активностью к мастит-индуцирующим патогенам по сравнению с отдельными штаммами лактобактерий, входящими в его состав (табл. 1).

Известно, что рост антибиотикорезистентности патогенных бактерий представляет собой глобальную проблему

Таблица 1
Синергизм антагонистической активности штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D и их консорциума к мастит-индуцирующим патогенам

Индикаторная культура	Зоны задержки роста индикаторных микроорганизмов для отдельных штаммов лактобацилл и их консорциума, мм (M±m)		
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Консорциум
<i>Staphylococcus aureus</i> 0-15	19,4±1,3	11,5±0,9	31,6±2,7*
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4 ⁽¹⁾	21,7±1,4	12,0±1,5	32,5±1,8*
<i>Staphylococcus aureus</i> КИ-39 ⁽²⁾	18,6±1,5	13,6±1,6	30,0±2,3*
<i>Staphylococcus aureus</i> КИ-12 ⁽³⁾	19,7±1,8	15,1±1,4	32,7±2,4*
<i>Staphylococcus aureus</i> КИ-17 ⁽⁴⁾	18,9±1,2	16,0±1,8	29,5±1,8*
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	21,8±1,7	15,3±1,6	33,6±2,5*
<i>Staphylococcus epidermidis</i> КИ-TAn ⁽³⁾	18,2±1,4	16,7±0,5	30,0±1,7*
<i>Staphylococcus epidermidis</i> КИ-ИД ⁽⁵⁾	17,9±1,1	12,4±1,7	28,5±1,3*
<i>Streptococcus agalactiae</i> КИ-50	20,3±1,8	12,3±0,9	31,4±2,5*
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	19,5±1,2	13,9±0,8	30,4±1,3*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	23,6±1,7	14,3±0,9	35,7±1,8*
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	18,4±1,0	10,6±0,5	26,2±1,5*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	17,5±1,1	11,3±0,9	24,3±1,2*

Примечания: КИ – клинический изолят;

резистентность к: ⁽¹⁾ – гентамицину, ⁽²⁾ – метициллину, ⁽³⁾ – оксациллину, ⁽⁴⁾ – эритромицину, ⁽⁵⁾ – клиндамицину;

* – достоверность различий между консорциумом и отдельными штаммами лактобацилл, входящими в его состав, p<0,05.

Таблица 2

Снижение антибиотикорезистентности штамма *S.aureus* 8325-4 в присутствии консорциума штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D

Микроорганизм	Антибиотик	МИКА, мкг/мл
<i>S.aureus</i> 8325-4	цефалексин	2
<i>L.reuteri</i> ВКМ В-3144D	цефалексин	240
<i>L. fermentum</i> ВКМ В-2793D	цефалексин	128
<i>S.aureus</i> 8325-4 (в присутствии консорциума лактобактерий)	цефалексин	0,25

[15]. Нами установлено, что после добавления консорциума лактобактерий к *S.aureus* 8325-4 снижается минимальная ингибирующая концентрация антибиотика (МИКА) для этого патогена (табл. 2).

Данный эффект связан с действием бактериоцинов, продуцируемых лактобактериями консорциума. Ранее проведенное полногеномное секвенирование геномов лактобактерий консорциума позволило выявить у штамма *L.fermentum* ВКМ В-2793D ген высокомолекулярного термолабильного бактериоцина с уникальной аминокислотной последовательностью, относящегося к классу 3 бактериолизин, связывающихся с ДНК патогенов и блокирующих клеточный биосинтез, а у штамма *L.reuteri* ВКМ В-3144D – ген, кодирующий низкомолекулярный термостабильный бактериоцин, проявляющий бактерицидное действие к мастит-индуцирующим патогенам [11].

Обнаружен также другой механизм прямого антагонистического действия консорциума исследуемых лактобактерий – т.н. конкурентное вытеснение патогена, связанное с адгезией и плотной колонизацией эпителиоцитов

молочной железы штаммами консорциума. Адгезия является одной из эволюционно выработанных стратегий, используемых многими бактериями для поддержания постоянного их количества в различных экологических нишах. Адгезия содержащихся в молоке лактобактерий к эпителиоцитам молочной железы служит решающим этапом в колонизации молочных протоков, а также одним из основных механизмов, с помощью которых они могут защищать молочную железу от колонизации мастит-индуцирующими патогенами и предотвращать развитие лактационного мастита. Способность лактобактерии к адгезии на эпителиоцитах молочной железы – важный критерий выбора штаммов с целью создания пробиотических препаратов для профилактики и лечения лактационного мастита. В клеточной биомодели *in vitro* нами показано, что консорциум штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D эффективно колонизирует перевиваемые эпителиоциты MCF-7 молочной железы человека. Активность адгезии для каждого штамма составляет 100%. Оба штамма имеют высокий индекс адгезии (табл. 3).

Таблица 3

Адгезия штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D к эпителиоцитам MCF-7 молочной железы человека

Штамм	Активность адгезии	Индекс адгезии
<i>L. fermentum</i> ВКМ В-2793D	100±0	48±6
<i>L.reuteri</i> ВКМ В-3144D	100±0	32±4

Консорциум защищает эпителиоциты MCF-7 молочной железы человека от колонизации клетками *S.aureus* 8325-4 (рис).

Эффективность антагонистической активности консорциума к *S.aureus* в данной биомодели связана с наличием у штамма *L.fermentum* ВКМ В-2793D гена *cbp*, кодирующего лектин, для которого коллаген поверхностного матрикса эпителиоцитов молочной железы является высокоаффинным рецептором [19], а штамм *L.reuteri* ВКМ В-3144D имеет ген *YggS*, ответственный за разрушение биопленки мастит-индуцирующих патогенов [11, 12]. Результаты, полученные на биомодели *in vitro*, свидетельствуют о потенциальной способности консорциума штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D

и *L.reuteri* ВКМ В-3144D обеспечить колонизационную резистентность эпителиоцитов молочной железы *in vivo* против мастит-индуцирующих патогенов в лактационный период, связанный с грудным вскармливанием ребёнка. Вертикальная передача пробиотических лактобактерий вместе с молоком от матери к ребёнку в микробиологической системе «мать-дитя» имеет первостепенное значение для формирования у ребёнка нормальной микрофлоры ЖКТ и развития здоровой иммунной системы [8, 9].

Выводы

Штаммы *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D, выделенные из молока здоровых женщин, а также

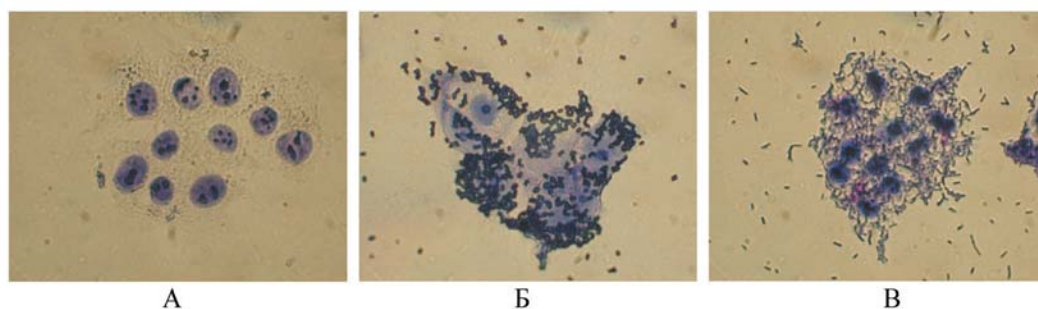


Рис. Консорциум штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D ингибирует процесс колонизации эпителиоцитов MCF-7 молочной железы человека клетками *S.aureus* 8325-4: А – интактные эпителиоциты MCF-7; Б – колонизация интактных эпителиоцитов MCF-7 клетками *S.aureus* 8325-4; В – отсутствие адгезии клеток *S.aureus* 8325-4 и их колонизации на эпителиоцитах MCF-7, экранированных консорциумом лактобацилл. Среда DMEM, ув. x1512. Окраска: азур-эозин по Романовскому-Гимза.

их консорциум проявляют антагонистическую активность к мастит-индуцирующим антибиотикорезистентным патогенам, выступающим в качестве специфических биомишеней.

В опытах на клеточной биомодели *in vitro* установлено, что консорциум штаммов *L.fermentum* ВКМ В-2793D и *L.reuteri* ВКМ В-3144D эффективно защищает эпителиоциты MCF-7 молочной железы человека от колонизации клетками *S.aureus* 8325-4.

Эти результаты свидетельствуют о потенциальной способности консорциума обеспечить колонизационную резистентность эпителиоцитов молочной железы *in vivo* против мастит-индуцирующих патогенов в лактационный период, связанный с грудным вскармливанием ребёнка.

Список литературы

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2 / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. – 2012. – 536 с.
2. Brouillette E., Talbot B., Malouin F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of Mastitis // Infect. Immun. 2003. V. 71. No. 4. Pp. 2292-2295.
3. Brouillette E., Martinez A., Boyll B., et al. Persistence of a *Staphylococcus aureus* Small-colony variant under antibiotic pressure *in vivo* // FEMS Immunol. and med. microbiol. 2004. V. 41. Issue 1. Pp. 35-41.
4. Delgado S., Arroyo R., Jiménez E., et al. Staphylococcus epidermidis strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics // BMC Microbiol. 2009. V. 9. Pp. 82-85.
5. Delgado S., Arroyo R., Jiménez E., et al. Infectious mastitis during lactation: an underrated condition (I) // Acta Pediatrica Espanola. 2009. V. 67. Pp. 77-84.
6. Delgado S., Garcia P., Fernandez L., Jimenez E., Rodriguez-Banos M., Del Campo R., Rodriguez J.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis // FEMS immunological and medical microbiology. 2011. V. 62. Pp. 225-235.
7. Fernández L., Arroyo R., Espinosa I., Marín M., Jiménez E., Rodríguez J.M. Probiotics for human lactational mastitis // Benef. Microb. 2014. V. 5. Pp. 169-183.
8. Indrio F., Neu J. The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics // Cur. Opin. Pediatr. 2011. V. 23. No. 2. Pp. 145-150.
9. Jost T., Lacroix C., Braegger C., Rochat F., Chassart C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breast-feeding // Environmental Microbiology. 2013. doi:10.1111/1462-2920.12238.
10. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections // N. Engl. J. Med. 1998. V. 339. Pp. 520-532.
11. Lehri B., Seddon A., Karlyshev A. Potential probiotic-associated traits revealed from completed high quality genome sequence of *Lactobacillus fermentum* 3872 // Standards in Genomic Sciences. 2017. doi:10.1186/s40793-017-0228-4.
12. Lehri B., Seddon A., Karlyshev A. Lactobacillus fermentum 3872 genome sequencing reveals plasmid and chromosomal genes potentially involved in a probiotic activity // FEMS Microbiol. Let. 2015. V. 362. Pp. 1-5.
13. Martin V., Maldonado A., Moles L., et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces // J. of Human Lactation. 2012. V. 28. Pp. 36-44.
14. Ramiah K., van Reenen C., Dicks L. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis* // Res. Microbiol. 2008. V. 6. Pp. 470-475.
15. Saiman L., Okeefe M., Graham P., Wu F., et al. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women // Clin. Infect. Dis. 2003. V. 37. Pp. 1313-19.
16. Schoenfelder S.M., Lange C., Eckart M., Hennig S., Kozytska S., Ziebuhr W. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen // Int. J. of Medical Microbiology. 2010. V. 300. Pp. 380-386.
17. Sears P.M., McCarthy K.K. Diagnosis of mastitis for therapy decisions // Veterinary Clinics of

- North America: Food Animal Practice. 2003. V. 19. Pp. 93-108.
 18. Soto A., Martín V., Jiménez E., Mader I., Rodríguez J.M., Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2014. V. 59. Pp. 78-88.
 19. Westerlund B., Korhonen T. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrices // Mol. Microbiol. 1993. V. 9. Pp. 687-694.
 20. World Health Organization. Mastitis: causes and management. – Geneva: WHO, 2000.
- ### References
1. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty). Ch. 2 [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs (immunobiological drugs). Part 2]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K. 2012. 536 p. (In Russian).
 2. Brouillette E., Talbot B., Malouin F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of Mastitis. Infect. Immun. 2003. V. 71. No. 4. Pp. 2292-2295.
 3. Brouillette E., Martinez A., Boyll B., et al. Persistence of a *Staphylococcus aureus* Small-colony variant under antibiotic pressure *in vivo*. FEMS Immunol. and med. microbiol. 2004. V. 41. Issue 1. Pp. 35-41.
 4. Delgado S., Arroyo R., Jiménez E., et al. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. BMC Microbiol. 2009. V. 9. Pp. 82-85.
 5. Delgado S., Arroyo R., Jiménez E., et al. Infectious mastitis during lactation: an underrated condition (I). Acta Pediatrica Espanola. 2009. V. 67. Pp. 77-84.
 6. Delgado S., Garcia P., Fernandez L., Jimenez E., Rodriguez-Banos M., Del Campo R., Rodriguez J.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. FEMS immunological and medical microbiology. 2011. V. 62. Pp. 225-235.
 7. Fernández L., Arroyo R., Espinosa I., Marín M., Jiménez E., Rodríguez J.M. Probiotics for human lactational mastitis. Benef. Microb. 2014. V. 5. Pp. 169-183.
 8. Indrio F., Neu J. The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics. Cur. Opin. Pediatr. 2011. V. 23. No. 2. Pp. 145-150.
 9. Jost T., Lacroix C., Braegger C., Rochat F., Chassart C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breast-feeding. Environmental Microbiology. 2013. doi:10.1111/1462-2920.12238.
 10. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 1998. V. 339. Pp. 520-532.
 11. Lehri B., Seddon A., Karlyshev A. Potential probiotic-associated traits revealed from completed high quality genome sequence of *Lactobacillus fermentum* 3872. Standards in Genomic Sciences. 2017. doi:10.1186/s40793-017-0228-4.
 12. Lehri B., Seddon A., Karlyshev A. *Lactobacillus fermentum* 3872 genome sequencing reveals plasmid and chromosomal genes potentially involved in a probiotic activity. FEMS Microbiol. Let. 2015. V. 362. Pp. 1-5.
 13. Martin V., Maldonado A., Moles L., et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. J. of Human Lactation. 2012. V. 28. Pp. 36-44.
 14. Ramiah K., van Reenen C., Dicks L. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. Res. Microbiol. 2008. V. 6. Pp. 470-475.
 15. Saiman L., Okeefe M., Graham P., Wu F., et al. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. Clin. Infect. Dis. 2003. V. 37. Pp. 1313-19.
 16. Schoenfelder S.M., Lange C., Eckart M., Henning S., Kozytska S., Ziebuhr W. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. Int. J. of Medical Microbiology. 2010. V. 300. Pp. 380-386.
 17. Sears P.M., McCarthy K.K. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2003. V. 19. Pp. 93-108.
 18. Soto A., Martín V., Jiménez E., Mader I., Rodríguez J.M., Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2014. V. 59. Pp. 78-88.
 19. Westerlund B., Korhonen T. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrices. Mol. Microbiol. 1993. V. 9. Pp. 687-694.
 20. World Health Organization. Mastitis: causes and management. Geneva: WHO, 2000.

Antagonistic activity of a consortium of strains *Lactobacillus fermentum* BKM B-2793D and *Lactobacillus reuteri* BKM B-3144D isolated from human milk to mastitis-inductioning pathogens

**V.M. Abramov, V.S. Khlebnikov, I.V. Kosarev, T.V. Priputnevich,
L.A. Lyubasovskaya, R.N. Vasilenko, V.K. Sakulin, V.N. Karkischenko,
N.N. Karkischenko, S.Yu. Pchelintsev, A.V. Karlyshev, V.A. Samojlenko,
A.V. Machulin**

The aim of the study was to study the antagonistic activity of strains of *Lactobacillus fermentum* BKM B-2793D, *Lactobacillus reuteri* BKM B-3144D isolated from human breast milk and their consortium to pathogens that cause mastitis during the lactation period. The lactobacilli and their consortium reveal antimicrobial activity against the indicator microorganisms used in this study including pathogens resistant to antibiotics. The consortium protects human mammary gland MCF-7 cells against adhesion and colonization by *Staphylococcus aureus* 8325-4. The obtained results suggest that lactobacilli from breast milk of healthy woman *L. fermentum* BKM B-2793D and *L. reuteri* BKM B-3144D and their consortium are excellent candidates for the development of probiotic preparation for prophylactics and treatment of lactational mastitis.

Key words: lactobacilli of human milk, antagonistic activity, biomodelling.

Нарушения сердечного ритма при ингаляции бутана

Г.С. Тархнишвили¹, Г.Д. Капанадзе², И.А. Берзин³

¹ – ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва

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

³ – Федеральное медико-биологическое агентство, Москва

Контактная информация: Тархнишвили Георгий Сергеевич, tarkhnishvili@sudmedmo.ru

В связи с повсеместным распространением табакокурения и аксессуаров для него, множество подростков в мире и в нашей стране ингалируют газ для заправки зажигалок (бутан), данное явление носит название «сниффинг». Некоторые из ингалирующих бутан внезапно умирают, часто – при совершении активных действий. Бутан – ингаляционный наркотик, который сенситизирует миокард к аритмогенным эффектам катехоламинов. В экспериментах на крысах был показан аритмогенный и вторичный ишемический эффект при ингаляции бутана.

Ключевые слова: бутан, ингаляционный наркотик, гиперadreналинемия, аритмия, лабораторные крысы.

Введение

На сегодняшний день все большую актуальность приобретают вопросы химической безопасности в связи с увеличением использования в промышленности и быту химических веществ, представляющих токсическую опасность для организма человека [4]. Растет и частота случаев острых бытовых отравлений, которые чаще возникают в результате непреднамеренного приема либо воздействия на человека химических веществ, обладающих достаточно высокой токсичностью [1].

Сжиженный бутан из баллонов для заправки зажигалок ингалируется подростками-токсикоманами для достижения эйфории. Данное явление в западных странах получило название «сниффинг» и известно еще с 70-х гг. прошлого столетия [7].

Бутан, как и остальные низшие члены его гомологического ряда, является ингаляционным наркотиком [2]. Согласно наиболее доказательной и общепринятой мембранной теории наркоза [5], молекулы анестетика влияют на мембраны клеток, изменяя потенциал действия путем нарушения трансмембранного обмена ионов, в т.ч. ионов кальция. В результате происходит сенситизация миокарда к аритмогенным эффектам катехоламинов (адrenalина).

Целью нашего исследования явилось изучение последствий ингаляции бутана на изменение сердечного ритма у лабораторных крыс в эксперименте.

Материалы и методы

Для моделирования остро наступившей смерти при ингаляции бутан-содержащих газовых смесей были прове-

дены эксперименты на лабораторных животных. Эксперименты проводились на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА России на самцах крыс Wistar ($n=40$) массой 300-350 г. Животные содержались в условиях вивария в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» при стандартном комбикормовом питании и свободном доступе к воде. Животные находились в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C, относительная влажность воздуха 60-70%.

При проведении эксперимента следовали требованиям утвержденного плана исследования и стандартным операционным процедурам (СОП). Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. В период исследования каждое животное ежедневно осматривалось. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных.

Для моделирования острого отравления животные помещались в фиксирующее устройство (модернизированная пластиковая бутылка объемом 0,5 л). После того, как животное успокаивалось, ему на лапки наносили гель, закрепляли электроды типа «крокодил», записывали электрокардиограмму в I, II, III стандартных отведениях. После процедуры животное помещалось в затравочную камеру, в которую подавался бутан из баллона для заправки зажигалок. По массе введенного газа рассчитывалась концентрация его в затравочной камере. Для исключения гипоксии в затравочную камеру добавлялся чистый кислород. В течение эксперимента осу-

ществлялось наблюдение с фиксацией, запись ЭКГ на ключевых этапах.

Экспериментальные животные были разделены на три группы: I группа – животные, которым ингалировался бутан; II группа – животные, которым ингалировался бутан на фоне искусственной гиперadreналинемии путем введения внутрибрюшинно эпинефрина (адреналина) в концентрации 50 мкг/кг; III группа – животные, которым ингалировался бутан на фоне адrenoблокатора (метопролол).

До начала эксперимента записывались фоновые электрокардиографические параметры и частота сердечных сокращений (ЧСС) интактных животных. Среднее значение ЧСС составило 521,9 уд./мин (ДИ 95% = 510,6-533,2).

Затем животных помещали в затравочную камеру, вводили в неё бутан из баллона для заправки зажигалок до достижения концентрации 380-450 мл/л. Животные на протяжении эксперимента большую часть времени находились в сознании, в неподвижности, подергивали конечностями, издавали негромкие звуки. Утрата сознания у животных четко совпадала с патологическими изменениями на электрокардиограмме.

В качестве объективных параметров для оценки работы сердца были использованы:

- длина (длительность) интервалов PQ и QT, комплекса QRS (в мс);
- амплитуда зубцов R, S, интервала ST (в мВ);
- ЧСС.

Результаты исследований

В норме (интактные крысы) выбранные нами параметры имели следующие величины (табл. 1).

Таблица 1

Показатели работы сердца интактной группы крыс

Показатель	PQ (мс)	QRS (мс)	QT (мс)	R (мВ)	S (мВ)	ST (мВ)	ЧСС (уд./мин)
Среднее значение	28,5	41,7	81,1	0,25	0,042	0,1525	521,90
Отклонение	2,5	2,7	3,1	0,03	0,020	0,0235	13,86

У интактных крыс, которым ингалировался бутан (группа 1), патологические изменения начинались в среднем на 3-5-й минутах экспозиции и характеризовались полиморфностью проявлений. В первую очередь выявлялось повышение амплитуды зубцов в 2-3 раза, появление патологических Q-зубцов амплитудой до 0,6 мВ, атриовентрикулярная блокада, расщепление R-зубцов, желудочковые экстрасистолы, фибрилляция предсердий.

Во всех случаях при ингаляции бутана было отмечено увеличение интервалов PQ, QRS и QT, повышение вольтажа зубцов R, S и ST (табл. 2).

В наибольшей степени при ингаляции бутана страдает проведение импульса по желудочкам и фаза реполяризации желудочков. Помимо этого, удлинение интервала QT является предиктором развития фатальных аритмий [3] (пируэт-тахикардия, фибрилляция желудочков). Интервал QT отражает продолжительность электрической активности миокарда желудочков (как в

фазу деполяризации, так и реполяризации), а его удлинение означает замедленную и асинхронную реполяризацию миокарда желудочков. Негомогенность процессов реполяризации в миокарде обуславливает его электрическую нестабильность, что и является причиной развития аритмий [6]. В группе 1 смерть животных наступала в среднем на 6-8-й мин после начала эксперимента. Критерием смерти нами считалось апноэ при резком урежении ритма сердца и снижении амплитуды зубцов.

В следующем эксперименте животным (группа 2) перед ингаляцией бутана вводили внутривенно эпинефрин (адреналин) с целью моделирования стрессовой гиперadreналиемии. Эпинефрин вводился в дозе 50 мкг/кг (максимальная доза эпинефрина, не вызывающая некроза миокарда). Изменения на электрокардиограмме в группе 2 наступали в среднем на 2-3-й мин и характеризовались еще большей полиморфностью, нежели в группе 1. Наблюдались: АВ-блокада, резкое увеличение

Таблица 2

Показатели работы сердца крыс при ингаляции бутана

Показатель	PQ (мс)	QRS (мс)	QT (мс)	R (мВ)	S (мВ)	ST (мВ)	ЧСС (уд./мин)
Среднее значение	45	77,5	109,5	0,575	0,240	0,305	535,5
Отклонение	2	4,5	5,6	0,110	0,072	0,047	18,0

амплитуды зубцов, идиовентрикулярный ритм, двунаправленная желудочковая аритмия, появление глубоких Q- и S-зубцов, депрессия ST-сегмента, фибрилляция предсердий.

Гибель экспериментальных животных из группы 2 наступала в среднем на 4-5-й мин эксперимента. Во второй группе (ингаляция бутаном в сочетании с действием адреналина) отличия наблюдались по всем признакам, кроме длительности периода PQ (табл. 3).

Для адреналина характерно удлинение интервала QT на фоне препаратов, увеличивающих интервал QT, что напрямую связано с нарушением процессов реполяризации желудочков. Несмотря на небольшое увеличение ЧСС на фоне введения эпинефрина, длительность желудочкового комплекса оказалась достоверно увеличенной, притом, что интервал PQ, отражающий электрическую активность миокарда предсердий, не претерпел достоверных изменений, кроме случаев фибрилляции предсердий. Предположительно, это мо-

жет быть связано как с АВ-блокадой, так и с появлением эктопического очага возбуждения в желудочках. С появлением такого очага возбуждения связан также двунаправленный характер идиовентрикулярного ритма, который регистрировался в группе 2.

Для проверки гипотезы о достоверном влиянии адренергических механизмов на патогенез аритмических повреждений миокарда при ингаляции бутана в группе 4 мы перед ингаляцией бутана вводили экспериментальным животным внутривенно адреноблокатор (метопролол). На фоне введения метопролола при ингаляции бутана животные вели себя гораздо спокойнее, первые изменения на ЭКГ у них наступали в среднем на 5-6-й мин экспозиции, при этом смерть животных не наступала даже при 20-минутной экспозиции. На кардиограмме регистрировались низкие зубцы комплексов, некоторое снижение ЧСС. В этой группе значимых отличий не зарегистрировано, средние значения приблизительно соответствовали норме (табл. 4).

Таблица 3

Показатели работы сердца крыс при отравлении бутаном в сочетании с действием адреналина

Показатель	PQ (мс)	QRS (мс)	QT (мс)	R (мВ)	S (мВ)	ST (мВ)	ЧСС (уд./мин)
Среднее значение	23,5	78,0	112,5	0,710	0,37	0,34	587,20
Отклонение	4,2	4,8	6,5	0,188	0,08	0,06	17,92

Таблица 4

Показатели работы сердца крыс при ингаляции бутана в сочетании с действием метопролола

Показатель	PQ (мс)	QRS (мс)	QT (мс)	R (мВ)	S (мВ)	ST (мВ)	ЧСС (уд./мин)
Среднее значение	27,5	44,0	80	0,420	0,075	0,2325	484
Отклонение	3,0	11,6	12	0,124	0,065	0,1040	26

При детальном анализе электрокардиограмм группы 3 нами отмечено повышение ST-сегмента выше изолинии практически во всех случаях, что является наглядным показателем острой ишемии миокарда. У 50% животных из группы 3 на электрокардиограмме фиксировалась фибрилляция предсердий.

Из анализа электрокардиограмм группы 3, где нами искусственно было смоделировано состояние экспериментального животного со сниженным адренергическим влиянием на миокард, явно следует ишемическое действие бутана на миокард, которое наглядно проявляется на фоне исключения аритмогенных влияний адреналина. Таким образом, продемонстрировано прямое ишемическое действие бутана на миокард.

Для оценки достоверности результатов разных вариантов отравления крыс и нормальных показателей (интактные

крысы) использовали t-критерий Стьюдента. Полученные статистические данные представлены в табл. 5-7.

Поскольку доверительный коэффициент для исследований отравлений бутаном составил 2,1009, значимыми результатами явились следующие:

- удлинение длительности интервала PQ в 1,6 раза;
- удлинение длительности комплекса QRS в 1,9 раза;
- удлинение длительности интервала QT в 1,4 раза;
- увеличение амплитуды зубца R в 2,3 раза;
- значительное увеличение амплитуды зубца S в 5,7 раза.

Значимые результаты исследований отравлений бутаном в сочетании с действием адреналина:

- удлинение длительности комплекса QRS в 1,9 раза;

Таблица 5

Различия показателей в сравниваемых группах интактных крыс и крыс с отравлением бутаном (t-критерий Стьюдента)

PQ (мс)	QRS (мс)	QT (мс)	R (мВ)	S (мВ)	ST (мВ)	ЧСС (уд./мин)
5,15	6,82	4,44	2,85	2,65	2,90	0,60

Таблица 6

Различия показателей в сравниваемых группах интактных крыс и крыс с отравлением бутаном в сочетании с действием адреналина (t-критерий Стьюдента)

PQ (мс)	QRS (мс)	QT (мс)	R (мВ)	S (мВ)	ST (мВ)	ЧСС (уд./мин)
1,02	6,59	4,36	2,42	3,98	2,91	2,88

Таблица 7

Различия показателей в сравниваемых группах интактных крыс и крыс с отравлением бутаном в сочетании с действием метопролола (t-критерий Стьюдента)

PQ (мс)	QRS (мс)	QT (мс)	R (мВ)	S (мВ)	ST (мВ)	ЧСС (уд./мин)
0,26	0,19	0,09	1,33	0,49	0,75	1,29

- удлинение длительности интервала QT в 1,4 раза;
- увеличение амплитуды зубца R в 2,8 раза;
- резкое увеличение амплитуды зубца S в 8,8 раза;
- незначительное увеличение ЧСС.

Проведенный статистический анализ интактных крыс и крыс с отравлением бутаном в сочетании с действием метопролола подтверждает факт отсутствия существенных различий по выбранным параметрам. Данный факт указывает на то, что метопролол устраняет аритмогенное влияние бутана на проводящую систему сердца и собственно на миокард.

Таким образом, достоверными данными, указывающими на токсическое действие бутана на миокард и проводящую систему сердца, являются:

- удлинение длительности интервала PQ в 1,6 раза;
- удлинение длительности комплекса QRS в 1,9 раза;
- удлинение длительности интервала QT в 1,4 раза;
- увеличение амплитуды зубца R в 2,3 раза;
- увеличение амплитуды зубца S в 5,7 раза.

Выводы

При ингаляции бутана лабораторным крысам наблюдаются выраженные нарушения ритма сердечных сокращений в виде фибрилляций предсердий, удлинения интервала PQ, АВ-блокада, двунаправленная желудочковая аритмия по типу «пируэт», удлинение интервала QT более чем на 30%, значительное повышение амплитуды желудочковых зубцов. Указанные изменения гораздо

более выражены на фоне гиперadreналиемии. Удлинение интервала QT является известным предиктором фатальных желудочковых аритмий. Наличие столь выраженных изменений в проводящей системе крысы, как одного из основных видов лабораторных животных, хорошо объясняет фатальный характер электрофизиологических изменений в миокарде человека при ингаляции бутана.

Список литературы

1. *Батоцurenov Б.В.* Патогенетические основы интенсивной терапии неспецифических поражений в ранней фазе острых отравлений нейротропными ядами: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб. – 2002.
2. *Лазарев Н.В.* Вредные вещества в промышленности. – М.: Химия. – 1976. – Т. 1. – С. 11-14.
3. *Лиманкина И.Н.* Синдром удлиненного интервала QT и проблемы безопасности психофармакотерапии // Вестник аритмологии. – 2008. – № 52. – С. 66-71.
4. *Литвинов А.А., Остапенко Ю.Н., Казачков В.И. и др.* Анализ зарубежных и отечественных статистических данных по острым химическим отравлениям // Токсикол. вестн. – 1997. – № 5. – С. 5-12.
5. *Полушин Ю.С.* Руководство по анестезиологии и реаниматологии. – СПб, 2004. – 207 с.
6. *Хэмpton Дж.Р.* Основы ЭКГ: пер. с англ. – М.: Медицинская литература. – 2007. – 100 с.
7. *Bass M.* Sudden sniffing death // JAMA. – 1970. – No. 212(12). – Pp. 2075-2079.

References

1. *Batocyrenov B.V.* Patogeneticheskie osnovy intensivnoj terapii nespecificheskikh porazhenij v rannej faze ostryh otravlenij nejrotroponnymi yadami [Pathogenetic basis of intensive therapy of nonspecific lesions in the early phase of acute poisoning with neurotropic poisons]: avtoref. dis. ... d-ra med. nauk [the author's abstract of the dissertation ... of the Doctor of medical sciences]. Saint Petersburg. 2002. (In Russian).
2. *Lazarev N.V.* Vrednye veshchestva v promyshlennosti [Hazardous substances in industry]. Moscow: Khimiya. 1976. V. 1. Pp. 11-14. (In Russian).

3. **Limankina I.N.** Sindrom udlinyonnogo intervala QT i problemy bezopasnosti psihofarmakoterapii [Long QT interval syndrome and psychopharmacotherapy safety problems]. Vestnik aritmologii [Bulletin of arrhythmology]. 2008. No. 52. Pp. 66-71. (In Russian).
4. **Litvinov A.A., Ostapenko Yu.N., Kazachkov V.I., et al.** Analiz zarubezhnyh i otechestvennyh statisticheskikh dannyh po ostrym himicheskim otravleniyam [Analysis of foreign and domestic statistics on acute chemical poisoning] Toksikol. vestn. [Toxicological Bulletin]. 1997. No. 5. Pp. 5-12. (In Russian).
5. **Polushin Yu.S.** Rukovodstvo po anesteziologii i reanimatologii [Guide to anesthesiology and intensive care]. Saint Petersburg, 2004. 207 p. (In Russian).
6. **Hempton Dzh.R.** Osnovy EKG: per. s angl. [Basics of ECG: translation from English]. Moscow: Medicinskaya literatura. 2007. 100 p. (In Russian).
7. **Bass M.** Sudden sniffing death. JAMA. 1970. No. 212(12). Pp. 2075-2079.

Heart rhythm disorders of butane inhalation

G.S. Tarhnishvili, G.D. Kapanadze, I.A. Berzin

Due to the widespread use of tobacco and accessories for it, a lot of teenagers in the world and in our country inhibit the gas to refuel lighters (butane), this phenomenon is called “sniffing”. Under the influence of butane there are cases of sudden death, often associated with physical exertion. Butane is an inhalant drug that sensitizes the myocardium to the arrhythmogenic effects of catecholamines. In experiments on rats, an arrhythmogenic and secondary ischemic effect was shown with inhalation of butane.

Key words: butane, inhalant drug, hyperadrenalemia, arrhythmia, laboratory rats.

Морфологическая характеристика мышц голени в условиях высокоскоростного дистракционного остеосинтеза в сочетании с внутрикостным титановым стержнем, напылённым гидроксиапатитом

А.В. Попков, Г.Н. Филимонова, Н.А. Кононович, Е.Н. Горбач, Д.А. Попков

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

Контактная информация: к.б.н. Филимонова Галина Николаевна, galnik.kurgan@yandex.ru

Цель работы – сравнение морфофункциональных характеристик мышц голени при автоматическом высокоскоростном удлинении с повышенным темпом и в комбинации с внутрикостным армированием титановой спицей с гидроксиапатитным напылением.

Основные эксперименты выполнены на беспородных собаках обоего пола в возрасте скелетной зрелости, у которых осуществляли удлинение голени круглосуточным автодистрактором в темпе 3,0 мм в течение 10 суток. У животных группы № 1 шаг автодистрактора был 0,025 мм за 120 приёмов. Под общим наркозом осуществляли интрамедуллярное армирование большеберцовой кости спицей из титанового сплава (Ti6Al 4V) толщиной 1,8 мм с покрытием гидроксиапатитом по технологии микродугового оксидирования, осуществляли остеосинтез аппаратом Илизарова и поперечную остеотомию большеберцовой кости. Период фиксации аппаратом Илизарова в среднем составил 14 дней (минимальный – 4 дня). В группе № 2 шаг автодистрактора был равен 0,017 мм за 180 приёмов, а период фиксации в среднем был 45 дней (минимальный – 30 суток). По окончании дистракции и через 3 мес. после снятия аппарата исследовали переднюю большеберцовую мышцу. Животные группы № 1 активно использовали опытную конечность с первых дней дистракции, период фиксации был сокращён в 2 раза. Макропрепараты мышц животных группы № 1 фактически не различались на опытной и контралатеральной конечностях. Гистоструктура мышцы в обеих группах характеризовалась признаками активизации ангио- и миогистогенеза, но у собак в группе № 1 объёмная плотность микрососудов была выше в 3 раза в периоде удлинения. Сделан вывод о том, что метод высокоскоростной автодистракции конечности в сочетании с интрамедуллярным армированием титановой спицей с гидроксиапатитным напылением оказывает активирующее воздействие на ангио- и миогенез: гистоструктурные характеристики большеберцовой мышцы свидетельствуют о преобладании процессов репаративной регенерации по типу реституции. В результате сохраняется функциональная активность конечности с первых дней дистракции, а период фиксации сокращается вдвое.

Ключевые слова: мышцы, автодистракция, интрамедуллярное армирование, гидроксиапатитное покрытие.

Введение

Проблема укорочения нижних конечностей, составляющая более половины всех пороков развития опорно-двигательной системы, особенно актуальна в детском возрасте [1, 6]. При удлинении конечностей, как правило, выбирают

метод чрескостного дистракционного остеосинтеза по Илизарову [7, 12]. Несмотря на универсальность, этот метод, как и любой другой, не исключает возможности формирования различного рода осложнений при его использовании [22]. В РНЦ «ВТО» им. акад. Или-

зарова с 1981 г. пристальное внимание ученых направлено на разработки и внедрение в клиническую практику вариантов автоматического удлинения костей конечностей [7]. Доказана возможность увеличения скорости автоматической дистракции до 3,0 мм в сутки, при этом известно, что активность остеогенеза не претерпевают существенных изменений по сравнению с суточным темпом 1,0 мм [3, 8]. Таким образом, был уменьшен период дистракции, однако период фиксации аппаратом Илизарова и период реабилитации до полноценного функционирования конечности оставался довольно продолжительным. С появлением новых технологий стимуляции репаративного остеогенеза различными методами, включая варианты с использованием интрамедуллярных имплантатов, покрытых биоактивным слоем [5, 9, 19], появилась возможность сократить сроки периода фиксации голени в аппарате более чем в 2 раза. В восстановительной хирургии используются титан и его сплавы в качестве зубных и ортопедических имплантатов вследствие их превосходной биосовместимости с костной тканью [11]. В стремлении ускорить остеоинтеграцию ведутся разработки биоактивных покрытий – в частности, гидроксиапатита, который наносится на поверхность имплантата различными методами [2]. Известно, что такие кристаллические модификации TiO_2 , как анатаз и рутил, обладают биоактивными свойствами, проявляющимися в их ускоренной остеоинтеграции. Следует отметить, что предпочтение отдается оксиду титана с кристаллической структурой анатаз [21]. При этом в доступной литературе не найдены данные о морфологических

особенностях параоссальных тканей (в частности, поперечнополосатых мышц) в подобных условиях комбинированного остеосинтеза.

Цель работы – сравнение морфофункциональных характеристик мышц голени при автоматическом высокочастотном удлинении с повышенным темпом и в комбинации с внутрикостным армированием титановой спицей с гидроксиапатитным напылением.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на 18-ти беспородных собаках обоего пола в возрасте скелетной зрелости и массой 15-20 кг, у которых осуществляли удлинение голени в условиях круглосуточной высокочастотной автодистракции с темпом 3,0 мм в течение 10-ти сут.

Для этого в I группе ($n=10$) в условиях операционной животным под внутривенным наркозом осуществляли интрамедуллярное армирование большеберцовой кости спицей из титанового сплава (Ti6Al 4V) толщиной 1,8 мм с гидроксиапатитным покрытием, нанесенным методом микродугового оксидирования. После этого осуществляли остеосинтез аппаратом Илизарова. Для монтажа аппарата использовали 6 чрескостно введенных спицевых фиксаторов. При этом исключали прохождение последних через переднюю большеберцовую мышцу. Далее осуществляли поперечную остеотомию костей голени долотом.

Для профилактики послеоперационных воспалительных реакций животным вводили цефазолин по 0,5 г внутримышечно 2 раза в день в течение 7-ми дней.

Во II группе (n=8) армирования большеберцовой кости не выполняли. Кости голени фиксировали при помощи 8-ми спиц, одна из которых проходила через брюшко передней большеберцовой мышцы. После операции собакам вводился цефазолин в режиме, аналогичном таковому в I группе животных.

Через 7 сут после операции начинали удлинение голени. По окончании периода удлинения высота диастаза составляла 29-30 мм, что соответствовало 14-16% от исходной длины сегмента.

Раны вокруг спиц в обеих группах животных контролировали ежедневно. После поперечной остеотомии большеберцовой кости через 7 дней начинали удлинение голени посредством автодистрактора: дробность distraction в I группе составила 0,025 мм за 120 приёмов, во II группе – 0,017 мм за 180 приёмов в сутки, что позволило увеличить длину голени на 3 см. За животными наблюдали в течение трёх мес. после операции. Демонтаж аппарата Илизарова осуществляли после консолидации, когда минерализация distractionного регенерата по результатам рентгенографии достигала оптической плотности прилежащих костных фрагментов, а клиническая проба «ротационная и флекссионная нагрузка» показывала отсутствие какой-либо подвижности в зоне удлинения. В I группе этот период в среднем составил 14 сут (4-21), во II группе – был не менее 30 сут (в некоторых случаях – до 45-ти). Спицы, введенные в костномозговой канал, не извлекали на протяжении прижизненных наблюдений за животными.

Гистологические исследования передней большеберцовой мышцы осуществляли по окончании периода ди-

стракции и через 90 сут после снятия аппарата Илизарова. Для независимого контроля, как уже отмечалось выше, исследовали переднюю большеберцовую мышцу интактных животных (n=3), составивших интактную группу. Для гистологического анализа фрагмент мышцы, взятый в проекции костного регенерата, фиксировали в смеси равных объёмов 2% глутарового и параформальдегида, после проводки заливали в парафин. Часть материала постфиксировали в 1% осмиевой кислоте, полимеризовали в эпоксидных смолах. Парафиновые срезы изготавливали на микротоме «Bromma-2218» LKB (Швеция), окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Массону. Полутонкие срезы получали с помощью ультратома Nova LKB (Швеция), окрашивали по М. Ontell (использованы для стереометрии). Гистологические препараты исследовали с помощью стереомикроскопа «AxioScore.A1», получая изображения посредством цифровой камеры «AxioCam» («Carl Zeiss MicroImaging GmbH», Германия). С целью проведения стереологического анализа мышечной ткани в программе «PhotoFiltre» произведён сбор первичных данных, рассчитана объемная плотность ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$) мышечных волокон (VV_{MB}), микрососудов (VV_{MC}), эндомизия ($VV_{\text{ЭНД}}$), индекс васкуляризации, как отношение числа микрососудов к числу мышечных волокон ($I_{\text{ВАСК}} = NA_{\text{МСД}} / NA_{\text{МВ}}$). Данные анализировали методами непараметрической статистики в программе «AtteStat», версия 10.8.8, встроенной в Microsoft Excel, достоверность различий определяли на основании W-критерия Вилкоксона для независимых выборок.

Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), в соответствии с принципами лабораторной практики (NIH Publication no. 85-23, revised 1985) и были одобрены Комитетом по этике ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова». Животных эвтаназировали путём внутривенного введения летальной дозы тиопентала натрия в расчёте 60 мг/кг массы тела животного.

Результаты исследований

В обеих группах у животных сохранялась опорная функция оперированной конечности. Не было отмечено неврологических и инфекционных осложнений, а также гибели животных. В I группе отеков конечности и функциональных нарушений со стороны смежных суставов не было. Во II группе в некоторых случаях на этапе периода удлинения отмечали формирование эквинусной постановки стопы. После прекращения фиксации аппаратом Илизарова функция голеностопного сустава восстанавливалась.

Посредством визуального анализа макропрепаратов большеберцовых мышц было выявлено, что у животных I группы мышцы обеих конечностей фактически не различались по насыщенности цвета и объёму, будучи ярко-малиновыми. У собак во II группе мышца опытной конечности, как правило, имела меньший объём и бледно-розовый цвет. Поверхностная фасция опытной берцовой мышцы у животных I группы была более тонкой и прозрач-

ной, в отличие от уплотнённой фасции и нередко наблюдавшихся спаек при препарировании мышц собак из II группы, что могло быть связано с используемым вариантом фиксации концов отломков, когда через брюшко мышцы проводили спицефиксатор.

При гистологическом анализе в мышцах собак I группы через 10 сут автодистракции большинство полей зрения имело нормальную гистоструктуру: идентифицировались метаболические типы волокон, их профили сохраняли полигональность, соединительнотканые прослойки были несколько увеличены, сосуды перимизия – без патологии (рис. 1а). Для некоторых пучков мышечных волокон был характерен заметный фиброз эндо- и перимизиального пространства, сосуды артериального звена имели массивный средний слой и увеличенный адвентициальный (рис. 1б). Во фрагментах мышцы с признаками активной пластической реорганизации профили мышечных волокон утрачивали свою полигональность, существенно возрастала полиморфность их диаметров, отмечались деструктивно изменённые, многочисленные мелкие волокна (рис. 1в). Число активированных ядер в волокнах возрастало, отмечались миобласты, цепочки и группы ядер. Встречались единичные контрактурно изменённые волокна, небольшие лаброциты с мелкими гранулами. Количество пучков мышечных волокон с нормальной гистоструктурой составило 73,7%, фиброзированных – 26,3%. Большинство сосудов перимизия имели нормальное строение (81,7%), с закрытым просветом составили 6,1%, а с признаками адвентициального фиброза – 12,3%.

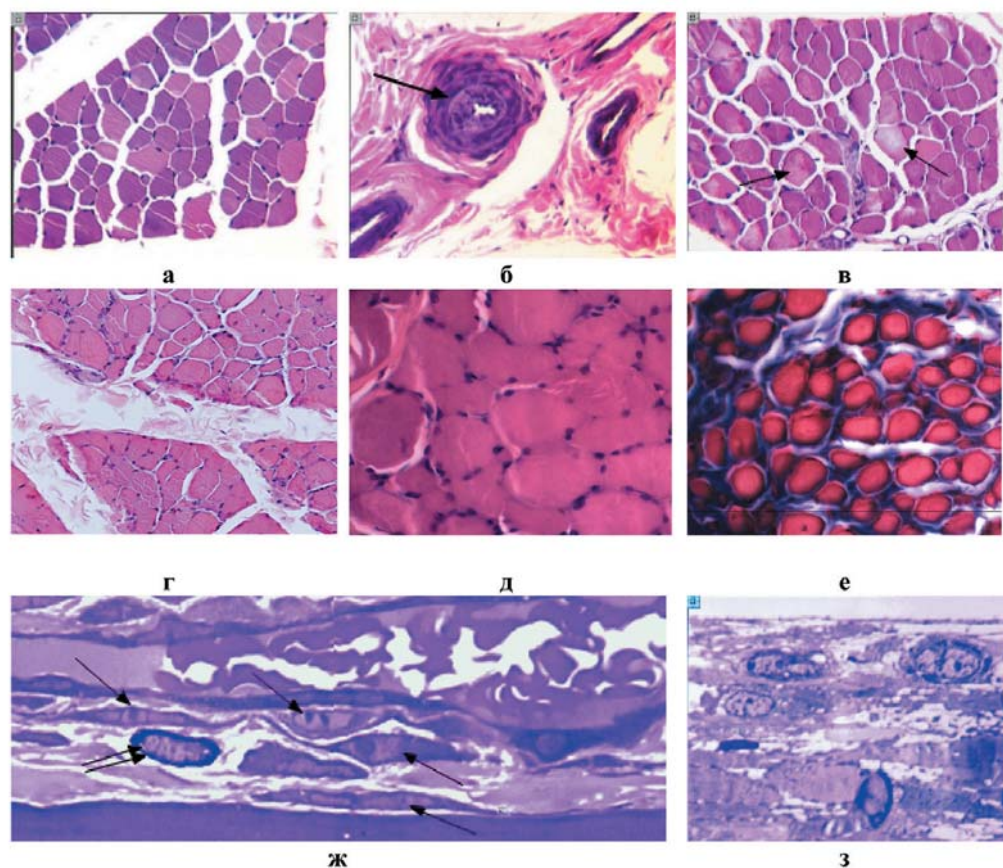


Рис. 1. Конец дистракции. Гистоструктура передней большеберцовой мышцы животных I группы (а-в) и II группы (г-з): а – волокна типированы, полигональные профили; б – перимизимальные сосуды с признаками фиброза, в артериях массивный средний слой (стрелка); в – фрагмент в состоянии структурной реорганизации, повышенная вариативность диаметров, деструктивно изменённые волокна (стрелки); г – сохраняются полигональные профили, утолщенный перимизий; д – отек в эндомизии (стрелка); е – округлые профили волокон; ж – фибробласты в интерстициальном пространстве расположены в направлении вектора напряжения растяжения (стрелки), тучная клетка (двойная стрелка); з – массовая дегенерация мышечных волокон. Парафиновые срезы (а-е); а-д – окраска гематоксилин-эозином, е – по Массону, ув. x200, д – x400. Нижняя строка – полутонкие срезы, окраска по М. Ontell, ув. 1250х.

Во II группе животных в мышце наблюдались изменения аналогичного характера, но большей степени выраженности. Чаше встречались волокна с контрактурами различной степени, отмечались картины сохранения отеочно-сти эндомизия (рис. 1д), фиброза пери-

мизимального пространства (рис. 1г, е), множественные фибробласты в котором ориентировались в направлении вектора напряжения растяжения, были нередко крупные лаброциты (рис. 1ж), а также картины массовой дегенерации мышечных волокон (рис. 1з). Количест-

во пучков мышечных волокон с сохранной гистоструктурой составило 66,4%, фиброзированных – 28,6%, дегенерирующих – 5%.

По данным стереометрии к концу дистракции в большеберцовой мышце животных I группы объёмная доля микрососудов, эндомизия и мышечных волокон составили 240%, 250% и 85% от интактных значений, соответственно ($p \leq 0,05$). Во II группе объёмная плотность микрососудов не отличалась достоверно от интактного параметра, доля эндомизия была в 2 раза ниже, объёмная плотность мышечных волокон – достоверно выше ($p \leq 0,05$). Индекс васкуляризации в I группе составил 90% от параметра во II группе.

Через 3 мес. после снятия аппарата для мышц I группы животных были характерны полигональные профили волокон, идентифицировались их метаболические типы, вариабельность диаметров уменьшалась относительно периода дистракции, были характерны инактивированные ядра, доля эндомизия варьировала в различных фрагментах мышцы (рис. 2а, б). Большинство перимизиальных сосудов – без признаков патологии, внутримышечные миелиновые нервные стволы имели, в основном, сохранную гистоструктуру (рис. 2в). Во II группе в мышце сохранялись адаптационные структурные изменения: повышенная вариативность диаметров, отсутствие полигональности профилей волокон,

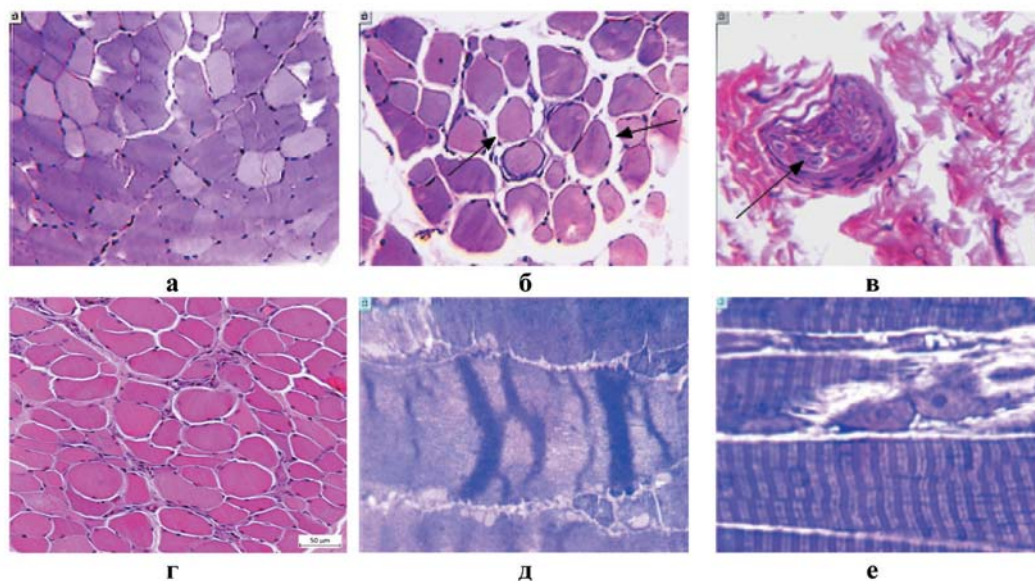


Рис. 2. 90 сут после снятия аппарата Илизарова. Гистоструктура мышцы животных I группы (верхняя строка) и II группы (нижняя строка): а – нормальная гистоструктура; б – увеличенные прослойки эндомизия (стрелки); в – нервный ствол перимизия с сохранной гистоструктурой (стрелка); г – вариативность диаметров, отсутствие полигональных профилей, прослойки эндомизия увеличены; д – контрактурно изменённое волокно; е – миобласт. Парафиновые срезы (а-г), окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 200$. Полутонкие срезы (д-е), окраска по М. Ontell, ув. $\times 1250$.

увеличенные прослойки эндомизия, волокна с признаками контрактур, парные миообласты (рис. 2г-е). По данным стереометрии объёмная доля микрососудов в группах сравнения и интактной группе не имели достоверных различий. Доля объёма мышечных волокон в обеих группах была достоверно выше, а доля эндомизия – достоверно ниже относительно интактного параметра ($p \leq 0,05$). Индекс васкуляризации снижался в обеих группах, при этом в I группе параметр составил 81% от сопоставимого значения во II группе.

Обсуждение результатов

Гистологическая картина большеберцовой мышцы в условиях distraction у животных I группы в большинстве полей зрения характеризовалась полигональностью профилей мышечных волокон, что характерно для функционально активной мышцы. Известно, что в мышцах при distractionных нагрузках имеет место неосаркомерогенез, но при высокой скорости и малодробной distraction могут появляться признаки перерастяжения саркомеров с последующим замещением мышечных волокон соединительной тканью [24]. Наличие саркомерогенеза было подтверждено и в новых работах с помощью математической модели на основе экспериментальных данных [25]. В нашей работе наличие полей зрения с признаками активной пластической реорганизации, когда мышечные волокна утрачивали полигональность и появлялось множество волокон мелкого калибра, могло свидетельствовать о появлении регенерирующих и новообразованных волокон. Большое число клеток с эухроматичными ядрами, расположенными

одиночно или группами, возможно, на наш взгляд, отнести к активированным клеткам-сателлитам-II. Для увеличения числа миосателлитоцитов достаточно легкой компрессии, воздействия холодом, кроме того, они активируются после тренировки, при денервации или растяжении, после воздействия оксидом азота [14]. Миосателлитоциты-II вблизи микрососудов выполняют трофическое обеспечение миоцитов, участвуют в ангио- и миогенезе [16]. На связь клеток-сателлитов с трофическим обеспечением мышечных волокон указывает и то, что 87% их концентрируются вблизи нервно-мышечных синапсов [23]. Установлено, что при distraction конечности кроликов по 0,5 мм в день за 2 приёма клетки-сателлиты пролиферировали по всей длине *tibialis anterior muscles* [20]. При этом у взрослых особей скорость пролиферации миосателлитов составила 1780% в средней части и до 2860% – в мышечно-сухожильном соединении, у молодых особей – 210% и 290% соответственно. Считают, что distractionный остеогенез со скоростью 1,4 мм в сутки у скелетно-незрелых животных приводит к удлинению мышцы за счёт саркомерогенеза, формируя функционально активную мышцу [17]. Distraction же у взрослых животных приводит к формированию мышцы с существенным фиброзом и функциональной недостаточностью, что, возможно, является результатом частичной денервации. В др. исследованиях вопрос о продольном росте мышц при distraction предложено обсуждать в свете концепции цикла обратной связи [15]. В частности, обсуждается вопрос о роли клеток-сателлитов: анализ генных чипов даёт парадоксальное представле-

ние о том, что distractionный остеогенез приводит к усилению гена GADD45, связанного с остановкой роста и деградацией ДНК. Столь противоречивые данные подчёркивают необходимость дальнейших исследований гистогенеза мышечной ткани. Данные биохимических исследований также свидетельствуют об активизации миогистогенеза в условиях автоdistraction с высоким темпом: возрастает роль пентозо-фосфатного пути, который является одним из основных молекулярных механизмов, обеспечивающих репаративные процессы в ткани, пентозы используются для синтеза нуклеиновых кислот [10]. Адаптация скелетных мышц в ответ на автоdistraction с высоким темпом свидетельствует о гибкости молекулярных механизмов мышечной ткани, что обеспечивает её сохранность в данных условиях. Большая объёмная доля микрососудов в I группе, наряду с увеличением объёмной плотности эндомизия, является характерным признаком для растущих щенков в периоде постнатального онтогенеза [13], distraction, как известно, стимулирует неоангиогенез [4]. Вероятно, внутрикостный титановый стержень с гидроксиапатитным напылением способствует не только более быстрой и успешной регенерации костной ткани и, соответственно, функциональной активности конечности даже в периоде автоdistraction, но также благотворно влияет на пролиферативную активность мягкотканых компонентов, прилежащих к distractionному регенерату, – в частности, на большеберцовую мышцу. В некоторых работах, при ежедневной оценке количества клеток и дифференцировки остеогенных клеток методами количественной иммуноцитохимии,

выявили, что поверхность modSLA способствовала созреванию остеогенных предшественников в постмитотические остеобласты. В частности, modSLA приводила к снижению скорости пролиферации клеток, но демонстрировала высокие скорости экспрессии остеокальцина [18]. В настоящем исследовании активность животных I группы во время всего периода автоdistraction, отсутствие болевого синдрома, функциональная нагрузка на мышцы голени, очевидно, обуславливают в ходе опыта наличие в мышцах признаков, характерных для растущих щенков, отличающихся существенным увеличением стромальных элементов в целом (объёмной доли эндомизия наряду с объёмной долей микрососудов). Характерные для мышцы I группы животных единичные лаброциты с мелкими гранулами свидетельствуют об отсутствии признаков воспаления.

Выводы

Учитывая функциональное состояние животных в ходе эксперимента, гистоструктурные и стереометрические характеристики большеберцовой мышцы, можно заключить, что применяемый в медицинской практике метод высокочеткой автоdistraction конечности с высокой суточной скоростью в сочетании с интрамедуллярным армированием спицами из титановых сплавов с гидроксиапатитным покрытием, помимо остеогенеза, оказывает стимулирующее воздействие на миогистогенез. Использование данной методики в клинических условиях позволит существенно сократить сроки лечения пациентов без ущерба для функциональной активности конечности, учитывая, что

мышцы способны проявлять структурную адаптацию и пластичность по типу реституции. Тем не менее, необходимы дальнейшие экспериментальные разработки, углублённый анализ морфофункциональных характеристик как мышц, так и др. параоссальных тканей.

Список литературы

1. *Гаркавенко Ю.Е., Поздеев А.П.* Ошибки и осложнения при удлинении нижних конечностей у детей // Вестник гильдии протезистов-ортопедов. – 2004. – № 5. – С. 61-63.
2. *Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л., Хрисанфова О.А., Легостаева Е.В., Завидная А.В., Пузь А.В., Хлусов И.А.* Функциональные покрытия для имплантационных материалов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 12-19.
3. *Ерофеев С.А., Чиркова А.М.* Костеобразование при удлинении конечности с высоким темпом в условиях автоматической distraction // В сб.: Морфофункциональные аспекты регенерации и адаптационной дифференцировки структурных компонентов опорно-двигательного аппарата в условиях механических воздействий: Мат-лы Межд. науч.-практ. конф. – Курган. – 2004. – С. 94-96.
4. *Илизаров Г.А.* Некоторые проводимые нами фундаментальные исследования и их общеприкладное значение. Часть IV // Гений ортопедии. – 2015. – № 4. – С. 6-9.
5. *Кирилова И.А.* Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции // Хирургия позвоночника. – 2004. – № 3. – С. 105-110.
6. *Малахов О.А., Кожеевников О.В.* Неравенство длины нижних конечностей у детей: рук-во для врачей. – М.: Медицина. – 2008. – 351 с.
7. *Попков А.В., Коваленко Т.Н., Смирнова И.Л.* Автоматическое удлинение конечностей: проблемы и перспективы // Анналы травматологии и ортопедии. – 1995. – № 2. – С. 67-70.
8. *Попков А.В., Осипенко А.В.* Регенерация тканей при удлинении конечностей: рук-во для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2008. – 240 с.
9. *Попков А.В., Попков Д.А.* Интрамедуллярное армирование при замедленной консолидации, ложных суставах и дефектах длинных трубчатых костей // В кн.: Интрамедуллярные имплантаты при лечении переломов длинных трубчатых костей: науч.-клин. иссл. – Саарбрюккен: Palmarium Academic Publishing. – 2016. – С. 172-201.
10. *Стогов М.В., Лунева С.Н., Еманов А.А.* Особенности метаболизма тканей при удлинении конечности методом Илизарова с темпом distraction 3 мм в сутки в автоматическом режиме // Гений ортопедии. – 2008. – № 1. – С. 85-89.
11. *Тетюхин Д.В., Козлов Е.Н., Молчанов С.А., Маркеев А.М., Соловьёв А.А.* Биоактивное покрытие титанового имплантата, вводимого в костную ткань человека. Патент РФ № 0002566060. – 2017.
12. *Урьев Г.А., Соколовский О.А., Ильяевич И.А., Заровская А.В.* Удлинение верхних и нижних конечностей в режиме автоматической distraction // Развитие травматологии и ортопедии в республике Беларусь на современном этапе: Мат-лы VIII Съезда травматологов-ортопедов Республики Беларусь. – Минск. – 2008. – С. 224-226.
13. *Шевцов В.И., Филимонова Г.Н.* Передняя большеберцовая мышца собак на этапах постнатального и distractionного морфогенеза // Гений ортопедии. – 2008. – № 1. – С. 74-80.
14. *Anderson J.E.* A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells // Mol. Biol. Cell. – 2000. – V. 11. – Pp. 1859-1874.
15. *Caiozzo V.J., Utkan A., Chou R., Khalafi A., Chandra H., Baker M., Rourke B., Adams G., Baldwin K., Green S.* Effects of distraction on muscle length: mechanisms involved in sarcomerogenesis // Clin. Orthop. Relat. Res. – 2002. – V. 403. – Pp. 133-45.
16. *Christov C., Chrétien F., Abou-Khalil R.* Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners // Mol. Biol. Cell. – 2007. – V. 18. – No. 4. – Pp. 1397-1409.
17. *de Deyne P.G.* Lengthening of muscle during distraction osteogenesis // Clin. Orthop. Relat. Res. – 2002. – V. 403. Suppl. – Pp. 171-177.
18. *Klein M.O., Bijelic A., Toyoshima T., Götz H., von Koppenfels R.L., Al-Nawas B., Duschner H.* Long-term response of osteogenic cells on micron and submicron-scale-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation.

- entiation // Clin. Oral Implants Res. – 2010. – V. 21. – Pp. 642-649.
19. **Popkov D., Popkov A., Haumont T., Journeau P., Lascombes P.** Flexible intramedullary nail use in limb lengthening // J. Pediatr. Orthop. – 2010. – V. 30. – No. 8. – Pp. 910-918.
 20. **Tsujimura T., Kinoshita M., Abe M.** Response of rabbit skeletal muscle to tibia lengthening // J. Orthop. Sci. – 2006. – V. 11. – No. 2. – Pp. 185-190.
 21. **Uchida M., Kim H-M., Kokubo T., Fujibayashi S., Nakamura T.** Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid // J. of Biomedical Materials Research. – 2003. – V. 64A. – Issue 1. – Pp. 164-170.
 22. **Vargas Barreto B.** Complications of Ilizarov leg lengthening: a comparative study between patients with leg length discrepancy and short-stature // Int. Orthop. – 2007. – V. 31. – No. 5. – Pp. 587-591.
 23. **Yin H., Price F., Rudnicki M.A.** Satellite cells and the muscle stem cell niche // Physiol. Rev. – 2013. – V. 93. – No. 1. – Pp. 23-67.
 24. **Williams P., Simpson H., Kenwright J., Goldspink G.** Muscle fibre damage and regeneration resulting from surgical limb distraction // Cells Tissues Organs. – 2001. – V. 169. – No. 4. – Pp. 395-400.
 25. **Zollner A.M., Abilez O.J., Bol M., Kuhl E.** Stretching skeletal muscle: chronic muscle lengthening through sarcomerogenesis // PLoS One. – 2012. – V. 7 – No. 10. – Pp. 645-661.
- References**
1. **Garkavenko Ju.E., Pozdeev A.P.** Oshibki i oslozheniya pri udlinenii nizhnih konechnostej u detej [Errors and complications in elongation of the lower limbs in children]. Vestnik gil'dii protezistov-ortopedov [Herald of the orthopedic prosthetists guild]. 2004. No. 5. Pp. 61-63. (In Russian).
 2. **Gnedkov S.V., Sharkeev Ju.P., Sinebruhov S.L., Hrisanfova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaja A.V., Puz' A.V., Hlusov I.A.** Funkcional'nye pokrytiya dlja implantacionnyh materialov [Functional coatings for implantation materials]. Tikhookeanskij meditsinskij zhurnal [Pacific Medical J.]. 2012. No. 1. Pp. 12-19. (In Russian).
 3. **Erofeyev S.A., Chirkova A.M.** Kosteobrazovanie pri udlinenii konechnosti s vysokim tempom v usloviyah avtomaticheskoy distrakcii [Bone formation with elongation of the extremity with a high rate in conditions of automatic distraction]. V sb.: Morfofunkcional'nye aspekty regeneracii i adaptacionnoj differencirovki strukturnyh komponentov oporno-dvigatel'nogo apparata v usloviyah mehanicheskikh vozdeystvij: Mat-ly Mezhd. nauch.-prakt. konf. [In: Morphofunctional aspects of regeneration and adaptive differentiation of the structural components of the musculoskeletal system under the conditions of mechanical impacts, scientific-practical conf.]. Kurgan. 2004. Pp. 94-96. (in Russian).
 4. **Ilizarov G.A.** Nekotorye provodimye nami fundamental'nye issledovaniya i ih obshhebiologicheskoe i prikladnoe znachenie [Some fundamental research conducted by us and their general biological significance]. Part IV. Genius of orthopedics. 2015. No. 4. Pp 6-9. (In Russian).
 5. **Kirilova I.A.** Demineralizovannyj kostnyj transplantat kak stimuljator osteogeneza: sovremennye koncepcii [Demineralized bone graft as a stimulant of osteogenesis: modern concepts]. Hirurgiya pozvonochnika [Surgery of the spine]. 2004. No. 3. Pp. 105-110. (In Russian).
 6. **Malakhov O.A., Kozhevnikov O.V.** Neravenstvo dliny nizhnih konechnostej u detej: ruk-vo dlja vrachej [Length discrepancy in the lower limbs in children: a guide for doctors]. Moscow: Medicina. 2008. 351 p. (In Russian).
 7. **Popkov A.V., Kovalenko T.N., Smirnova I.L.** Avtomaticheskoe udlinenie konechnostej: problemy i perspektivy [Automatic limb lengthening: problems and prospects]. Annals of traumatology and orthopedics. 1995. No. 2. Pp. 67-70. (In Russian).
 8. **Popkov A.V., Osipenko A.V.** Regeneracija tkanej pri udlinenii konechnostej: ruk-vo dlja vrachej [Regeneration of tissues by elongation of limbs: a guide for doctors]. Moscow: GEOTAR-Media. 2008. 240 p. (In Russian).
 9. **Popkov A.V., Popkov D.A.** Intramedullarnoe armirovanie pri zamedlennoj konsolidacii, lozhnyh sustavah i defektah dlinnyh trubchatyh kostej [Intramedullary reinforcement in delayed consolidation, nonunions and defects of long tubular bones]. V kn.: Intramedullarnye implantaty pri lechenii perelomov dlinnyh trubchatyh kostej: nauch.-klin. issl. [In the book: Intramedullary implants in the treatment of fractures of long tubular bones: a scientific and clinical study]. Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing. 2016. Pp. 172-201. (In Russian).

10. *Stogov M.V., Luneva S.N., Emanov A.A.* Osobennosti metabolizma tkanej pri udlinenii konechnosti metodom Ilizarova s tempom distrakcii 3 mm v sutki v avtomaticheskom rezhime [Features of tissue metabolism by elongation of the limb with the Ilizarov method with a distraction rate of 3 mm per day in automatic mode]. *Genius of orthopedics*. 2008. No. 1. Pp. 85-89. (In Russian).
11. *Tetjukhin D.V., Kozlov E.N., Molchanov S.A., Markeyev A.M., Solov'jov A.A.* Bioaktivnoe pokrytie titanovogo implantata, vvodimogo v kostnuju tkan' cheloveka. [Bioactive coating of a titanium implant inserted into a human bone tissue]. Patent of Russian Federation No. 0002566060. 2017. (In Russian).
12. *Ur'ev G.A., Sokolovskij O.A., Il'jasevich I.A., Zarovskaja A.V.* Udlinenie verhnih i nizhnih konechnostej v rezhime avtomaticheskoy distrakcii [Elongation of the upper and lower extremities in the mode of automatic distraction]. *Razvitie travmatologii i ortopedii v respublike Belarus' na sovremennom jetape: Mat-ly VIII S'ezda travmatologov-ortopedov Respubliki Belarus'* [Development of traumatology and orthopedics in the Republic of Belarus at the present stage: materials of the VIII Congress of traumatology-orthopedists of the Republic of Belarus]. Minsk. 2008. Pp. 224-226. (In Russian).
13. *Shevcov V.I., Filimonova G.N.* Perednjaja bol'shebercovaja myshca sobak na jetapah postnatal'nogo i distrakcionnogo morfogeneza [Anterior tibial muscles of dogs at the stages of postnatal and distraction morphogenesis]. *Genius of orthopedics*. 2008. No. 1. Pp. 74-80. (In Russian).
14. *Anderson J.E.* A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol. Biol. Cell*. 2000. V. 11. Pp. 1859-1874.
15. *Caiozzo V.J., Utkan A., Chou R., Khalafi A., Chandra H., Baker M., Rourke B., Adams G., Baldwin K., Green S.* Effects of distraction on muscle length: mechanisms involved in sarcomerogenesis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002. V. 403. Pp. 133-45.
16. *Christov C., Chrétien F., Abou-Khalil R.* Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell*. 2007. V. 18. No. 4. Pp. 1397-1409.
17. *de Deyne P.G.* Lengthening of muscle during distraction osteogenesis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002. V. 403. Suppl. Pp. 171-177.
18. *Klein M.O., Bijelic A., Toyoshima T., Götz H., von Koppenfels R.L., Al-Nawas B., Duschner H.* Long-term response of osteogenic cells on micron and submicron-scale-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation. *Clin. Oral Implants Res.* 2010. V. 21. Pp. 642-649.
19. *Popkov D., Popkov A., Haumont T., Journeau P., Lascombes P.* Flexible intramedullary nail use in limb lengthening. *J. Pediatr. Orthop.* 2010. V. 30. No. 8. Pp. 910-918.
20. *Tsujimura T., Kinoshita M., Abe M.* Response of rabbit skeletal muscle to tibia lengthening. *J. Orthop. Sci.* 2006. V. 11. No. 2. Pp. 185-190.
21. *Uchida M., Kim H-M., Kokubo T., Fujibayashi S., Nakamura T.* Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. *J. of Biomedical Materials Research*. 2003. V. 64A. Issue 1. Pp. 164-170.
22. *Vargas Barreto B.* Complications of Ilizarov leg lengthening: a comparative study between patients with leg length discrepancy and short- stature. *Int. Orthop.* 2007. V. 31. No. 5. Pp. 587-591.
23. *Yin H., Price F., Rudnicki M.A.* Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. No. 1. Pp. 23-67.
24. *Williams P., Simpson H., Kenwright J., Goldspink G.* Muscle fibre damage and regeneration resulting from surgical limb distraction. *Cells Tissues Organs*. 2001. V. 169. No. 4. Pp. 395-400.
25. *Zollner A.M., Abilez O.J., Bol M., Kuhl E.* Stretching skeletal muscle: chronic muscle lengthening through sarcomerogenesis. *PLoS One*. 2012. V. 7 No. 10. Pp. 645-661.

Morphological characteristics of tibial muscles in the conditions of high rate distraction osteosynthesis in combination with intramedullary hydroxyapatite-coated titanium nail

A.V. Popkov, G.N. Filimonova, N.A. Kononovich, E.N. Gorbach,
D.A. Popkov

The purpose of this work is to compare of the morphofunctional characteristics of the lower leg muscles in conditions of transosseous distraction osteosynthesis by high-rate and high-fractional automated distraction and in combination with intraosseous reinforcement with a titanium. The main experiments were performed on mongrel dogs of both sexes at the age of skeletal maturity, lengthening of the tibia was performed with a daily autodistractor at a rate of 3.0 mm for 10 days. In the animals of group No. 1, the autodistractor step was 0.025 mm at 120 times. At the general anesthesia, intramedullary reinforcement of the tibia was a 1.8- mm titanium (Ti6Al 4V) coated with hydroxyapatite by microarc oxidation technology. Next, osteosynthesis with an Ilizarov apparatus and transverse osteotomy of the tibia were produced. In the group No. 2, the autodistractor step was 0.017 mm at 180 times, the fixation period was 30 days. At the end of the distraction and 3 months after the removal of the apparatus, the tibial muscles were examined. Animals of the group No. 1 actively used the limb from the first days of distraction. The period of fixation decreased twice. Macro-preparations of muscles of dogs in group No. 1 did not significantly differ in the experimental and contralateral limbs. The histostructure of the muscles in both groups was characterized by signs of activation of angiogenesis and myogistogenesis, but in the group No. 1 the volume density of microvessels was 3 times higher in the period of elongation. It was concluded that the method of high-speed limb auto-extrusion in combination with intramedullary reinforcement of titanium wire with hydroxyapatite spraying has an activating effect on angiogenesis and myogenesis. The histostructural characteristics of the tibial muscle testify to the predominance of the processes of reparative regeneration by the type of restitution. As a result, the functional activity of the limb remains from the first days of distraction, the period of fixation is reduced by 2 times.

Key words: muscles, automated distraction, intramedular reinforcement, hydroxyapatite coating.



Улучшение антиоксидантной защиты фармнутриентом, полученным по криогенной технологии

Т.В. Блинова, Л.А. Страхова, Р.С. Рахманов, С.А. Колесов, Р.С. Хайров,
А.В. Тарасов

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии»
Роспотребнадзора, Нижний Новгород

Контактная информация: д.м.н. Блинова Татьяна Владимировна, btvdn@yandex.ru

В работе представлены данные о влиянии пищевого продукта, приготовленного по криогенной технологии, на окислительный стресс, антиоксидантную способность сыворотки, уровни глутатиона и метаболитов оксида азота у пловцов при интенсивных физических нагрузках. Показано, что у спортсменов, принимавших пищевой продукт, повышалась эффективность работы антиоксидантных систем, системы глутатиона и оксида азота относительно группы плацебо.

Ключевые слова: окислительный стресс, антиоксидантная способность, глутатион, оксид азота, физические нагрузки.

Введение

Мнения исследователей относительно роли окислительного стресса и антиоксидантной защиты организма при физической активности неоднозначны. Согласно наблюдениям, значительные физические нагрузки (ЗФН) у спортсменов приводят к увеличению производства свободных радикалов и снижению антиоксидантных резервов, что требует корректирующих действий [3, 8]. В то же время ряд исследований свидетельствует о том, что плановые регулярные тренировки с последующим

увеличением физической активности способствуют адаптации организма к ЗФН, что может препятствовать накоплению свободных радикалов и значительно активировать антиоксидантную защиту организма [5, 6]. С целью поддержания толерантности к ЗФН необходимо проведение целого комплекса различных мероприятий, включающих в т.ч. сбалансированное питание и прием биологически активных веществ, которые могут снизить интенсивность окислительного стресса [4, 5]. Использование низкотемпературной (криогенной) техно-

логии переработки пищевого сырья позволили создать высококачественные пищевые продукты из натуральных овощей, фруктов, ягод, злаков, животного белка (ППКТ) [1]. Получены доказательные научные данные об эффективности таких продуктов при включении в рацион питания лиц с различными функциональными и патологическими нарушениями в организме [2].

Целью настоящей работы явилась оценка влияния пищевых продуктов, приготовленных по криогенной технологии, на системы глутатиона, оксида азота, свободнорадикального окисления при интенсивных физических нагрузках.

Материалы и методы

Для наблюдения были выбраны спортсмены-пловцы – молодые мужчины в возрасте $23 \pm 2,5$ года. Спортсмены были разделены на две группы – основную ($n=15$) и контрольную ($n=15$). Тренировочный процесс у всех спортсменов был разделён на три этапа по 15 дней каждый. На втором этапе интенсивность физических нагрузок была увеличена в два раза. Группу сравнения составили мужчины, сопоставимые по возрасту, не занимающиеся спортом ($n=25$). Спортсменам основной группы на втором этапе (период ЗФН) в рацион питания был введен многокомпонентный ППКТ из белково-растительного сырья. Инновация приготовления ППКТ заключалась в использовании двух стадий заморозки при измельчении сырья. Это позволило получить порошки сверхтонкого измельчения с размером частиц 10-

150 мкм. Данная технология позволяет сохранить биологические свойства веществ, защитить их от окисления, увеличить концентрацию в 6-18 раз, достигнуть лёгкого усвоения веществ. В состав продукта входили арбузные семечки, шиповник, овес, шпинат, морская капуста, яичный белок. ППКТ принимали ежедневно из расчета 20 г на 70 кг массы тела. Спортсмены контрольной группы принимали порошок плацебо, содержащий лактозу.

Забор крови у спортсменов проводили три раза. Интегральные показатели окислительного стресса (TOS) и общей антиоксидантной способности сыворотки (TAS) определяли с помощью наборов реагентов «PerOx (TOS/TOC) Kit» и «ImAnOx (TAS/TAC) Kit» фирмы «Immundiagnostik» (Германия). Градацию уровней TOS и TAS (высокий, средний, низкий) оценивали согласно рекомендациям производителей наборов. Уровень общего глутатиона (TG), восстановленного (GS) и окисленного (GSSG) определяли в цельной крови по методу Элмана [7]. Определение в сыворотке крови уровня суммарных метаболитов оксида азота проводили с помощью набора реагентов «Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite» производства «RaD Systems» (США).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «SPSS» (SPSSInc., Chicago, IL, США).

Результаты исследований

Различия в показателях GS и GSSG, TOS и TAS, общих метаболитов (NOx) основной и контрольной групп представлены в табл. 1-4.

Таблица 1

Показатели GS и GSSG (ммоль/л) в крови спортсменов-пловцов основной и контрольной групп, Med (25; 75%)

Этапы исследования	Основная группа (n=15)		Контрольная группа (n=15)		p**
	GS	GSSG	GS	GSSG	
1	713,9 (635,7; 753,0)	84,7 (60,3; 107,6)	713,9 (635,7; 717,4)	84,7 (49,0; 143,8)	$p_{GS}=0,49$ $p_{GSSG}=0,24$
2	792,1 (678,0; 873,6)	74,9 (39,1; 79,8)	792,1 (713,9; 792,1)	79,8 (48,9; 88,6)	$p_{GS}=0,50$ $p_{GSSG}=0,49$
3	753,0 (638,9; 753,0)	60,1 (10,1; 71,7)	713,9 (635,7; 713,9)	78,0 (39,1; 78,5)	$p_{GS}=0,06$ $p_{GSSG}=0,41$
p*	$p_{1,2}=0,05$ $p_{2,3}=0,26$ $p_{1,3}=0,19$	$p_{1,2}=0,10$ $p_{2,3}=0,04$ $p_{1,3}=0,003$	$p_{1,2}=0,06$ $p_{2,3}=0,008$ $p_{1,3}=0,31$	$p_{1,2}=0,23$ $p_{2,3}=0,23$ $p_{1,3}=0,07$	
Группа сравнения (n=25)	GS (ммоль/л) – 817,1 (749,2; 892,1) GSSG (ммоль/л) – 60,1 (39,1; 60,3)				

Примечание: p* – достоверность показателей между разными исследованиями в основной и контрольной группах; p** – достоверность показателей между основной и контрольной группами в одном исследовании.

Таблица 2

Частота уровней TOS (%) и его количественная характеристика (Med (25;75%)) у спортсменов-пловцов основной и контрольной групп

Уровень TOS, статистические показатели	Основная группа (n=15)			Контрольная группа (n=15)		
	Этапы исследования					
	1	2	3	1	2	3
Низкий	53,4	53,4	80,0	46,7	53,4	46,7
Средний	26,6	33,3	20,0	20,0	16,6	23,3
Высокий	20,0	13,3	0	33,3	30,0	30,0
TOS (мкмоль/л)						
Медиана	181,2	154,2	131,0	244,8	176,3	179,9
25% квартиль	51,4	121,2	94,2	94,2	119,9	101,6
75% квартиль	195,9	226,5	149,3	343,2	237,5	310,9
p*	p _{1,2} =0,410, p _{1,3} =0,026, p _{2,3} =0,002			p _{1,2} =0,41, p _{1,3} =0,08, p _{2,3} =0,08		
p**	p _{1,1} =0,18; p _{2,2} =0,21; p _{3,3} =0,04					

Примечание: p* – достоверность показателей между этапами исследования в основной и контрольной группах; p** – достоверность показателей между основной и контрольной группами в одном этапе исследования.

Таблица 3

Частота уровней TAS (%) и ее количественная характеристика
(Med (25;75%)) у спортсменов-пловцов основной и контрольной групп

Уровень TAS, статистические показатели	Основная группа (n=15)			Контрольная группа(n=15)		
	Этапы исследования					
	1	2	3	1	2	3
	TAS (%)					
Низкий	0	6,7	13,3	0	26,7	20,0
Средний	26,7	20,0	6,7	33,7	40,0	13,3
Высокий	73,3	73,3	80,0	66,3	33,3	66,7
TAS (мкмоль/л)						
Медиана	330,1	328,0	370,0	336,7	295,9	348,5
25% квартиль	321,5	315,5	333,9	319,6	274,8	293,8
75% квартиль	344,2	330,8	374,1	347,9	319,4	368,9
p*	p _{1,2} =0,16, p _{1,3} =0,10, p _{2,3} =0,01			p _{1,2} =0,003, p _{1,3} =0,380, p _{2,3} =0,003		
p**	p _{1,1} =0,410; p _{2,2} =0,014; p _{3,3} =0,280					

Примечание: p* – достоверность показателей между этапами исследования в основной и контрольной группах; p** – достоверность показателей между основной и контрольной группами в одном этапе исследования.

Таблица 4

Показатель количества общих NOx (Med (25%;75%)) в сыворотке крови
спортсменов-пловцов основной и контрольной групп в динамике исследования,
мкмоль/л

Этапы исследования	Основная группа (n=15)	Контрольная группа (n=15)	p**
1	114,5 (97,9; 120,8)	108,3 (102,1; 112,4)	p _{1,1} =0,400
2	127,1 (95,8; 145,1)	89,5 (66,6; 97,9)	p _{2,2} =0,009
3	137,8 (116,6; 137,8)	116,9 (81,0; 129,1)	p _{3,3} =0,250
p*	p _{1,2} =0,160 p _{2,3} =0,470 p _{1,3} =0,030	p _{1,2} =0,029 p _{2,3} =0,060 p _{1,3} =0,490	
Группа сравнения (n=25)	27,6 (20,6; 32,4)		

Примечание: p* – достоверность показателей между этапами исследования в основной и контрольной группах; p** – достоверность показателей между основной и контрольной группами в одном этапе исследования.

Заключение

Интенсивные физические нагрузки приводят к нарушениям работы системы оксидантов-антиоксидантов организма спортсмена. Отсутствует положительная динамика окисленного глутатиона и общего количества пероксидов, у одной трети спортсменов сохраняется высокий уровень окислительного стресса и низкий уровень общей антиоксидантной способности сыворотки, в период значительных физических нагрузок наблюдается снижение общих метаболитов. ППКТ оказывает положительный эффект на систему антиоксидантной защиты: снижается количество окисленного глутатиона, уменьшается высокий и повышается низкий уровни окислительного стресса, снижается общее количество пероксидов, увеличивается содержание общих метаболитов. Положительное действие ППКТ, основанное, по-видимому, на эффекте витаминов и минералов, свидетельствует о недостаточной сбалансированности обычного рациона питания спортсменов по витаминно-минеральному составу. Данный ППКТ может быть применен у спортсменов, занимающихся циклическими видами спорта. Интегральные показатели окислительного стресса, фракций глутатиона (восстановленного и окисленного) можно рекомендовать для мониторинга состояния окислительного стресса и антиоксидантной защиты у спортсменов при значительных физических нагрузках.

Список литературы

1. Рахманов Р.С., Груздева А.Е. Продукты направленного действия – новое направление в нутрициологии. Ч. 2. – Н. Новгород: Поволжье. – 2012. – 130 с.

2. Рахманов Р.С., Потехина Н.Н., Истомин А.В., Басалыга В.Н., Сгибнев Д.В., Тарасов А.В. Оценка профилактической эффективности пищевых продуктов заданного состава при внебольничных пневмониях с неустановленным возбудителем // Вопросы питания. – 2017. – Вып. 86. – № 1. – С. 91-99.
3. Burgos C., Henríquez-Olguín C., Andrade D., Ramírez-Campillo R., Aráneda O., White A., Cerda-Köhler H. Effects of exercise training under hyperbaric oxygen on oxidative stress markers and endurance performance in young soccer players: A pilot study // J. of Nutrition and metabolism. – 2016. – doi: 10.1155/2016/5647407.
4. Dokumacioglu E., Iskender H., Aktas M.S., Hanedan B., Dokumacioglu A., Sen T.M., Musmul A. The effect of suiforaphane on oxidative stress and inflammation in rats with toxic hepatitis induced by acetaminophene // Bratislava Medical Journal. – 2017. – No. 118(8). – Pp. 453-459.
5. Fatouros I.G., Jamurtas A.Z., Villiotou V., Poulipoulou S., Fotinakis P., Taxildaris K., Delicostantinos G. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining // Med. Sci. Sports Exerc. – 2004. – No. 36. – Pp. 2065-72.
6. Groussard C., Rannou-Bekono F., Machefer G., Chevanne M., Vincent S., Sergeant O., Cillard J., Gratas-Delamarche A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise // Eur. J. Appl. Physiol. – 2003. – No. 89. – Pp. 14-20.
7. Giustarini D., Fanti P., Matteucci E., Rossi R. Micro-method for the determination of glutathione in human blood // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2014. – V. 1. – No. 964. – Pp. 191-194.
8. Mrakic-Spota S., Gussoni M., Porcelli S., Pugliese L., Pavei G., Bellistri G., Montorsi M., Tacchini P., Vezzoli A. Training effects on ROS production determined by electron paramagnetic resonance in master swimmers // Oxid. Med. Cell Longev. – 2015. – doi: /10.1155/2015/804794.

References

1. Rakhmanov R.S., Gruzdeva A.E. Produkty napravlennoogo deystviya – novoe napravlenie v nutritsiologii [Products of directional action are a new trend in nutritional science]. Part 2. Nizhny Novgorod: Povolzh'e. 2012. 130 p. (In Russian).

2. *Rakhmanov R.S., Potekhina N.N., Istomin A.V., Basalyga V.N., Sgibnev D.V., Tarasov A.V.* Otsenka profilakticheskoy ehffektivnosti pishchevykh produktov zadannogo sostava pri vnebol'nichnykh pnevmoniyah s neustanovlennym vozbuditелем [Evaluation of the preventive efficacy of nutrition products of a given composition in community-acquired pneumonia with an unidentified pathogen]. *Voprosy pitaniya* [Food questions]. 2017. Issue 86. No. 1. Pp. 91-99. (In Russian).
3. *Burgos C., Henriquez-Olguin C., Andrade D., Ramirez-Campillo R., Araneda O., White A., Cerda-Kohler H.* Effects of exercise training under hyperbaric oxygen on oxidative stress markers and endurance performance in young soccer players: A pilot study. *J. of Nutrition and metabolism*. 2016. doi: 10.1155/2016/5647407.
4. *Dokumacioglu E., Iskender H., Aktas M.S., Hanedan B., Dokumacioglu A., Sen T.M., Musmul A.* The effect of suiforaphane on oxidative stress and inflammation in rats with toxic hepatitis induced by acetaminophene. *Bratislava Medical Journal*. 2017. No. 118(8). Pp. 453-459.
5. *Fatouros I.G., Jamurtas A.Z., Villiotou V., Pouliopoulou S., Fotinakis P., Taxildaris K., Deliconstantinos G.* Oxidative stress responses in older men during endurance training and de-training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004. No. 36. Pp. 2065-72.
6. *Groussard C., Rannou-Bekono F., Machefer G., Chevanne M., Vincent S., Sergent O., Cillard J., Gratas-Delamarche A.* Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur. J. Appl. Pshysiol.* 2003. No. 89. Pp. 14-20.
7. *Giustarini D., Fanti P., Matteucci E., Rossi I R.* Micro-method for the determination of glutathione in human blood. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014. V. 1. No. 964. Pp. 191-194.
8. *Mrakic-Sposta S., Gussoni M., Porcelli S., Pugliese L., Pavei G., Bellistri G., Montorsi M., Tacchini P., Vezzoli A.* Training effects on ROS production determined by electron paramagnetic resonansce in master swimmers. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015. doi: /10.1155/2015/804794.

Improvement of antioxidant protection by nutrition products prepared of using cryogenic technology

T.V. Blinova, L.A. Strakhova, R.S. Rakhmanov, S.A. Kolesov, R.S. Khayrov, A.V. Tarasov

There is data present in this research on the effect of nutrition products prepared using cryogenic technology on oxidative stress, serum antioxidant capacity, glutathione levels and metabolites of nitric oxide in swimmers during intensive physical loads. It was demonstrated that the efficiency of antioxidant systems, glutathione systems and nitric oxide relative increased in athletes who took the food product in comparison to those who took a placebo.

Key words: oxidative stress, antioxidant capacity, glutathione, nitric oxide, physical loads.



Синтетические аналоги прогестерона в *in vitro* и *in vivo* моделях

О.А. Зейналов¹, Т.С. Савинова², В.А. Андриюшина³, М.А. Петросян⁴

¹ – ООО «Научно-производственная компания «СКИФФ», Москва

² – ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

³ – Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

⁴ – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург

Контактная информация: к.х.н. Андриюшина Валентина Александровна, andryushina@rambler.ru

Сравнение величины гестагенной активности у синтетических аналогов прогестерона – эфиров ацетомепрегенола (АМОЛ), определенной в процессе ее изучения различными биологическими тестами, показало отсутствие корреляции между результатами, полученными *in vitro* и *in vivo*. При низком сродстве к рецептору прогестерона эфиры АМОЛа проявили высокую гестагенную активность на животных, что, скорее всего, можно объяснить возникновением рецептор-субстратного взаимодействия после гидролиза эфирной связи под действием эстераз в организме.

Установленное на *in vitro* моделях отсутствие у эфиров АМОЛа нежелательных глюкокортикоидного, андрогенного или антиандрогенного действия наряду с их высокой *in vivo* гестагенной активностью делает их перспективными для использования в медицине и ветеринарии.

Ключевые слова: гестагенная активность, эфиры ацетомепрегенола, рецепторы прогестерона, *in vitro*, *in vivo*.

Введение

Гестагенные препараты широко используются как в медицинской, так и в ветеринарной практике. Они незаменимы для лечения большого количества гинекологических, эндокринных и онкологических заболеваний, а также являются основным компонентом в большинстве гормональных контрацептивных средств. Очевидно, что разработка высокоактивных, безопасных и конкурентоспособных гестагенов представляет большую актуальность.

Отечественная химия и фармакология уделяют особое внимание синтезу и изучению биологических свойств производных прогестерона. После сообщения о синтезе ацетомепрегенола (АМОЛ) и патентовании его фирмой «Merck» (Германия) в 1964 г. широко-масштабные исследования прегнанных гестагенов проводились в лаборатории синтеза гормональных стероидов ЦХЛС-ВНИХФИ. Был модифицирован метод синтеза ацетомепрегенола, а в НИИ по БИХС изучен спектр его био-

логической активности [7]. Результатом этих исследований, продолженных совместно с НИИ АГ им. Д.О. Отта РАМН, ВИЖ и ВАСХНИЛ, стал выпуск препарата ацетомепрегенола, разрешенного к медицинскому применению в России для лечебных целей, широкое использование его и предшественника, в т.ч. в терапии сельскохозяйственных животных. Однако из-за кризиса 90-х гг. выпуск препарата был прекращен. Это направление исследований заслуживает дальнейшего развития, поскольку модифицированные аналоги прогестерона, как правило, имеют высокую гестагенную активность при отсутствии нежелательных андрогенного, анаболического и эстрогенного действия в отличие от гестагенов норстероидного ряда [1, 8, 9].

Известно, что гестагены проявляют свое основное действие опосредованно, через рецепторы прогестерона (PR). Однако особенности биологического действия гестагенных соединений, формирующие индивидуальный профиль фармакологической активности каждого препарата, определяются способностью соединения специфически связываться не только с PR, но и в той или иной мере с другими типами стероидных рецепторов – например, андрогенными, глюкокортикоидными, эстрогенными и др., возможно проявляя при этом нежелательные побочные эффекты. Исключить дополнительные эффекты новой молекулы можно в экспериментах на животных, а также используя *in vitro* модели, которые позволяют за короткое время определить степень связывания лиганда с разными ядерными рецепторами и таким образом выявить молекулу с интересующими фармакологическими свойствами.

Целью настоящей работы являлось изучение взаимодействия аналогов прогестерона, а именно – сложных эфиров 17 α -ацетокси-3 β -гидрокси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-она (мепрегенола ацетата, АМОЛа) по атому C³ – бутаноата (БА), гемисулцината (ГА) и фенилпропионата (ФА) – с ядерными рецепторами (прогестероновым, глюкокортикоидным и андрогенным) и оценка корреляции полученных результатов с величиной гестагенной активности этих производных, определенной в тесте МакФейла на кроликах.

Изучение сродства полученных соединений к рецепторам стероидных гормонов *in vitro* проведено методом определения относительной конкурентной активности. Гестагенная активность соединений *in vivo* оценивалась в тесте Clauberg-McPhail [4, 10, 14] по степени секреторной трансформации эндометрия инфантильных эстрогенизированных самок кроликов.

Материалы и методы

Испытания эфиров АМОЛа по конкуренции с [³H]-прогестероном за связывание с PR проведены на рецепторах прогестерона крысы и рецепторах прогестерона растворимой фракции матки кролика, а конкурентное с [³H]-дексаметазоном связывание с рецептором глюкокортикоидов и конкурентное с 5 α -дигидро-[³H]-тестостероном связывание с рецептором андрогенов изучено на рецепторах крысы.

Реактивы

Все использованные реактивы имели квалификацию химически чистые. [1,2,6,7-³H]прогестерон с удельной радиоактивностью 80 Ки/ммоль, [1,2(n)-³H]дексаметазон (25 Ки/ммоль),

5 α -дигидро-[1,2,4,5,6,7-³H]-тестостерон (148 Ки/ммоль) получены от фирмы «Amersham» (Англия). Немеченные стероиды сравнения, дитиотреитол (DTT), фенолметилсульфонилфторид (PMSF), пропиленгликоль, глицерин и Trisma-основание получены от фирмы «Sigma» (США). Активированный уголь Norit-A получен от фирмы «Serva» (ФРГ), декстран-70 – «Fluka» (Швейцария). Использовали следующие буферные р-ры с pH=7,5 при 20°C: **A** – 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT и 30% глицерин (по объему); **B** – 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 1,5 mM EDTAS; **C** – 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM EDTAS, 10 mM Na₂MoO₄, 10% глицерин (по объему).

Радиохимическую чистоту меченых соединений контролировали методом колоночной хроматографии на Separon C18 (7 мкм, 3,3x150 мм) с использованием для элюции смеси метанол-вода (95:5, по объему), а также методом тонкослойной хроматографии в системе хлороформ-этиловый эфир (17:3, по объему).

Стероиды растворяли в этаноле в концентрации 0,5 mM и хранили при 4°C. Учитывая нестабильность ГА в р-рах, его спиртовой р-р готовили непосредственно перед добавлением к тканевому экстракту.

Кролики

В работе с кроликами использовали девственных самок кролика массой 2-2,5 кг, полученных из питомника «Рапполово» РАМН и содержащихся в виварии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» в стандартных условиях. Животные получали ежедневно инъекции 17 β -эстрадиола (50 мкг в 100 мкл пропиленгликоля) внутримышечно в течение 5-ти дней. Через 1 день после

последней инъекции животных выводили из эксперимента. Матки извлекали, измельчали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 5-ти объемах буфера или хранили при -65°C не более 12-ти дней. Гомогенизацию ткани и все последующие операции проводили при 0-4°C. Гомогенат центрифугировали при 50000g в течение 1 ч. Надосадочную фракцию (цитозоль) использовали немедленно.

Крысы

В работе с крысами использовали половозрелых беспородных самок и самцов крыс массой 180-220 г. Для анализа взаимодействия стероидов с PR животные получали ежедневно инъекции 1 мкг 17 β -эстрадиола в 200 мкл пропиленгликоля внутримышечно в течение 4-х дней. Через 1 день после последней инъекции животных выводили из эксперимента. Матки от 3-х животных извлекали, измельчали и гомогенизировали в 5-ти объемах буфера **A**.

Источником рецептора глюкокортикоидов служила печень интактной самки крысы. Печень извлекали, измельчали и гомогенизировали в 3-х объемах буфера **B** в гомогенизаторе тефлон/стекло.

Источником рецептора андрогенов служила вентральная предстательная железа от 7-ми кастрированных накануне самцов крыс. Ткань измельчали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 3-х объемах буфера.

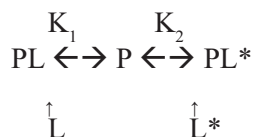
Гомогенизацию ткани и все последующие процедуры проводили при температуре 0-4°C. Гомогенат центрифугировали при 50000g в течение 1 ч. Надосадочную фракцию (цитозоль) использовали немедленно. Цитозоль печени обрабатывали осадком суспензии активированного угля, покрытого декс-

траном (конечные концентрации – 0,67% и 0,13%, вес/объем), в течение 30 мин с последующим центрифугированием при 50000g в течение 5 мин для удаления свободных и непрочно связанных белком стероидов.

Для определения равновесных параметров связывания стероидов белками и анализа ингибирования этого связывания аликвоты цитозоля (100 мкл) инкубировали при 0–4°C в течение 22 ч с [³H]-лигандом (25–30х 10³ имп/мин, конечная концентрация – 2–6 нМ) в отсутствии или в присутствии немеченого одноименного или конкурирующего лиганда (конечная концентрация 1,4 – 100000 нМ) в суммарном объеме 200 мкл. При работе с кроликами инкубацию проводили в аналогичных условиях с [³H]-прогестероном (25–30х10³ имп/мин, конечная концентрация – 2–3 нМ). В случае анализа взаимодействия лигандов с PR в инкубационную смесь добавляли также по 3 мкМ гидрокортизона.

Несвязанный белками лиганд удаляли обработкой 100 мкл 2% суспензии угля, покрытого декстраном (0,67%), в течение 5 мин с последующим отделением угля центрифугированием при 3000g в течение 5 мин. В аликвотах супернатанта (250 мкл) измеряли содержание радиоактивности с использованием сцинтилляционной жидкости ЖС-8 и спектрометра Rackbeta 1217 («LKB», Швеция). Эффективность счета составляла 50%. Величины равновесной константы диссоциации (K_d) и концентрации связывающих мест (B_{max}) для высокоаффинного связывания [³H]-лигандов и [³H]-прогестерона рассчитывали с помощью компьютерной обработки результатов в соответствии с приводимой ниже моделью, используя величины специфически связанного

[³H]-лиганда, получаемые вычитанием количества неспецифически связанного [³H]-лиганда (измеряемого в присутствии избытка (10 мкМ) немеченого лиганда) из количества суммарно связанного лиганда:



где P – неоккупированная форма белка; L и L* – несвязанные формы немеченого и меченого лигандов; PL и PL* – лиганд-белковые комплексы; K_1 и K_2 – равновесные K_d .

Приведенной схеме соответствует система уравнений:

$$\begin{aligned}
 PL &= P \cdot L / K_1 \\
 PL^* &= P \cdot L^* / K_2 \\
 PL + P + PL^* &= B_{max}
 \end{aligned}$$

Решение этой системы позволяет получать значения концентраций всех форм лигандов и белков, представленных на схеме. Численное решение производили с помощью программы, использующей метод Fabiato [13]. Подбирали соотношение параметров K_d и B_{max} для немеченого лиганда, обеспечивающие наилучшее соответствие расчетных графиков экспериментальным данным для количества специфически связанного [³H]-лиганда при варьирующих концентрациях немеченого лиганда. Критерием соответствия служила сумма квадратов отклонений. Величины относительной конкурентной активности рассчитывали как соотношение величин K_2 и K_1 . Данный способ анализа является модификацией широко применяемого метода Kortenman (1970) и его вариантов. Все измерения проводили в двух параллельных образцах. Ошибка измерений не превышала 5% от среднего.

Результаты и их обсуждение

Анализ конкуренции эфиров АМОЛа с ³H-прогестероном за связывание с PR растворимой фракции матки кролика представлен на рис. 1.

Параметры лиганд-рецепторного взаимодействия эфиров АМОЛа с PR матки кролика приведены в табл. 1.

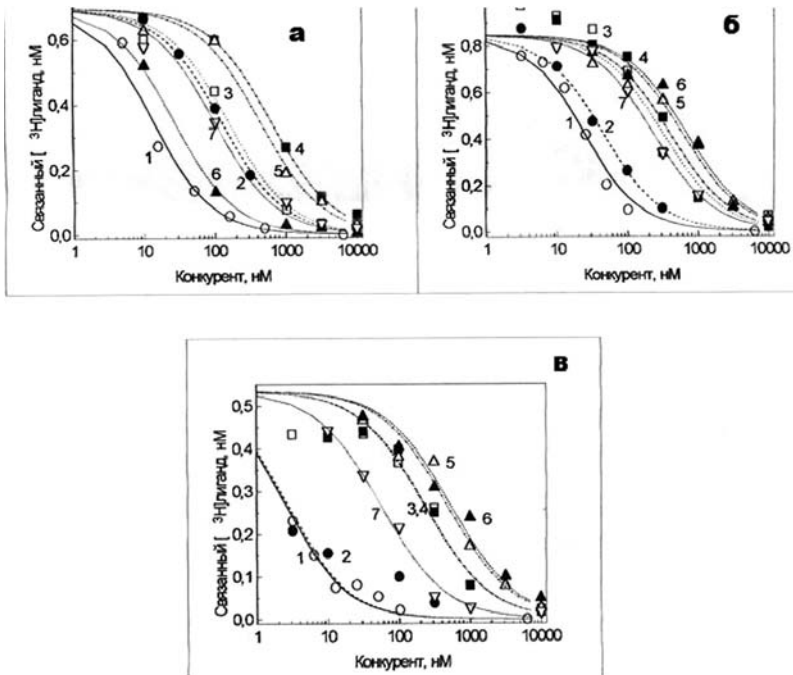


Рис. 1. Зависимость конкуренции эфиров АМОЛа с ³H-прогестероном за связывание с PR от их структуры.

По оси абсцисс – концентрация конкурента, по оси ординат – количество специфически связанного ³H]лиганда.

- а) 1 – прогестерон, 3 – БА, 4 – ГА, 5 – ФА;
- б) 1 – прогестерон, 3 – БА, 4 – ГА, 5 – ФА;
- в) 1 – прогестерон, 4 – БА, 5 – ГА, 6 – ФА.

Таблица 1

Параметры взаимодействия эфиров АМОЛа с PR матки кролика

№ жив-го	Прогестерон и эфиры АМОЛа							
	Прогестерон		БА		ГА		ФА	
	K _d , нМ	ОКА, %	K _d , нМ	ОКА, %	K _d , нМ	ОКА, %	K _d , нМ	ОКА, %
1	6,7	100	91	7,4	370	1,8	259	2,6
2	12,7	100	242	5,2	365	3,8	418	3,0
3	0,57	100	61	0,93	125	0,46	140	0,41
Среднее	6,6	100	131	4,5	287	2,0	272	2,0

Примечание: K_d – равновесная константа диссоциации; ОКА – относительная конкурентная активность. За 100% принята активность прогестерона.

Из табл. 1 видно, что все исследованные аналоги прогестерона – сложные эфиры АМОЛа по гидроксильной группе при атоме С³ – обладают относительно низким сродством к PR кролика. Величины ОКА составляют около 2-6% от активности прогестерона.

По аналогичной методике изучено конкурентное связывание исследуемых стероидных соединений с рецепторами прогестерона, глюкокортикоидов и андрогенов крысы.

На рис. 2 приведены графики, отражающие конкуренцию исследованных соединений с [³H] лигандами за связывание с рецепторами стероидных гормо-

нов крысы: рецептор прогестерона (а); рецептор глюкокортикоидов (б); рецептор андрогенов (в).

Параметры лиганд-рецепторного взаимодействия испытуемых производных прогестерона и стероидов сравнения с рецепторами прогестерона, глюкокортикоидов и андрогенов крысы приведены в табл. 2.

Как следует из табл. 2, исследованные аналоги прогестерона – сложные эфиры АМОЛа по гидроксильной группе при атоме С³ (гемисукцинат, бутаноат и фенилпропионат) – обладают низким сродством к PR. Величины ОКА составляют около 1% от активности прогесте-

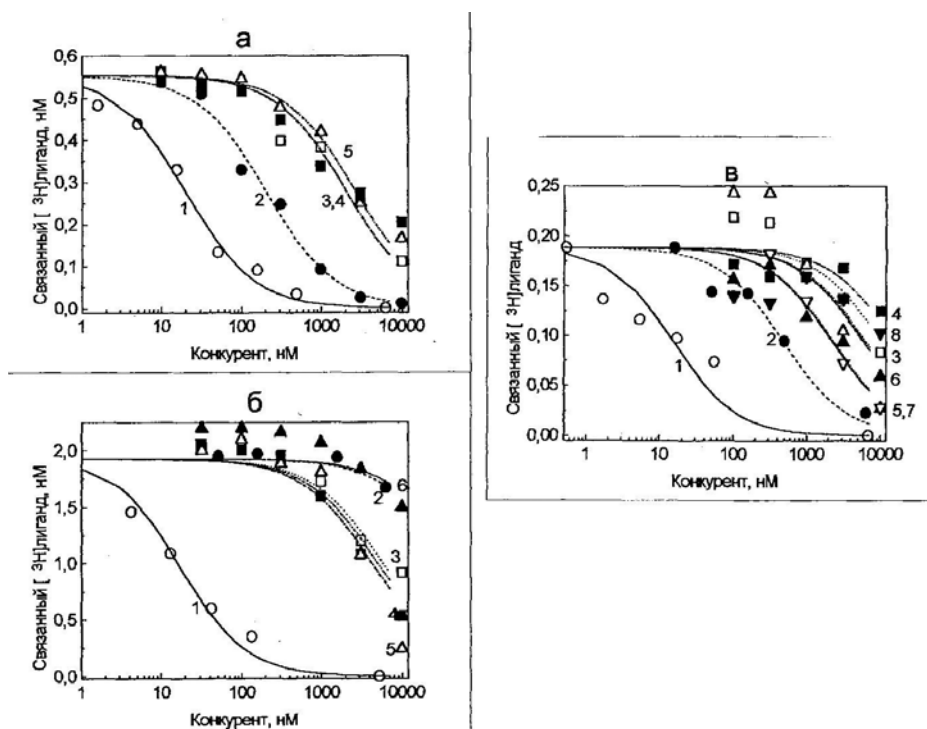


Рис. 2. Зависимость конкуренции эфиров АМОЛа с [³H] лигандами за связывание с рецепторами стероидных гормонов крысы от их структуры.

Оси абсцисс и ординат – как на рис. 1.

а) 1 – прогестерон, 3 – БА, 4 – ГА, 5 – ФА;

б) 1 – дексаметазон, 2 – прогестерон, 3 – БА, 4 – ГА, 5 – ФА;

в) 1 – 5 α -дигидротестостерон, 2 – прогестерон, 3 – БА, 4 – ГА, 5 – ФА.

Таблица 2

Параметры взаимодействия эфиров АМОЛа и стероидов сравнения с рецепторами прогестерона и рецепторами глюкокортикоидов и андрогенов крысы

Рецептор	³ H-лиганд	Немеченый конкурент, K _d (нМ) и ОКА (%)					
		Декса- метазон	Диги- дроте- стосте- рон	Прогес- терон	БА	ГА	ФА
прогестерона	прогестерон	-	-	12,4 100	1360 0,91	1360 0,91	1770 0,70
глюкокорти- коидов	дексаметазон	6,2 100	-	20500 0,03	2800 0,22	2050 0,30	2400 0,26
андрогенов	дигидротестосте- рон	-	11,4 100	338 3,0	8050 0,14	12000 0,095	4950 0,23

рона. Все изученные эфиры обладают низким сродством к рецептору глюкокортикоидов и, по-видимому, реально не могут оказывать прямых эффектов через эти рецепторы. Сродство эфиров АМОЛа к рецептору андрогенов существенно ниже сродства прогестерона. Это позволяет предположить, что данные соединения не способны оказывать нежелательного побочного андрогенного (или антиандрогенного) действия.

Гестагенные соединения, обладающие способностью взаимодействовать исключительно со специфическими прогестероновыми рецепторами, не активируя др. ядерные рецепторы, проявляют направленное действие и представляют большой интерес для использования в медицине и ветеринарии. Разработка лекарственного препарата с таким свойством позволит создать высокоактивный гестаген, лишенный побочного действия и имеющий большую перспективу практического применения.

Однако само по себе сродство синтетических гестагенов к прогестероновому рецептору не позволяет судить о

характере фармакологического эффекта, т.к. стероид может быть его агонистом или антагонистом, или частичным агонистом или антагонистом [8]. Поэтому, имея данные только о сродстве соединения к рецептору, нельзя говорить о силе гестагенной активности *in vivo*. Об этом можно судить с помощью специальных тестов, из которых для экспериментальных исследований наиболее информативным и достоверным является метод Клауберга-Мак Фейла [10, 14]. Поэтому представляло интерес сравнить полученную нами *in vitro* активность с ранее полученными данными по гестагенной активности этих соединений, определенными указанным методом и приведенными нами в ранее опубликованных статьях [4-6]. Методика определения гестагенной активности представлена в статьях [2, 3]. Относительную прогестагенную активность вычисляли, принимая за единицу активность прогестерона. Относительная гестагенная активность по отношению к прогестерону для БА составляет 11,2, для ГА – 11,7 и для ФА – 10,5.

Из анализа полученных в *in vivo* эксперименте данных по гестагенной активности исследуемых эфиров АМОЛа следует, что все три эфира при пероральном использовании обладают высокой гестагенной активностью, более чем в 10 раз превышающей активность прогестерона, что совершенно не согласуется с данными, полученными нами при изучении *in vitro*. Это расхождение, вероятно, можно объяснить тем, что изученные стероиды проявляют биологическое действие после гидролиза эфирной связи под действием эстераз в организме, а активность определяется, главным образом, структурой базового спиртового фрагмента (АМОЛа) или его 3-кето-производного (мегестрола ацетата). Гидролитическое отщепление эфирной группы с высвобождением активного начала занимает значительное время, за которое большое количество молекул гестагена достигает клетки-мишени и оккупирует рецепторы прогестерона, провоцируя гестагенный эффект в ткани, снижая таким образом связь эфира с PR и увеличивая его активность *in vivo*. Низкая степень связывания некоторых эфиров АМОЛа с PR уже отмечалась ранее в работе [8].

Колебания значения активности у различных представителей гомологического ряда эфиров АМОЛа определяются, вероятно, скоростью гидролиза сложноэфирной группировки, устойчивость которой к гидролизу определяется структурой заместителя. Это уже отмечалось нами ранее при сравнительном изучении гестагенной активности *in vivo* гомологического ряда эфиров АМОЛа по гидроксильной группе при атоме C³ [3]. Поскольку основной интерес для нас представляла оценка специфического фармакологического действия, а именно – гестагенного,

то изучение связи с прогестероновыми рецепторами было приоритетным. Однако, в связи с несовпадением результатов, полученных при изучении гестагенной активности на разных экспериментальных моделях, целесообразно в дальнейшем изучить андрогенную и глюкокортикоидную активности этих эфиров также в моделях *in vivo*.

Заключение

Таким образом, при изучении эфиров АМОЛа – синтетических аналогов прогестерона – на *in vitro* моделях нами установлено отсутствие у этого ряда соединений сопутствующих нежелательных глюкокортикоидного, андрогенного или антиандрогенного действий, что делает их чрезвычайно перспективными для использования в медицине и ветеринарии при наличии у них высокого гестагенного эффекта, выявленного при изучении на *in vivo* моделях. Отсутствие корреляции между значениями гестагенной активности, полученными в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, можно объяснить проявлением гестагенного действия после гидролиза эфирной связи под влиянием эстераз в организме и возможного последующего окисления гидроксильной группы АМОЛа с образованием 3-кето-производного (мегестрола ацетата). Как известно [11, 12], для связывания с рецепторами прогестерона необходимо наличие в молекуле прогестина 3-кето-группы, которая в изученных соединениях защищена эфирной связью.

Несмотря на то, что современные технологии позволяют проводить широкомасштабные исследования биологической активности, включая гормональную, *in vitro* путем использования больших наборов клеточных культур,

заключительным этапом создания гормональных аналогов направленного действия должно быть тестирование активности *in vivo*. Кроме выявления истинной гормональной активности, оно позволяет определить возможные побочные эффекты аналогов, а также установить дозировку и совместимость с другими препаратами.

Благодарности

Авторы выражают благодарность д.м.н., проф. Всеволоду Всеволодовичу Корхову за консультативную помощь при выполнении исследований *in vivo* и д.б.н., проф. Александру Николаевичу Смирнову за помощь в изучении эфиров АМОЛа на *in vitro* моделях.

Список литературы

1. Гилман А.Г. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. Книга четвертая. Пер. с англ. / Под общ. ред. А.Г. Гилмана. – М.: Практика. 2006. 450 с. ISBN 5-89816-069-8.
2. Зейналов О.А., Андриюшина В.А., Авданина Д.А. Новые гестагенные препараты для ветеринарии // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2005. № 1. С. 16-20.
3. Зейналов О.А., Андриюшина В.А., Савинова Т.С., Попова Е.В., Егоров И.М., Скрябин К.Г. Эфиры АМОЛа: синтез и оценка биологического действия // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2004. Т. 2. № 2. С. 8-11.
4. Зейналов О.А., Андриюшина В.А., Савинова Т.С., Попова Е.В., Золотарева В.А., Кокорина Л.М., Скрябин К.Г. Изучение спектра биологической активности нового стероидного эфира - 17 α -ацетокси-3 β -(1-карбокси-пропокси)-6-метилпрегна-4,6-диен-20-она (гемисукцината амолы) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2005. Т. 3. № 1. С. 32-36.
5. Зейналов О.А., Андриюшина В.А., Скрябин К.Г. Новые высокоактивные гестагены прегнанового ряда // Российский журнал общей химии. 2005. Т. XLIX. № 1. С. 118-124.
6. Зейналов О.А., Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Петросян М.А., Андриюшина В.А. Синтез и биологическая активность синтетических производных 17 α -гидроксипрогестерона // Хим.-фарм. журнал. 2012. Т. 46. № 4. С. 90-94.

7. Кадатский Г.М., Гриненко Г.С., Терехина А.И., Лисица Л.И., Ганина И.В., Горенбургова Е.И. Синтез и биологическая активность синтетических производных 17-ацетата и диацетата 6-метилпрегна-4,6-диен-3,17-диол-20-она // Хим.-фарм. журнал. 1979. № 6. С. 63-68.
8. Карева Е.Н., Гриненко Г.С., Гаспарян Н.Д., Овчинникова Е.В., Горенкова О.С. Влияние структуры синтетических гестагенов на их связывающие свойства с рецепторами прогестерона эндометрия // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2006. Т. 69. № 4. С. 36-38.
9. Люльман Х., Мор К., Хайн Л. Наглядная фармакология. 5-е изд. Пер. с нем. – М.: Мир. 2008. С. 68-69. ISBN 978-5-03-003820-9.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с. ISBN: 978-5-8125-1466-3.
11. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. 2-е изд., перераб. и доп. – Волгоград: Семь ветров. 1999. 640 с. ISBN 5-88928-001-1.
12. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Фармакологические свойства гестагенов // Фарматека. 2003. № 8(71). С. 6.
13. Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands // Methods Enzymol. 1988. V. 157. Pp. 378-417. doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)57093-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)57093-3).
14. McPhail M.K. The assay of progestin // J. Physiol. 1935. No. 83(2). Pp. 145-156. doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1934.sp003217>.

References

1. Gilman A.G. Klinicheskaja farmakologija po Gudmanu i Gilmanu. Kniga chetvertaja. Per. s angl. [Clinical pharmacology according to Goodman and Gilman. The fourth book. Trans. from English]. General edition by A.G. Gilman. Moscow: Praktika. 2006. 450 p. ISBN 5-89816-069-8. (In Russian).
2. Zeynalov O.A., Andryushina V.A., Avdani-na D.A. Novye gestagennye preparaty dlya veterinarii [New gestagenic preparations for veterinary use]. Rossiyskiy veterinarniy zhurnal. Melkiye domashniye i dikiye zhivotnye [Russian Veterinary J. Small domestic and wild animals]. 2005. No. 1. Pp. 16-20. (In Russian).
3. Zeynalov O.A., Andryushina V.A., Savinova T.S., Popova E.V., Egorov I.M., Skryabin K.G. Efiry AMOLA: sintez i otsenka biologicheskogo deystviya [Ethers of acetomepregenol: synthesis and evaluation of biological effects]. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii [Questions of biological, medical and

- pharmaceutical chemistry]. 2004. V. 2. No. 2. Pp. 8-11. (In Russian).
4. Zeynalov O.A., Andryushina V.A., Savinova T.S., Popova E.V., Zolotareva V.A., Kokorina L.M., Skryabin K.G. Izucheniye spektra biologicheskoy aktivnosti novogo steroidnogo efira - 17 α -atsetoksi-3 β -(1-karboksi-propoksi)-6-metilpregna-4,6-dien-20-ona (gemisuktsinata amola) [The study of the spectrum of biological activity of the new steroid ester-17 α -acetoxy-3 β -(1-carboxy-propoxy)-6-methylpregna-4,6-dien-20-one (hemisuccinate amole)]. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii [Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry]. 2005. V. 3. No. 1. Pp. 32-36. (In Russian).
 5. Zeynalov O.A., Andryushina V.A., Skryabin K.G. Novye vysokoaktivnye gestageny pregnanovogo ryada [New highly active gestagens of pregnane series]. Rossijskij zhurnal obshchej khimii [Russian J. of General chemistry]. 2005. V. XLIX. No. 1. Pp. 118-124. (In Russian).
 6. Zeynalov O.A., Yaderets V.V., Stytsenko T.S., Petrosyan M.A., Andryushina V.A. Sintez i biologicheskaya aktivnost' sinteticheskikh proizvodnykh 17 α -gidroksiprogesterona [Synthesis and biological activity of synthetic 17 α -hydroxyprogesterone derivatives]. Khim.-farm. zhurnal [Pharm. and chem. J.]. 2012. V. 46. No. 4. Pp. 90-94. (In Russian).
 7. Kadatskiy G.M., Grinenko G.S., Terekhina A.I., Lisitsa L.I., Ganina I.V., Gorenburgova E.I. Sintez i biologicheskaya aktivnost sinteticheskikh proizvodnykh 17-acetata i diacetata 6-metilpregna-4,6-dien-3,17-diol-20-ona [Synthesis and biological activity of 17-acetate and diacetate 6-methylpregna-4,6-diene-3,17-diol-20-one derivatives]. Khim.-farm. zhurnal. [Pharm. and chem. J.]. 1979. No. 6. Pp. 63-68. (In Russian).
 8. Kareva E.N., Grinenko G.S., Gasparyan N.D., Ovchinnikova E.V., Gorenkova O.S. Vliyanie struktury sinteticheskikh gestagenov na ih svyazivayushchie svoystva s receptorami progesterona jendometrija [Influence of the structure of synthetic gestagens on their binding to progesteron receptors in endometrium]. Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologiya [Experimental and clinical pharmacology]. 2006. V. 69. No. 4. Pp. 36-38. (In Russian).
 9. Lulman Kh., Mor K., Khain L. Nagljadnaja farmakologiya. 5-e izd. Per. s nem. [Visual pharmacology. 5th ed. Trans. from German]. Moscow: Mir. 2008. Pp. 68-69. ISBN 978-5-03-003820-9. (In Russian).
 10. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [A guide to preclinical drug research]. Ed. by Mironov A.N. Moscow: Grif i K. 2012. 944 p. ISBN: 978-5-8125-1466-3. (In Russian).
 11. Sergeyev P.V., Shimanovskiy N.L., Petrov V.I. Retseptory fiziologicheskii aktivnykh veshchestv [Receptors of physiologically active substances]. 2nd edition, revised and enlarged. Volgograd: Sem' vetrov. 1999. 640 p. ISBN 5-88928-001-1. (In Russian).
 12. Sergeyev P.V., Shimanovskiy N.L. Farmakologicheskie svoystva gestagenov [Pharmacological properties of gestagens]. Pharmatec. 2003. No. 8(71). P. 6. (In Russian).
 13. Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. Methods Enzimol. 1988. V. 157. Pp. 378-417. doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)57093-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)57093-3).
 14. McPhail M.K. The assay of progestin. J. Physiol. 1935. No. 83(2). Pp. 145-156. doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1934.sp003217>.

Synthetic analogues of progesterone in *in vitro* and *in vivo* models

O.A. Zeynalov, T.S. Savinova, V.A. Andryushina, M.A. Petrosyan

Comparison of the gestagenic activity of synthetic analogues of progesterone – ethers of acetomepregenol (AMOL) determined in the process of studying by the various biological tests, showed the absence of correlation between the results obtained *in vitro* and *in vivo*. At the low affinity to the progesterone receptor AMOL ethers exhibited the high progestational activity in animals that are likely to be explained by the occurrence of receptor-substrate interaction after hydrolysis of the ester bond by the action of esterases in organism.

Established *in vitro* models, the absence in the AMOL ethers of undesirable glucocorticoid, androgenic or antiandrogenic effects, along with their high *in vivo* gestagenic activity, makes them promising for use in medicine and veterinary medicine.

Key words: gestagenic activity, acetomepregenol ethers, progesterone receptors, *in vitro*, *in vivo*.

Возможность применения импульсного магнитного поля в качестве протектора повреждающего действия гипоксии

В.Н. Крылов¹, Е.П. Лобкаева², Л.В. Ошевенский¹, О.М. Лабынцева²,
О.А. Захарова², В.Д. Федотов³, Ю.Е. Ананьева², Е.Г. Рохмистрова²

¹ – ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

² – ФГУП «Российский федеральный ядерный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики», Саров

³ – ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород

Контактная информация: к.б.н. Захарова Ольга Анатольевна, anuyue@mail.ru

Исследовано preconditionирующее действие разных режимов импульсного магнитного поля на гематологические и биохимические показатели крови крыс, подвергнутых воздействию гипобарической гипоксии. Установлено, что воздействие импульсного магнитного поля приводит к развитию адаптивных реакций, однако скорость их включения может быть различной в зависимости от выбранного режима. Показана возможность применения низкочастотного импульсного магнитного поля в качестве протектора стресс-индуцированного состояния, вызванного гипоксическим воздействием.

Ключевые слова: импульсное магнитное поле, гипоксия, резистентность, параметры крови.

Введение

Распространение хронических неинфекционных заболеваний (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, язва желудка, хронические гастриты, невротические состояния, психические расстройства) в основном является проявлением различных стрессовых ситуаций, с которыми люди все чаще встречаются в современном мире. Это определяет актуальность поиска средств и методов повышения резистентности организма к стрессовым воздействиям [9]. В качестве протекторов негативных последствий стресса все чаще применяют воздействие низкочастотных магнитных полей [1, 2, 7]. Однако следует учитывать, что в

зависимости от параметров и режимов воздействия магнитные поля могут вызывать разнонаправленные изменения в организме [3, 12, 14].

В трудах Е.П. Лобкаевой [14] выдвинуто утверждение о том, что организм человека можно представить в виде электромагнитной колебательной системы, подчиненной ритмической активности сердца. Поэтому параметры и режимы воздействия на организм низкоинтенсивным импульсным магнитным полем (ИМП) для уменьшения негативных последствий альтерации должны лежать в пределах вариабельности ритма сердца. Исходя из теории согласованности параметров внешнего воздействия и естественных физиологических процессов ор-

ганизма, было сделано предположение, что достижение состояния нормы функциональных систем организма обеспечивается воздействием внешнего фактора, характеристики которого согласованы со спектральной функцией $U(t)=f^1$. Рассогласование этих характеристик приводит к негативному эффекту.

В ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ» был получен патент РФ № 2432972⁽¹³⁾, в котором показано, что для сигнала магнитогенератора типа $U(t)=U_0 \sin \omega t \exp (-\alpha t)$, регулирование магнитной индукции в диапазонах режима I – от 1,1 до 1,76 мТл – приводит к «комфортному» состоянию организма (согласован с вариабельностью ритма сердца), а в диапазонах режима II – от 1,5 до 3,2 мТл – к «дискомфортному» состоянию организма (рассогласован с вариабельностью ритма сердца). Воздействие ИМП, огибающая спектра которого имеет вид $n<0,8$ или $n>1,4$, воспринимается здоровым организмом как раздражающее и приводит его к дискомфортному состоянию (стресс-реакции) [19]. В соответствии с патентом были разработаны методики и режимы воздействия низкочастотного ИМП на организм, на основе которых был создан магнитогенератор «Колибри» (УМТИ-3Ф) и в настоящее время активно применяется в терапии [6, 7, 11]. В дальнейшем в ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ» на основе оборудования УМТИ-3Ф («Колибри») был разработан и создан магнитогенератор импульсного магнитного поля нового поколения «Бутон» (свидетельство на товарный знак № 386501 от 03.12.2007), который позволяет автоматически изменять векторную конфигурацию ИМП и обеспечивать большую равномерность распределения интенсивности магнит-

ного поля в рабочей зоне индуктора. В настоящее время ведется его апробация и разработка новых более эффективных режимов воздействия на организм.

Целью нашей работы явилось исследование механизмов действия низкочастотного импульсного магнитного поля, генерируемого установкой «Бутон», в качестве протектора стрессиндуцированного состояния, вызванного гипоксическим воздействием.

Материалы и методы

В качестве источника импульсного ИМП использовали генератор ИМП «Бутон» со значением модуля магнитной индукции в центре рабочей зоны индуктора до $3,5\pm 0,2$ мТл, формой сигнала вида затухающей синусоиды $U(t)=U_0 \sin \omega t \exp (-\alpha t)$, при $U_0=150-300$ В, частотой ~ 100 Гц, частотой следования импульсов $1,0\pm 0,1$ Гц. Тестирование параметров магнитного поля проводили однокомпонентным тесламетром ТП2-2У.

Исследование проводилось на белых половозрелых самцах крыс Wistar массой 200-250 г., которые были приобретены в филиале «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (Московская область). Животные содержались в виварии, в клетках по 4 особи, при свободном доступе к пище и воде и естественном световом режиме.

Животные были разделены на 3 группы (табл. 1): 1-я группа животных подвергалась мнимому воздействию ИМП, 2-я группа – воздействию ИМП в режиме I ($1,5-3,2-1,5$ мТл), 3-я группа – воздействию ИМП в режиме II ($3,2-1,5-3,2$ мТл).

Таблица 1

Рабочие характеристики режима обработки магнитным полем

Группа (N=8)	Схема (режим) воздействия	Максимальное значение модуля магнитной индукции в центре контейнера ($ B _{\max}$), мТл
1	Мнимое воздействие	-
2	ИМП I	1,5
		3,2
		1,5
3	ИМП II	3,2
		1,5
		3,2

Животных обрабатывали ИМП в утренний период (4⁰⁰-5⁰⁰) при помощи магнитогенератора импульсного магнитного поля «Бутон» в течение 12-ти дней. Для обработки магнитным полем животных помещали в контейнер с прозрачными стенками без ограничения движения. Контейнер размещали в рабочей зоне используемой установки. Обработку магнитным полем осуществляли тотально в течение 30 мин, со сменной максимального значения модуля магнитной индукции каждые 10 мин.

Через 15 мин после окончания последнего сеанса ИМП лабораторных животных всех исследуемых групп подвергали воздействию гипоксии. Моделирование гипобарической гипоксии осуществляли в вакуумной проточной барокамере. Животных помещали в условия, соответствующие «подъёму» на высоту 10000 м на 1 мин со скоростью 1 км/мин с последующим 5-мин спуском [17, 23].

Забор крови осуществляли спустя 6 ч после гипоксического воздействия путем декапитации.

Для оценки гематологических показателей красной и белой крови ис-

пользовали стандартные методики: определение количества эритроцитов, гематокрита, гемоглобина, тромбоцитов, а также рассчитывали эритроцитарные индексы: среднее распределение гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), средний объем эритроцита (MCV) [15].

Оценку биохимических показателей крови – определение уровня мочевины, общего белка, активности γ -глутаминтранспептидазы (γ -ГГТ) – проводили с использованием биохимических реагентов «ДИАКОН ДС» ЗАО «Вектор-Бест-Урал» (Россия), на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BTS-350.

Проверка на нормальность распределения проведена с использованием W-теста Шапиро-Уилка [13]. Оценка статистической значимости различий средних значений показателей двух независимых групп проведена с использованием t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении данных) и U-критерия Манна-Уитни (при распределении, отличном от нормального). Отличия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Данные, полученные в ходе экспериментального исследования, представлены в табл. 2 и 3. При анализе полученных результатов выявили, что у животных группы 1, подвергавшихся гипобари-

ческой гипоксии, уровень мочевины и общего белка в сыворотке крови не отличался от биологической нормы [19], в то время как уровень фермента γ -ГТТ превышал показатели нормальных значений примерно в 2 раза (рис. 1).

Таблица 2
Гематологические показатели крови крыс после воздействия ИМП

Гематологические показатели крови	Группа 1 (гипоксия + минимальное воздействие)	Группа 2 (гипоксия + ИМП I)	Группа 3 (гипоксия + ИМП II)
Гемоглобин, г/л	118,50±11,55	147,75±3,97*	139,0±8,09
Эритроциты, 10 ⁶ /л	5,89±0,56	7,58±0,18*	7,00±0,22*
МСН, пг	20,03±0,38	19,48±0,44	19,70±0,52
MCV, фл	52,80±1,01	52,75±0,88	50,32±1,13
МСНС, г/дл	38,08±0,21	36,60±0,46*	39,17±0,16 ^{vv}
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	469,25±76,25	589,75±64,77	703,75±32,12*
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,33±0,61	9,55±1,02	12,42±1,47*
Сегментоядерные нейтрофилы	13,75±5,17	2,25±0,25***	22,5±1,19 ^{vvv}
Лимфоциты	77,25±7,82	94,75±0,48*	65,75±0,85 ^{vvv}

Примечания: * – достоверное отличие от группы 1, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$;

*** – достоверное отличие от группы 1, критерий Стьюдента, $p \leq 0,001$;

^v – достоверное отличие от группы 2, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$;

^{vvv} – достоверное отличие от группы 2, критерий Стьюдента, $p \leq 0,001$.

Таблица 3
Биохимические показатели крови крыс после воздействия ИМП

Биохимические показатели крови	Группа 1 (гипоксия + минимальное воздействие)	Группа 2 (гипоксия + ИМП I)	Группа 3 (гипоксия + ИМП II)
Мочевина, ммоль/л	2,55±0,02	3,58±0,04*	4,70±0,60 ^v
Белок общий, г/л	73,27±1,78	79,75±3,06	74,5±5,72
γ -ГТТ, ед/л	11,77±0,08	6,50±1,19*	10±1,47

Примечания: * – достоверное отличие от группы 1, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$;

^v – достоверное отличие от группы 2, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$.

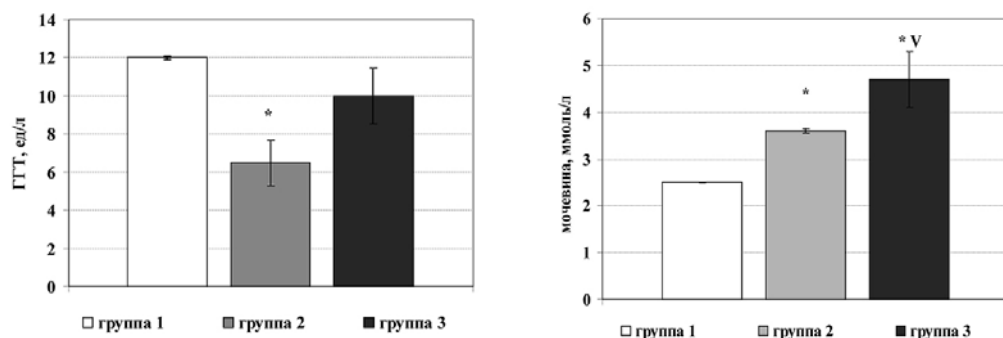


Рис. 1. Активность фермента γ -ГТТ и уровень мочевины при разных режимах воздействия.

Примечания: * – достоверное отличие от группы 1, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$;

^у – достоверное отличие от группы 2, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$.

Рост активности фермента γ -ГТТ в сыворотке крови экспериментальных животных после гипоксического воздействия может быть связан с его высвобождением из мембран клеток печени, поскольку известно, что именно этот фермент является наиболее чувствительным к повреждающим воздействиям различных факторов наряду с другими трансферазами [5, 24]. В связи с этим можно предположить, что воздействие гипоксии способствовало нарушению мембран клеток и их проницаемости с последующим выходом в плазму фермента [21, 22].

После воздействия ИМП в режиме I в крови крыс отмечалось достоверное увеличение концентрации мочевины

(на 41%, $p \leq 0,01$) и снижение уровня фермента γ -ГТТ (на 60%, $p \leq 0,01$) по сравнению с животными, которые подвергались только гипоксии (рис. 1). Изменение ферментативной активности γ -ГТТ указывает на то, что воздействие ИМП в исследуемом режиме способствовало восстановлению мембранных структур клетки, т.е. наблюдался гипоксопротекторный эффект ИМП.

О более высокой устойчивости организма к гипоксии у животных данной группы свидетельствует и рост числа эритроцитов в периферической крови (на 29%, $p \leq 0,01$), а также повышение уровня гемоглобина (на 25%, $p \leq 0,01$) (табл. 2, рис. 2). Поскольку средняя концентрация гемоглобина в эритроци-

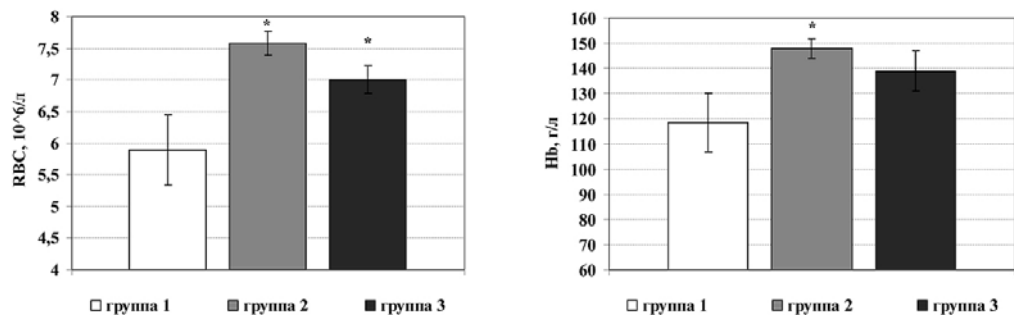


Рис. 2. Содержание эритроцитов и уровень гемоглобина при разных режимах воздействия.

Примечание: * – достоверное отличие от группы 1, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$.

те снижалась, можно сказать, что рост уровня гемоглобина произошел из-за увеличения количества эритроцитов.

Наряду с этим наблюдали развитие реакции переактивации, характеризующейся увеличением количества лимфоцитов в крови (выше верхней границы нормы – более 90%), биологический смысл которой направлен на сохранение активации без сброса в «стресс» [4].

После воздействия ИМП в режиме II отмечалось достоверное увеличение концентрации мочевины в сыворотке крови крыс на 31% ($p \leq 0,01$) по сравнению с группой животных, подвергнутых воздействию ИМП в режиме I, и на 85% ($p \leq 0,01$) – относительно группы животных, подвергавшихся только гипоксическому воздействию. Это могло быть связано с увеличением ее синтеза в печени. С другой стороны, подобные результаты могут объясняться и сгущением плазмы крови. Активность же фермента γ -ГГТ в крови достоверно не отличалась от его значений после гипоксического воздействия.

Отмечались негативные изменения в виде статистически значимых лейкоцитоза (на 50%, $p \leq 0,01$) и тромбоцитоза (на 50%, $p \leq 0,01$) (рис. 3), что, в свою очередь, и обуславливало повышение

уровня мочевины в сыворотке крови у этой группы животных. В связи с этим можно предположить, что ИМП в данном режиме не способствовало развитию протекторного эффекта. Однако отмечалось снижение процентного количества лимфоцитов в лейкоцитарной формуле на 31%, $p \leq 0,001$ (табл. 2), что свидетельствует об активации защитных систем организма.

Обсуждение результатов

Установлено, что магнитное поле, где присутствует колебание вектора магнитной индукции, обладает высоким уровнем биотропности, действует на биологические ткани, в частности, кровь, вызывая магнитогидродинамическую активацию биосреды. При этом согласно концепции афферентного синтеза, как механизма, составляющего физиологическую структуру функциональной системы (по Анохину П.К.), поля модулируют устойчивость системы организма к окружающей среде. На этом основании предварительное воздействие ИМП способствует скорейшему включению реакций, направленных на сохранение гомеостаза. В зависимости от режимов воздействия скорость включения и направленность защитных реак-

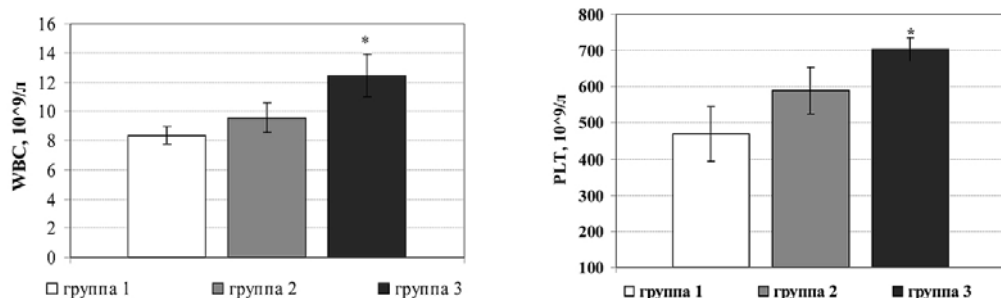


Рис. 3. Содержание лейкоцитов и тромбоцитов при разных режимах воздействия.

Примечание: * – достоверное отличие от группы 1, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$.

ций в исследуемом промежутке времени была различна.

В представленных результатах показано, что preconditionирующее действие ИМП в режиме I способствовало развитию важной адаптивной реакции к гипоксии – усилению эритропоэза. Наблюдалось повышение кислородной емкости крови за счет выхода эритроцитов из кровяных депо (рост количества эритроцитов и повышение уровня гемоглобина при сниженной средней концентрации гемоглобина в эритроците (табл. 2)). Следует подчеркнуть, что полученные результаты согласуются с научными данными [8, 16, 20], где показано усиление эритропоэза в условиях воздействия электрического магнитного поля низкой интенсивности. Приспособительной реакцией к гипоксии является возбуждение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (стресс-синдром). Выделяющиеся при этом глюкокортикоиды стабилизируют мембрану клетки, снижая, тем самым, действие гипоксического фактора и повышая устойчивость тканей к недостатку кислорода [10, 24]. Поскольку клеточная мембрана является первичной мишенью действия магнитного поля [2, 8], а фермент γ -ГГТ, в свою очередь, является ее компонентом, можно предположить, что снижение активности γ -ГГТ на 54% (табл. 3) свидетельствует о сохранении ее структурно- функциональной целостности при воздействии ИМП в режиме I. Вместе с тем нарастание стресс-лимитирующих гормонов могло отражать переактивацию адаптационных процессов (процентное содержание лимфоцитов в лейкоцитарной формуле более 90%).

При preconditionирующем воздействии ИМП в режиме II наблюдали ана-

логичную картину – включение приспособительной реакции к гипобарической гипоксии путем усиления эритропоэза (табл. 2). Однако состояние белой крови при данном воздействии было иным. Увеличение количества тромбоцитов (на 50%, $p \leq 0,05$), вероятно, связано с выходом адреналина, оказывающего стимулирующее действие на свертывающую систему крови, вызывая сгущение крови (рост концентрации мочевины на 84%, $p \leq 0,05$). Наше предположение об активации стресс-реализующей системы подтверждает и регистрируемый лейкоцитоз. Также следует отметить, что активность фермента γ -ГГТ находилась на том же уровне, что и после воздействия гипоксии. Вместе с тем наблюдали снижение уровня реактивности организма при воздействии ИМП в режиме II (снижение процентного содержания лимфоцитов на 31%, $p \leq 0,05$) относительно группы ИМП в режиме I.

Выводы

Скорость включения и направленность защитных реакций к гипоксии в исследуемом промежутке времени зависела от выбора режимов ИМП.

Низкочастотное ИМП в режиме I способствовало росту резистентности к гипоксии с одновременным повышением уровня реактивности организма.

ИМП в режиме II вызвало мобилизацию защитных сил организма, но не привело к развитию устойчивости организма к гипоксии.

Воздействие ИМП способствовало развитию адаптивных реакций, однако скорость их включения в исследуемом промежутке времени (6 ч) была различной в зависимости от выбранного режима.

Полученные результаты подтверждают закономерность, описанную в патенте РФ № 2432972⁽¹³⁾, где указано, что восстановление функционального состояния организма низкочастотным импульсным магнитным полем происходит в режиме 1,5-3,5-1,5 мТл («комфорт-дискомфорт-комфорт»).

Таким образом, показана возможность применения низкочастотного импульсного магнитного поля в качестве протектора стресс-индуцированного состояния, вызванного гипоксическим воздействием.

Список литературы

1. **Абрамович С.Г., Куликов А.Г., Долбилкин А.Ю.** Общая магнитотерапия при артериальной гипертензии // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2014. – Т. 13. – С. 50-55.
2. **Большаков М.А.** Физиологические механизмы действия радиочастотных электромагнитных излучений на биообъекты разных уровней организации: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – Томск. – 2002. – 319 с.
3. **Бугоркова О.В., Никанорова Е.А., Иванов К.Ю., Хаймович Т.И., Лобкаева Е.П., Девяткова Н.С.** Влияние низкочастотного магнитного поля на модификацию процессов клеточной пролиферации // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, серия «Биология». – 2006. – Вып. 1(11). – С. 188-192.
4. **Гаркави Л.Х.** Активационная терапия. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета. – 2006. – 256 с.
5. **Гольдберг Е.Д., Гольдберг А.М., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н.** Гипоксия и система крови. – Томск: Изд-во Томского университета. – 2006. – 142 с.
6. **Городецкая О.С.** Общая магнитотерапия в комплексном лечении хронического эндометрита: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Иваново. – 2013. – 118 с.
7. **Жукова Г.В.** Использование принципов активационной терапии для повышения противоопухолевой эффективности электромагнитных воздействий в эксперименте: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ростов-на-Дону. – 2006. – 364 с.
8. **Замай Т.Н., Маркова Е.В., Титова Н.М.** Особенности функционирования клеточной мембраны в условиях воздействия электромагнитного поля // Вестник КрасГУ. – 2004. – № 7. – С. 154-162.
9. **Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д. и др.** Эффект пептидов животного происхождения, оцениваемый по чувствительности к гипоксии, некоторым этологическим характеристикам и показателям крови крыс // Биомедицина. – 2013. – № 1. – С. 6-15.
10. **Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д. и др.** Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств // Методич. реком. ФМБА России МР.21.44-2017. – М. – 2017.
11. **Куликов А.Г., Воронина Д.Д.** Возможности общей магнитотерапии в лечении и реабилитации (обзор) // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2016. – Т. 93. – № 2. – С. 48-52.
12. **Куликов А.Г., Кузовлева Е.В., Еровиченков А.А., Михайленко О.С.** Оценка эффективности общей магнитотерапии в коррекции микроциркуляторных нарушений при роже // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2013. – № 6. – С. 26-30.
13. **Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.** Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: Морион. – 2000. – 319 с.
14. **Лобкаева Е.П.** Теоретическое обоснование подбора параметров импульсного магнитного поля для достижения стойкого терапевтического эффекта // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2006. – № 1-2. – С. 12-20.
15. **Никитин В.Н.** Гематологический атлас сельскохозяйственных и лабораторных животных. – М.: Гос. изд-во сель.-хоз. литературы. – 1956. – 262 с.
16. **Перельмутер В.М., Ча В.А., Чуприкова Е.М.** Медико-биологические аспекты взаимодействия электромагнитных волн с организмом: уч. пособ. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета. – 2009. – 128 с.
17. **Семенов Х.Х., Каркищенко В.Н., Матвеев Е.Л.** Новые оппозитные линии крыс как биомодель индивидуальной чувствительно-

- сти к острой гипобарической гипоксии // Биомедицина. – 2011. – № 2. – С. 46-49.
18. Способ коррекции функционального состояния организма / Лобкаева Е.П., Десяткова Н.С., Синельникова И.А., Шевцов И.Д., Ошевенский Л.В., Крылов В.Н., Федотов В.Д., Маслов А.Г. – Патент РФ № 2432972(13) С1 МПК А 61N 2/00, бюлл. № 31, 2011.
19. *Трахтенберг И.Н. и др.* Проблемы нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы). – М.: Медицина. – 1991. – 208 с.
20. *Трибрат Н.С., Чуян Е.Н., Раваева М.Ю.* Влияние электромагнитных излучений различного диапазона на процессы микроциркуляции // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22(61). – № 4. – С. 182-201.
21. *Хайбуллина З.Р., Вахидова Н.Т.* Состояние периферической крови при острой гипоксии в эксперименте // Медицина: вызовы сегодняшнего дня: Мат-лы между. науч. конф. – Челябинск: Два комсомольца. – 2012. – С. 24-29.
22. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д. и др.* Гипоксия физической нагрузки: изучение у человека и лабораторных животных // Биомедицина. – 2014. – № 4. – С. 4-17.
23. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семёнов Х.Х.* Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 149-157.
24. <http://labtest-spb.ru/statji/ggt/>
- References**
1. *Abramovich S.G., Kulikov A.G., Dolbilkin A.Yu.* Obschaja magnitoterapija pri arterialnoj gipertonii [General magnetic therapy of arterial hypertension]. Physiotherapy, balneology and rehabilitation. 2014. V. 13. Pp. 50-55. (In Russian).
2. *Bolshakov M.A.* Fiziologicheskie mehanizmy dejstva radiochastotnyh elektromagnitnyh izluchenij na bioobjekty raznyh urovnej organizacii [Physiological mechanisms of action of radiofrequency electromagnetic radiation on biological objects of different organization levels]: avtoref. diss. ... d-ra biol. nauk [the author's abstract of the dissertation ... of the Doctor of Biological Sciences]. Tomsk. 2002. 319 p. (In Russian).
3. *Bugorkova O.V., Nikanorova E.A., Ivanov K.Yu., Haymovich T.I., Lobkaeva E.P., Devjatkov N.S.* Vlijanie nizkochastotnogo magnitnogo polja na modifikatsiju processov kletочноj proliferacii [The influence of low frequency magnetic field on the modification of the processes of cell proliferation]. Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo, seriya «Biologiya» [Bulletin of the Nizhny Novgorod University. N.I. Lobachevsky, a series of "Biology"]. 2006. Issue. 1(11). Pp. 188-192. (In Russian).
4. *Garkavi L.H.* Aktivatsionnaja terapija [Activation therapy]. Rostov-on-Don: Izd-vo Rostovskogo universiteta. 2006. 256 p. (In Russian).
5. *Gol'dberg E.D., Gol'dberg A.M., Dygaj A.M., Zyuz'kov G.N.* Gipoksija i sistema krovi [Hypoxia and blood system]. Tomsk: Izd-vo Tomskogo universiteta. 2006. 142 p. (In Russian).
6. *Gorodeckaja O.S.* Obschaja magnitoterapija v kompleksnom lechenii hronicheskogo endometrita [General magnetotherapy in the complex treatment of chronic endometritis]: avtoref. diss. ... kand. med. nauk [the author's abstract of the dissertation ... of the Candidate of Medical Sciences]. Ivanovo. 2013. 118 p. (In Russian).
7. *Zhukova G.V.* Ispolzovanie printsipov aktivatsionnoj terapii dlja povyshenija protivopuholjevoj effektivnosti elektromagnitnyh vozdeistvij v eksperimente [Principles of activation therapy to enhance the antitumor efficiency of electromagnetic effects in the experiment]: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk [the author's abstract of the dissertation ... of the Doctor of Biological Sciences]. Rostov-on-Don. 2006. 364 p. (In Russian).
8. *Zamay T.N., Markova E.V., Titova N.M.* Osobennosti funkcionirovanija kletочноj membrany v uslovijah vozdeistvija elektromagnitnogo polja [Features of functioning of the cell membrane under the impact of the electromagnetic field]. Vestnik KrasGU [Bulletin of Krasnoyarsk State University]. 2004. No. 7. Pp. 154-162. (In Russian).
9. *Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Semenov Kh.Kh., Kapanadze G.D., et al.* Effekt peptidov zhivotnogo proishozhdenija,

- ocenivaemyj po chuvstvitelnosti k gipoksii, nekotorym etologicheskim harakteristikam i pokazateljam krovi krysa [Effect of peptides of animal origin, assessed by sensitivity to hypoxia, some of the ethological characteristics and indices of rat blood]. *Biomedicine*. 2013. No. 1. Pp. 6-15. (In Russian).
10. **Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kapanadze G.D., et al.** Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antigipoksicheskoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv [Biomedical (preclinical) study of antihypoxic activity of drugs] Methodical recommendations of FMBA of Russia MR.21.44-2017. Moscow. 2017.
11. **Kulikov A.G., Voronina D.D.** Vozmozhnosti obshej magnitoterapii v lechenii i reabilitatsii (obzor) [Ability of general magnetic therapy in the treatment and rehabilitation (review)]. Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoy kultury [Questions of balneology, physiotherapy and therapeutic physical culture]. 2016. V. 93. No. 2. Pp. 48-52. (In Russian).
12. **Kulikov A.G., Kuzovleva E.V., Erovenkov A.A., Mihajlenko O.S.** Otsenka effektivnosti obshej magnitoterapii v korrektsii mikrotsirkulyatornykh narushenij pri roje [Evaluation of the effectiveness of general magnetic therapy for the correction of microcirculatory disorders at the erysipelas]. *Physiotherapy, balneology and rehabilitation*. 2013. No. 6. Pp. 26-30. (In Russian).
13. **Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N.** Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel [Statistical methods in biomedical studies using Excel]. Kiev: Morion. 2000. 319 p. (In Russian).
14. **Lobkaeva E.P.** Teoreticheskoe obosnovanie podbora parametrov impulsnogo magnitnogo polya dlya dostizheniya stojkogo terapevticheskogo effekta [Theoretical rationale for the selection of parameters of pulsed magnetic fields to achieve a stable therapeutic effect]. *Biomedical technologies and radio electronics*. 2006. No. 1-2. Pp. 12-20. (In Russian).
15. **Nikitin V.N.** Gematologicheskij atlas selskohozyajstvennykh i laboratornykh zhivotnykh [Hematology atlas of farm and laboratory animals]. Moscow: Gos. izd-vo sel.-hoz. literatury. 1956. 262 p. (In Russian).
16. **Perelmutter V.M., Cha V.A., Chuprikova E.M.** Mediko-biologicheskie aspekty vsaimodeistviya elektromagnitnykh voln s organizmom: uch. posob. [Medical and biological aspects of the interaction of electromagnetic waves with human body: study guide]. Tomsk: Izd-vo Tomskogo politekhnicheskogo universiteta. 2009. 128 p. (In Russian).
17. **Semenov Kh.Kh., Karkischenko V.N., Matveyenko E.L.** Novye oppozitnyye linii krysa kak biomodel individualnoj chuvstvitelnosti k ostroj gipobaricheskoj gipoksii [New opposite lines of rats as a biomodel of individual sensitivity to acute hypobaric hypoxia]. *Biomedicine*. 2011. No. 2. Pp. 46-49. (In Russian).
18. Sposob korrektsii funktsionalnogo sostojaniya organizma [Method of correction of functional state of the organism]. Lobkaeva E.P., Devyatkov N.S., Sinelnikova I.A., Shevtsov I.D., Oshevenskij L.V., Krylov V.D., Fedotov V.D., Maslov A.G. Patent of Russian Federation No. 2432972⁽¹³⁾ C1 IPC AS 2/00 61N, bull. No. 31. 2011. (In Russian).
19. **Trakhtenberg I.N., et al.** Problemy normy v toksikologii (sovremennyye predstavleniya i metodicheskie podhody, osnovnyye parametry i konstanty) [The problem of norm in toxicology (modern concepts and methodological approaches, the main parameters and constants)]. Moscow: Medicina. 1991. 208 p. (In Russian).
20. **Tribrat N.S., Chuyan E.N., Ravaeva M.Yu.** Vliyanie elektromagnitnykh izluchenij raslichnogo diapazona na processy mikrotsirkulyatsii [The influence of electromagnetic radiation of various ranges on the processes of microcirculation]. Uchenye zapiski Tavricheskogo natsionalnogo universiteta im. V.I. Vernadskogo, seriya «Biologiya, himiya» [Scientific notes of the Taurida National University named after V.I. Vernadsky, series "Biology, Chemistry"]. 2009. V. 22(61). No. 4. Pp. 182-201. (In Russian).
21. **Hajbullina Z.R., Vahidova N.T.** Sostoyanie perifericheskoy krovi pri ostroj gipoksii v eksperimente [The condition of peripheral blood in acute hypoxia in experiment]. Meditsina: vyzovy segodnyashnego dnya: Matly mezhd. nauch. konf. [Medicine: challenges of today: Proceedings of the International scientific conference]. Chelyabinsk: Dva komsomoltsa. 2012. Pp. 24-29. (In Russian).
22. **Shustov E.B., Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Kapanadze G.D., et al.** Gipoksiya fizicheskoy nagruzki: izuchenie u

cheloveka i laboratornyh zhivotnyh [Hypoxia of physical activity: study in human and laboratory animals]. Biomedicine. 2014. No. 4. Pp. 4-17. (In Russian).

23. *Shustov E.B., Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Semenov Kh.Kh.* Analiz parametrov individualnoj ustojchivosti laboratornyh zhivotnyh k gipoksii v interesah biologicheskogo modelirovaniya

nejroprotektornogo i antigipoksicheskogo deistviya lekarstvennyh sredstv [An analysis of the parameters of individual susceptibility of laboratory animals to hypoxia in the interests of biological modeling of neuroprotective and antihypoxic action of drugs]. Biomedicine. 2013. No. 4. Pp. 149-157. (In Russian).

24. <http://labtest-spb.ru/statji/ggt/>

The possibility of applying a pulsed magnetic field as a protector of damage action of hypoxia

V.N. Krylov, E.P. Lobkaeva, L.V. Oshevenskiy, O.M. Labyntseva,
O.A. Zakharova, V.D. Fedotov, Yu.E. Ananieva, E.G. Rohmistrova

The preconditioning effect of different pulsed magnetic field regimes on hematological and biochemical parameters of blood of rats exposed to hypobaric hypoxia was studied. It was established that the impact of pulsed magnetic field leads to the development of adaptive response, however, the rate of its activation can be different depending on the selected mode. The possibility of using a low-frequency pulsed magnetic field as a protector of a stress-induced condition caused by hypoxic exposure is shown.

Key words: pulsed magnetic field, hypoxia, resistance, blood parameters.

Влияние нового производного аминокэтанола и дикарбоновых кислот на физическую работоспособность при аэробных тренировочных нагрузках

С.В. Радько¹, С.В. Оковитый¹, Е.О. Горшкова¹, М.М. Любишин¹,
Ю.Д. Болотина¹, И.А. Берзин²

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, Санкт-Петербург

² – Федеральное медико-биологическое агентство, Москва

Контактная информация: Радько Степан Владимирович, stepan.radko@pharminnotech.com

Проведена оценка влияния нового производного аминокэтанола и дикарбоновых кислот (ФДЭС) на общую выносливость, скорость плавания, морфологические и биохимические изменения у животных при аэробных тренировочных нагрузках в сравнении с синтетическим адаптогеном с выраженным актопротекторным действием – этилтиобензимидазола гидрохлоридом. Установлено, что повышение физической работоспособности при применении ФДЭС сопоставимо с таковым при применении этилтиобензимидазола гидрохлорида. Выносливость животных, оцениваемая по количеству пройденных бассейнов и увеличению общего времени плавания, на фоне применения ФДЭС возросла в 1,92 и 3,14 раза соответственно. Изменений в скорости плавания в обеих группах отмечено не было. Применение ФДЭС при тренирующих нагрузках способствует развитию компенсаторной гипертрофии миокарда.

Ключевые слова: диэтиламинокэтанола производное, физическая работоспособность, этилтиобензимидазолы.

Введение

Характерным компонентом снижения физической работоспособности является развитие в процессе работы энергодефицита с последующим формированием неблагоприятных сдвигов в энергетическом обмене. Тренировки модифицируют метаболический потенциал, морфологию и физиологию скелетных мышц, стимулируют митохондриальный биогенез и усиливают β -окисление жирных кислот, тем самым смещая фенотипическую адаптацию в сторону аэробного окисления [16]. Переход от состояния покоя к интенсивной мышечной деятельности и резкое уси-

ление расходования энергии мышечными клетками сопровождается гипоксией нагрузки, возникающей вследствие несоответствия между возможностями энергопродуцирующих систем энергетическим потребностям клетки, а также несоразмерности потребности в кислороде и возможностями его доставки системами кровоснабжения и внешнего дыхания. При этом дыхательная цепь митохондрий не успевает освобождаться от избытка ионов водорода и электронов, что приводит к увеличению восстановленности дыхательных переносчиков и ограничению окисления субстратов.

Предполагается, что в организме человека имеется резерв неиспользуемой активности митохондриального окислительного фосфорилирования, и проблема повышения физической работоспособности (ФР) может решаться путем поддержания энергопродукции митохондрий за счет обеспечения субстратом, способным окисляться и обеспечивать аэробный ресинтез АТФ в условиях гипоксии нагрузки [9].

Одним из путей покрытия энергодефицита в мышечной ткани в условиях недостатка кислорода является восстановительный синтез янтарной кислоты, сопровождающийся образованием АТФ, или применение сукцинатсодержащих препаратов. При этом экзогенно вводимый сукцинат может реализовывать свои эффекты как интермедиат цикла трикарбоновых кислот и агонист специфических (SUCNR1, GPR91) рецепторов [5, 6].

Целью данного исследования стала оценка влияния соединения аминокислоты с интермедиатами цикла трикарбоновых кислот на физическую работоспособность при аэробных тренировочных нагрузках.

Материалы и методы

Исследования проводились на беспородных мышах-самцах массой 22-24 г, 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», согласно утвержденному письменному протоколу. Животные были получены из питомника «Рапполово»

(Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде. Выведение животных из эксперимента осуществляли в соответствии с «Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (1986) и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях», с помощью передозировки хлоралгидрата, вводимого внутрибрюшинно.

Предварительный отбор животных осуществляли с помощью методики челночного плавания, что позволило оценить начальную ФР и сделать выборку максимально однородной перед рандомизацией по экспериментальным группам [1]. Соответствующих критериям отбора животных случайным образом делили на 5 групп, 3 из которых подвергалась тренировкам (опытные группы), а 4-я и 5-я – нет (интактная группа и группа ФДЭС без тренировок). В каждой группе было по 10 животных.

Одна из трех тренировавшихся групп и одна из не тренировавшихся получала производное аминокислоты – бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат (ФДЭС), синтезированный на кафедре органической химии СПХФА, в дозе 75 мг/кг за 30 мин до начала каждой тренировки. В качестве препарата сравнения использовали син-

тетический адаптоген с выраженным актопротекторным действием – этилтиобензимидазола гидрохлорид [4, 8]. Соединение было ресинтезировано на кафедре органической химии СПХФА и вводилось второй группе мышей в дозе 25 мг/кг сразу после окончания каждой тренировки, т.к. именно такое применение обеспечивает максимально выраженный актопротекторный эффект [3]. Третья (контрольная) группа получала эквивалентное количество физ. р-ра. Все вещества вводились внутривентрикулярно, а их эффективные дозы были установлены в предварительной серии экспериментов на модели вынужденного плавания.

Тренировки проводили в плавательной установке, представляющей собой 200-литровый бассейн высотой 40 см, шириной 35 см и длиной 80 см, заполняемый водой до половины. Внутри него располагался внутренний контур из оргстекла высотой 30 см, шириной 30 см и длиной 75 см, разделенный на 10 отсеков (15х15 см каждый). Температура воды постоянно поддерживалась на уровне 30-32°C [7].

Плавательные тренировки проходили два раза в день с перерывом в 1 ч, пять дней в неделю на протяжении четырех недель в одно и то же время. Продолжительность первых трех тренировок составляла 1 ч один раз в день, для адаптации животных к нагрузке. Длительность одной обычной тренировки – 1,5 ч (табл. 1). Во время тренировки мыши каждый раз размещались в отсеках установки произвольным образом. Животные получали суточную норму еды после окончания второй тренировки, что позволяло избежать перекармливания перед тренировкой, негативно сказывающегося на тренировочном процессе.

По окончании тренировок проводили тест челночного плавания [1]: оценивали время, необходимое животному для совершения отдельных заплывов, их количество, время плавания в целом и скорость плавания по времени прохождения 10, 20, 30 и 40 бассейнов. После выведения животных из эксперимента извлекали сердце и с помощью весов СЕ124-С («Сартогосм», Россия) определяли массу миокарда и левого желудочка.

Таблица 1

Схема тренировочного процесса

Показатель		Количество и длительность тренировок	
		1-я тренировка	2-я тренировка
Первичный тест	0 день		
1-я неделя	1-3 дни	1 ч	-
	4-5 дни	1,5 ч	1,5 ч
	6-7 дни	Отдых	
2-я неделя	8-12 дни	1,5 ч	1,5 ч
	13-14 дни	Отдых	
3-я неделя	15-19 дни	1,5 ч	1,5 ч
	20-21 дни	Отдых	
4-я неделя	22-26 дни	1,5 ч	1,5 ч
	27-28 дни	Отдых	

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Осуществляли 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). Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: средняя арифметическая (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты исследования

Установлено, что регулярная аэробная тренирующая физическая нагрузка вызывает повышение выносливости относительно нетренированных животных (рис.). Так, в итоговом тесте мыши контрольной группы проплыли в 1,36 раза большее количество бассейнов по сравнению с исходным уровнем.

Исследуемые фарм. препараты значительно повышали физическую выносливость животных, увеличивая количество пройденных бассейнов в 1,91 раза (на фоне ФДЭС) и в 2,07 раза (в группе препарата сравнения). Данные результаты достоверно отличались от таковых в контроле и по сравнению с нетренировавшимися животными.

На фоне применения ФДЭС без тренировок произошло увеличение количества выполненных тестов в 1,71 раза ($p < 0,05$) относительно исходных значений. Количество пройденных бассейнов было достоверно выше, чем в контрольной группе и у интактных животных,

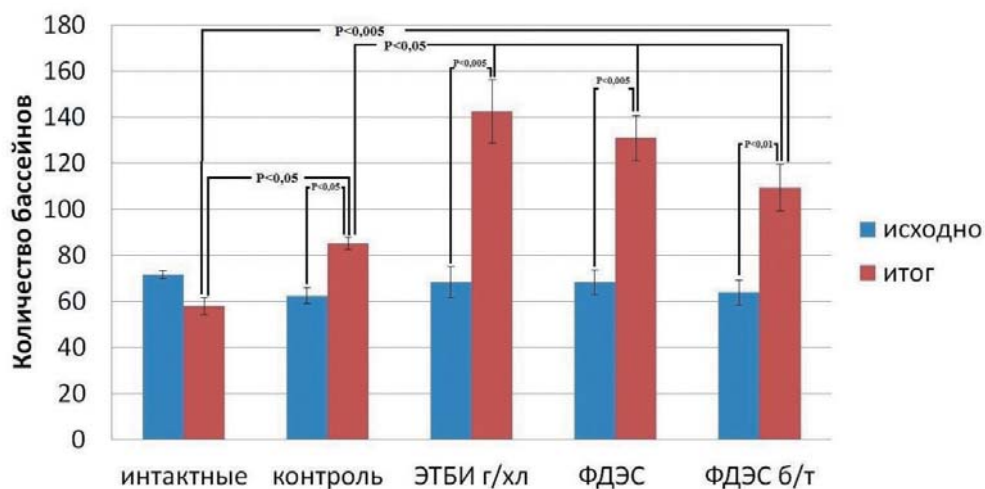


Рис. Влияние аэробной тренировки на количество пройденных бассейнов в тесте «Челночное плавание».

по времени плавания достоверных различий с контрольными животными не выявлено.

При проведении факторного анализа было установлено, что повышение выносливости у животных на 21,97% было обусловлено тренировками и на 78,02% – действием ФДЭС.

Время прохождения 10-ти, 20-ти, 30-ти и 40-ка бассейнов в тренировавшихся группах имело тенденцию к возрастанию в отличие от интактных животных. Это может быть связано с тем, что во время тренировок без дополнительной стимуляции скоростных свойств у животных вырабатывается новый стереотип плавательных движений, ориентированный на выносливость, что проявляется в более экономном расходовании энергии за счет снижения скорости плавания.

Соотношение массы левого желудочка / массы миокарда у животных, получавших ФДЭС, составило 74,39% против 70,18% в группе препарата сравнения и 70,48% – в контрольной группе. Между этими значениями не было обнаружено значимых различий, однако у животных, которым вводился ФДЭС, этот показатель достоверно отличался от такового в интактной группе (67,25%) (табл. 2). В группе нетренировавшихся животных,

получавших ФДЭС, морфологические параметры миокарда не отличались от таковых в интактной группе.

Обсуждение результатов

Среди препаратов с актопротекторным действием одну из самых изученных групп составляют производные бензимидазола, влияние которых на физическую работоспособность оценивалось как у животных, так и у людей [2, 4, 8]. Так, этилтиобензимидазола гидробромид (бемитил) в дозе 100 мг/кг у грызунов в условиях гипотермии (+6°C без груза) и гипертермии (+40°C с грузом 5% от массы тела) повышал время плавания мышей на 17% по сравнению с контролем [12]. При многократном введении мышам бемитила (50 мг/кг) у них увеличивалась продолжительность плавания с грузом (5% от массы тела) до полного утомления на 34,2%. У крыс регулярная физическая нагрузка (плавание по 30 мин через день без груза) на фоне препарата через 14 дней приводила к повышению работоспособности на 11,4% по сравнению с контролем, через 28 дней – на 18,4%, а через 42 дня – на 16,6% [11].

С этой точки зрения актопротекторный потенциал производных аминокэтанола изучен гораздо хуже. Традиционно

Таблица 2

Влияние тренировочных нагрузок на соотношение массы левого желудочка к массе миокарда

Группа	Интактные	Контроль	Этилтиобензимидазол	ФДЭС	ФДЭС без тренировок
Млж/Мм, %	67,25±3,14	70,48±4,68	70,18±2,33	74,39±6,41*	68,33±2,54

Примечание: Млж – масса левого желудочка; Мм – масса миокарда.

* – достоверные отличия относительно интактной группы (p<0,05).

фармакологический профиль этих препаратов рассматривается как нейропротекторный и ноотропный, благодаря их способности увеличивать образование ацетилхолина [14, 17]. Тем не менее, в литературе описано влияние диметиламиноэтанола (ДМАЭ) на время и скорость плавания мышей. В низких дозах (10-80 мг/кг) препарат недостоверно уменьшал время, необходимое животным для прохождения бассейна, а в высоких (640-1280 мг/кг) – значимо увеличивал время плавания, что говорит о его субстратном действии на этот процесс [18].

В другом исследовании [15] участвовали 120 здоровых солдат, получавших ДМАЭ в дозе 100-200 мг или 150-300 мг ежедневно в течение 2-х недель. Препарат дозозависимо увеличивал способность запоминания, повышал концентрацию внимания и логическое мышление, улучшал ассоциативные способности и математические вычисления. Одновременно наблюдалось увеличение силовых и скоростных показателей физической работоспособности. Комбинация ДМАЭ битартрата с извлечением из женьшеня, витаминами и микроэлементами повышала физическую работоспособность и утилизацию кислорода мышцами [19].

Увеличение соотношения массы левого желудочка / массы миокарда традиционно расценивается как компенсаторный процесс гипертрофии левого желудочка на фоне физических нагрузок [10]. В проведенном эксперименте отмечена тенденция к увеличению данного показателя, однако только в группе, получавшей ФДЭС, она достигла статистической разницы с интактными животными. Возможным объяснением

может служить способность сукцината (в частности, эндогенно образующегося при гипоксии в миокарде) через специфические рецепторы (SUCNR1) запустить фосфорилирование внеклеточного домена сигнал-регулирующей киназы (ERK1/2), повышать внутриклеточное содержание кальция и цАМФ, увеличивать экспрессию гена кальций-кальмодулин-зависимой протеинкиназы II δ (CaMKII δ), стимулировать перемещение гистондеацетилазы 5 (HDAC5) в цитоплазму, что является внутриклеточным сигналом для запуска процессов гипертрофии миокарда [13, 20, 21].

Таким образом, проведенное исследование выявило актопротекторное действие нового производного аминокислоты с дикарбоновыми кислотами, имеющее сходную выраженность и направленность эффектов с этилтиобензидазолом гидрохлоридом. На фоне применения обоих препаратов произошло значительное увеличение физической выносливости при отсутствии влияния на скоростные показатели.

Выводы

1. Выбранный тренировочный режим позволяет имитировать тренировки аэробной мощности, направленные на развитие выносливости, и оценивать влияние на него различных фармакологических средств.

2. Новое производное – аминокислота (2E)-4-[2-(диэтиламино)этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоат (2:1) – обладает актопротекторной активностью, увеличивая выносливость экспериментальных животных при аэробной физической нагрузке.

3. Выраженность актопротекторного эффекта нового производного аминокислоты

танолола, применяемого в дозе 75 мг/кг, сопоставима с таковой этилтиобензимидазола гидрохлорида в дозе 25 мг/кг.

4. Новое соединение оказывает преимущественное влияние на показатели физической выносливости без изменения скоростных характеристик плавания животных.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции / Под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. – М., СПб: Айсинг. – 2013. – 132 с.
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Оковитый С.В. Очерки спортивной фармакологии. Т. 2. Векторы фармакопротекции / Под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. – М., СПб: Айсинг. – 2014. – 448 с.
3. Новиков В.С., Горанчук В.В., Шустов Е.Б. Физиология экстремальных состояний. – М.: Наука. – 1998. – 247 с.
4. Оковитый С.В. Актопротекторы как синтетические адаптогены нового поколения // Психофармакология и биологическая наркология. – 2003. – Т. 3. – № 1-2. – С. 510-516.
5. Оковитый С.В., Радько С.В., Шустов Е.Б. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49. – № 9. – С. 24-28.
6. Оковитый С.В., Радько С.В. Применение сукцинатов в спорте // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2015. – Т. 92. – № 6. – С. 59-65.
7. Радько С.В., Оковитый С.В., Куликов А.Н., Чистякова Е.Ю. Модель оценки влияния фармакологических средств на динамику адаптации к физической нагрузке // Биомедицина. – 2016. – № 3. – С. 35-42.
8. Родичкин П.В., Оковитый С.В. Фармакологическая коррекция деятельности системы управления движениями у спортсменов высокого класса с помощью адаптогенов // Психофармакология и биологическая наркология. – 2003. – Т. 3. – № 1-2. – С. 526-531.
9. Рямова К.А., Розенфельд А.С. Поддержание работоспособности и относительного состояния рН среды средствами субстратной поддержки митохондриального аппарата // Вестник ЮУрГУ. Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура». – 2014. – Т. 14. – № 4. – С. 14-19.
10. Савка В.Г., Радько М.М., Воробьев А.А., Марценяк И.В., Бабюк А.В. Спортивная морфология. – Черновцы: Книги XXI. – 2005. – 196 с.
11. Сыров В.Н., Шахмурова Г.А. Влияние фитостероидов и бемитила на функциональные, метаболические и иммунологические показатели работоспособности в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71. – № 5. – С. 40-43.
12. Цублова Е.Г., Иванова Т.Г., Иванова Т.Н., Яснецов В.В. Экспериментальная оценка актопротекторной активности производных азотсодержащих гетероциклических соединений в экстремальных условиях // Военно-медицинский журнал. – 2013. – № 7. – С. 17-19.
13. Aguiar C.J., Rocha-Franco J.A., Sousa P.A., Santos A.K., Ladeira M., Rocha-Resende C., Ladeira L.O., Resende R.R., Botoni F.A., Barrouin Melo M., Lima C.X., Carballido J.M., Cunha T.M., Menezes G.B., Guatimosim S., Leite M.F. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation // Cell Communication and Signaling. – 2014. – V. 78. – No. 12. – Pp. 1-17.
14. Akesson B. Effects of analogues of ethanolamine and choline on phospholipid metabolism in rat hepatocytes // Biochem. J. – 1977. – V. 168. – No. 3. – Pp. 401-408.
15. Danysz A., Smietanski J., Panek W. The influence of 2-dimethylaminethanol (DMAE) on the mental and physical efficiency in man // Act. Nerv. Super. – 1967. – V. 4. – No. 9. – P. 417.
16. Ferraro E., Giammarioli A.M., Chiandotto S., Spoletini I., Rosano G. Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy // Antioxidants & Redox Signaling. – 2014. – V. 21. – No. 1. – Pp. 154-171.
17. Haidar N.E., Carrara M., Andriamampandry C., Kanfer J.N., Freysz L., Dreyfus H., Masarelli R. Incorporation of [3H]ethanolamine into acetylcholine by a human cholinergic neuroblastoma clone // Neurochem. Res. – 1994. – V. 19. – No. 1. – Pp. 9-13.
18. Latz A., Kornetsky C., Bain G., Goldman M. Swimming performance of mice as affected by

antidepressant drugs and baseline levels // *Psychopharmacologia*. – 1966. – V. 10. – No. 1. – Pp. 67-88.

19. *Pieralisi G., Ripari P., Vecchiet L.* Effects of a standardized ginseng extract combined with dimethylaminoethanolbitartrate, vitamins, minerals, and trace elements on physical performance during exercise // *Clin. Ther.* – 1991. – V. 13. – No. 3. – Pp. 373-382.
20. *Tonack S., Tang C., Offermanns S.* Endogenous metabolites as ligands for G protein-coupled receptors modulating risk factors for metabolic and cardiovascular disease // *Heart and Circulatory Physiology – Am. J. of Physiology*. – 2012. – V. 304. – No. 4. – Pp. 501-513.
21. *Yang L., Yu D., Fan H.H., Feng Y., Hu L., Zhang W-Y., Zhou K., Mo X-M.* Triggering the succinate receptor GPR91 enhances pressure overload-induced right ventricular hypertrophy // *Int. J. of Clinical and Experimental Pathology*. – 2014. – V. 9. – No. 7. – Pp. 5414-28.

References

1. *Karkischenko N.N., Uyba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B.* Oчерки sportivnoy farmakologii. T. 1. Vectory extrapoliyacii [Sketches of sports pharmacology. Vol. 1. Extrapolation vectors]. Ed. by N.N. Karkischenko, V.V. Uyba. Moscow, Saint-Petersburg: Aysing. 2013. 132 p. (In Russian).
2. *Karkischenko N.N., Uyba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kotenko K.V., Okovityi S.V.* Oчерки sportivnoy farmakologii. T. 2. Vectory farmakoterapii [Sketches of sports pharmacology. Vol. 1. Pharmacoprotection vectors]. Ed. by N.N. Karkischenko, V.V. Uyba. Moscow, Saint-Petersburg: Aysing. 2014. 448 p. (In Russian).
3. *Novikov V.S., Goranchuk V.V., Shustov E.B.* Fiziologiya ekstremal'nyh sostojanij [Physiology of extreme conditions]. Moscow: Nauka. 1998. 247 p. (In Russian).
4. *Okovityi S.V.* Aktoprotektori kak sinteticheskie adaptogeni novogo pokoleniya [Actoprotectors as synthetic adaptogens of the new generation]. Psihofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya [Psychopharmacology and biological narcology]. 2003. V. 3. No. 1-2. Pp. 510-516. (In Russian).
5. *Okovityi S.V., Radko S.V., Shustov E.B.* Sukcinatnye retseptori (SUCNR1) kak perspektivnaya mishen farmakoterapii [Succinate receptors (SUCNR1) as a promising target of pharmaco-

therapy]. *Chemical and Pharmaceutical Journal*. 2015. V. 49. No. 9. Pp. 24-28. (In Russian).

6. *Okovityi S.V., Radko S.V.* Primenenie suksinatov v sporte [The use of succinates in sports]. Voprosi kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoy kulturi [Questions of balneology, physiotherapy and therapeutic physical culture]. 2015. V. 92. No. 6. Pp. 59-65. (In Russian).
7. *Radko S.V., Okovityi S.V., Kulikov A.N., Chistyakova E.Yu.* Model otsenki vliyaniya farmakologicheskikh sredstv na dinamiku adaptatsii k fizicheskoy nagruzke [Model for assessing of influence of pharmacological agents on the dynamics of adaptation to physical activity]. *Biomedicine*. 2016. No. 3. Pp. 35-42. (In Russian).
8. *Rodichkin P.V., Okovityi S.V.* Farmakologicheskaya korrektsiya dejatel'nosti sistemi upravleniya dvizheniyami u sportsmenov vysokogo klassa s pomoshch'yu adaptogenov [Pharmacological correction of the activity of the motion control system in high-class athletes using adaptogens]. *Psychopharmacology and biological narcology*. 2003. V. 3. No. 1-2. Pp. 526-531. (In Russian).
9. *Ryamova K.A., Rozenfeld A.S.* Podderzhanie rabotosposobnosti i odnositel'nogo postojanstva pH sredy sredstvami substratnoj podderzhki mitohondrial'nogo apparata [Maintaining the operability and relative constancy of the pH of the medium by means of substrate support of the mitochondrial apparatus]. *Vestnik YuUrGU. Seriya «Obrazovanie, zdравоохранение, fizicheskaya kultura»* [Bulletin of the South Ural State University. Series "Education, health care, physical culture"]. 2014. V. 14. No. 4. Pp. 14-19. (In Russian).
10. *Savka V.G., Radko M.M., Vorob'ev A.A., Martsenyak I.V., Babyuk A.V.* Sportivnaya morfologiya [Sports morphology]. Chernovtsy: Knigi XXI. 2005. 196 p. (In Russian).
11. *Syrov V.N., Shakhmurova G.A.* Vliyanie fitoekdisteroïdov i bemitila na funktsionalnie, metabolicheskie i immunobiologicheskie pokazateli rabotosposobosti v eksperimente [Effect of phytoecdysteroids and bemithyl on functional, metabolic and immunobiological performance indicators in the experiment]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2008. V. 71. No. 5. Pp. 40-43. (In Russian).
12. *Tsublova E.G., Ivanova T.G., Ivanova T.N., Yasnetsov V.V.* Eksperimental'naya otsenka aktoprotektoornoj aktivnosti proizvodnih azotsoderzhashchikh geterotsiklicheskikh soedinenij

- v ekstremalnih usloviyah [Experimental evaluation of the protoprotective activity of nitrogen-containing heterocyclic compounds under extreme conditions]. *Voenno-meditsinskij jurnal* [Military Medical Journal]. 2013. No. 7. Pp. 17-19. (In Russian).
13. *Aguiar C.J., Rocha-Franco J.A., Sousa P.A., Santos A.K., Ladeira M., Rocha-Resende C., Ladeira L.O., Resende R.R., Botoni F.A., Barrouin Melo M., Lima C.X., Carballido J.M., Cunha T.M., Menezes G.B., Guatimosim S., Leite M.F.* Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Communication and Signaling*. 2014. V. 78. No. 12. Pp. 1-17.
14. *Akesson B.* Effects of analogues of ethanolamine and choline on phospholipid metabolism in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1977. V. 168. No. 3. Pp. 401-408.
15. *Danysz A., Smietanski J., Panek W.* The influence of 2-dimethylaminethanol (DMAE) on the mental and physical efficiency in man. *Act. Nerv. Super.* 1967. V. 4. No. 9. P. 417.
16. *Ferraro E., Giammarioli A.M., Chiandotto S., Spoletini I., Rosano G.* Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014. V. 21. No. 1. Pp. 154-171.
17. *Haidar N.E., Carrara M., Andriamampandry C., Kanfer J.N., Freysz L., Dreyfus H., Massarelli R.* Incorporation of [3H]ethanolamine into acetylcholine by a human cholinergic neuroblastoma clone. *Neurochem. Res.* 1994. V. 19. No. 1. Pp. 9-13.
18. *Latz A., Kornetsky C., Bain G., Goldman M.* Swimming performance of mice as affected by antidepressant drugs and baseline levels. *Psychopharmacologia*. 1966. V. 10. No. 1. Pp. 67-88.
19. *Pieralisi G., Ripari P., Vecchiet L.* Effects of a standardized ginseng extract combined with dimethylaminoethanolbitartrate, vitamins, minerals, and trace elements on physical performance during exercise. *Clin. Ther.* 1991. V. 13. No. 3. Pp. 373-382.
20. *Tonack S., Tang C., Offermanns S.* Endogenous metabolites as ligands for G protein-coupled receptors modulating risk factors for metabolic and cardiovascular disease. *Heart and Circulatory Physiology - Am. J. of Physiology*. 2012. V. 304. No. 4. Pp. 501-513.
21. *Yang L., Yu D., Fan H.H., Feng Y., Hu L., Zhang W-Y., Zhou K., Mo X-M.* Triggering the succinate receptor GPR91 enhances pressure overload-induced right ventricular hypertrophy. *Int. J. of Clinical and Experimental Pathology*. 2014. V. 9. No. 7. Pp. 5414-28.

Effect of a new aminoethanol and dicarboxylic acid derivative on physical performance in aerobic training loads

**S.V. Radko, S.V. Okovitiy, E.O. Gorshkova, M.M. Lyubishin,
Yu.D. Bolotina, I.A. Berzin**

The influence of the new aminoethanol and dicarboxylic acids derivative (FDES) on endurance, swimming speed, morphological and biochemical changes in the animals during aerobic training loads was evaluated in comparison to the synthetic adaptogen with strong actoprotective action - ethylthiobenzimidazolol hydrochloride. As a result, it was found that an increase in physical performance in the application of FDES is comparable to that in the application of ethylthiobenzimidazolol hydrochloride. Animals endurance, estimated by the number of passed pools and an increase in the total swimming time, in group, which received FDES, increased by 1.92 and 3.14 times, respectively. Changes in swimming speed were not noticed in both groups. The application of FDES during training process contributes to the development of compensatory hypertrophy of myocardium.

Key words: diethylaminoethanol derivative, physical working capacity, ethylthiobenzimidazolols.

Влияние интрадермального введения немодифицированного коллагена на пролиферативную активность клеток кожи экспериментальных животных

Б.Н. Сельская¹, Л.А. Мусина², Г.В. Иванова³, Ф.Х. Камилов¹

¹ – ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа

² – ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, Уфа

³ – ООО «Проммедэко», Уфа

Контактная информация: Сельская Бэла Натановна, selskaya-bela@yandex.ru

Иммуногистохимическим методом с использованием мышиных поликлональных антител изучена экспрессия маркеров пролиферации клеток антигена Ki-67 и фактора роста фагоцитов-1 (FGF-1) в коже самок крыс зрелого возраста (12-13 мес.) при интрадермальном введении методом мезотерапии немодифицированного бычьего коллагена типа I, в качестве аналога которого использовался отечественный препарат «Коллост® гель». Установлено, что немодифицированный коллаген стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток кожи и волосяных фолликул, фибробластов, эндотелия сосудов. Наиболее выраженная экспрессия изучаемых цитокинов наблюдается на 7-21-е сутки после инъекции коллагенового препарата.

Ключевые слова: кожа, пролиферация клеток, интрадермальное введение немодифицированного бычьего коллагена, антиген Ki-67, фактор роста фибробластов-1.

Введение

Коллагеновые препараты важны в репаративных и инволюционных процессах как естественный субстрат для адгезии, дифференцировки и роста клеток соединительной ткани. Ранее проведённые исследования показали, что интрадермальное введение препарата нереконструированного бычьего коллагена кожи экспериментальным животным вызывает в зонах инъекций стимуляцию биосинтеза основных биополимеров экстрацеллюлярного матрикса – коллагена, гиалуронана и протеогликанов [2, 3].

Цель исследования – оценить интенсивность пролиферации клеток кожи экспериментальных животных при вну-

тридермальном введении нереконструированного бычьего коллагена типа I методом мезотерапии.

Материалы и методы

Исследования проведены на 25-ти самках белых крыс зрелого (12-13 мес.) возраста массой 280-320 г. Исследования проводили с соблюдением этических норм и рекомендаций по гуманному обращению с животными (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»).

Под рауш-наркозом крысам контрольной группы интрадермально методом мезотерапии вводили стерильный изотонический р-р глюкозы, а животным опытной группы – препарат «Кол-

лост® гель» (ООО «Ниармедик плюс», Россия), содержащий 7% немодифицированный коллаген из кожи крупного рогатого скота в р-ре глюкозы из расчёта 0,06 мл на 100 г массы тела на боковые поверхности туловища (площадь 3х3 см) после предварительного удаления шерстяного покрова. На 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сут после первой инъекции препарата под лёгким эфирным наркозом животных выводили из эксперимента.

Для исследования использовали кожу в зонах введения препарата коллагена и р-ра глюкозы. Методом иммуногистохимии изучали уровни маркёров пролиферации – белок Ki-67 и фактор роста фибробластов-1 (FGF-1). Выявление Ki-67, определяющегося в ядрах пролиферирующих клеток, а FGF-1 – в цитоплазме [1], осуществляли с использованием мышиных поликлональных антител («Santa Cruz Biotechnology», США) и универсальной системы вторичной детекции для визуализации (биотиновая система детекции LECA BOND «Novocastra™», Германия). Окрашивание производили в гистостейнере для иммуногистохимии LECA BOND MAX

(«LECA», Германия). Срезы докрашивали р-ром гематоксилина. Подсчёт клеток осуществляли с помощью микроскопа LECA DM-5000 В. Окрашенные клетки считали в полях зрения при ув. х400 по каждой группе животных.

Статистическую обработку осуществляли, используя пакет программ Statistica 6.0 (Stat Soft) параметрическим методом.

Результаты и их обсуждение

У животных контрольной группы цитокин Ki-67 положительно выявлялся лишь в отдельных клетках базального слоя эпидермиса (рис. 1А). После внутридермального введения крысам препарата коллагена цитокин выявлялся во многих клетках базального слоя эпителия и фибробластических клетках в дермальной пластинке. Наибольшей эффективности пролиферация достигла на 7-е сут эксперимента (рис. 1Б).

На 21-е сут темпы пролиферативных процессов снижались. На 37-е сут после интрадермального введения препарата коллагена цитокин Ki-67 экспрессировали лишь отдельные клетки эпителиального слоя и клетки волосяных луковиц.

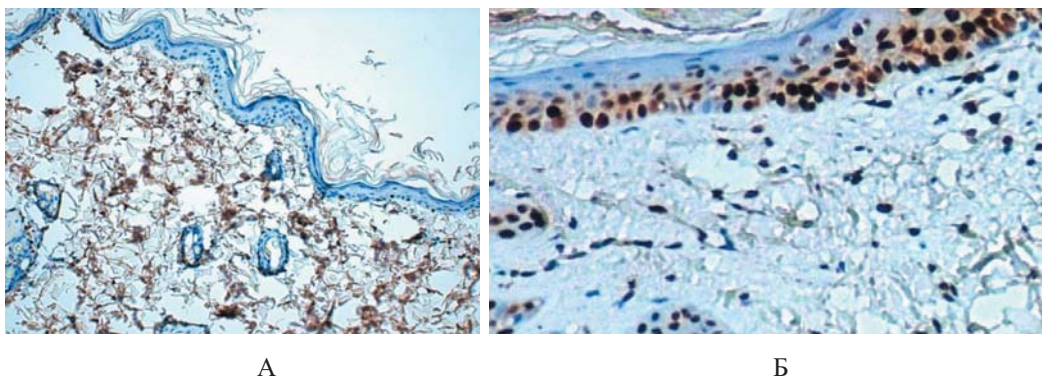


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 7-е сут: А – после введения р-ра глюкозы, ув. х100; Б – после введения препарата коллагена, ув. х400. Докраска гематоксилином.

FGF, включая несколько путей передачи сигналов, оказывает модулирующее влияние на внутриклеточные события: коммитирование клеток, их пролиферацию, дифференцировку, миграцию, апоптоз [4]. По результатам иммуногистохимической реакции на выявление FGF-1 в коже крыс контрольной группы можно прийти к заключению, что во все сроки эксперимента цитокин экспрессировался слабо в цитоплазме лишь отдельных клеток (рис. 2А). После интрадермального введения препарата коллагена усиление экспрессии FGF-1 наблюдалось начиная с 4-х сут эксперимента. Максимальная экспрессия

цитокина выявлялась на 7-е и 21-е сут. При этом он экспрессировался различными клетками: макрофагами, отдельными фибробластами, эндотелиальными клетками, перицитами. Признаки выраженной экспрессии фактора роста выявлялись и в более глубоких слоях дермальной пластинки кожи, около волосяных луковиц (рис. 2Б).

Подсчёт клеток, экспрессирующих FGF-1, показал, что во все сроки эксперимента, начиная с 4-х сут, их количество статистически значимо выше в коже в зонах введения препарата коллагена по сравнению с контрольной зоной (табл.).

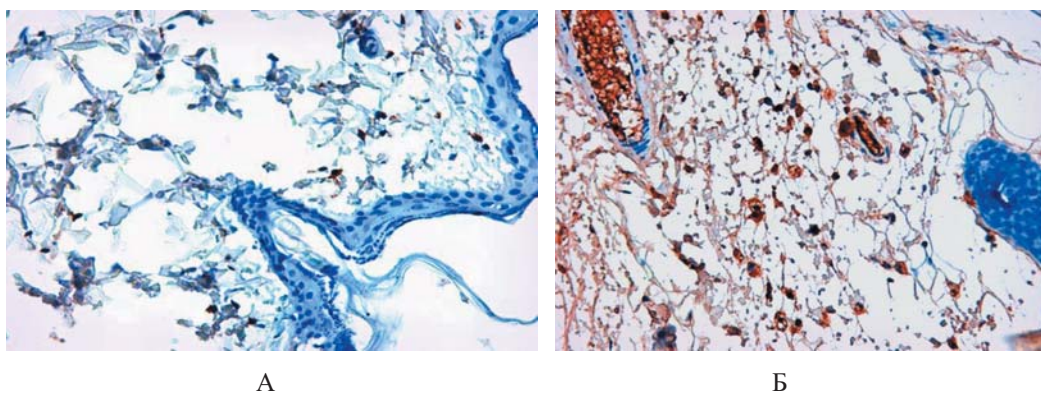


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление FGF-1 (↑) в цитоплазме клеток (коричневое окрашивание): А – на 7-е сут после введения р-ра глюкозы, ув. $\times 100$; Б – на 7-е сут после введения препарата коллагена, макрофаги, экспрессирующие фактор роста (↑). Докраска гематоксилином, ув. $\times 400$.

Таблица

Количество клеток кожи, экспрессирующих FGF-1, в зонах введения коллагенсодержащего препарата по сравнению с контрольной зоной (в поле зрения при ув. $\times 400$)

Период после введения, сут	Группа крыс		Р
	Контрольная (введение глюкозы)	Опытная (введение коллагена)	
2-е	5,50 $\pm$ 0,50	5,60 $\pm$ 0,60	>0,500
4-е	7,35 $\pm$ 0,74	15,10 $\pm$ 1,59	<0,002
7-е	6,75 $\pm$ 0,45	43,75 $\pm$ 2,38	<0,001
21-е	7,50 $\pm$ 0,64	35,85 $\pm$ 1,63	<0,001
37-е	6,55 $\pm$ 0,63	9,00 $\pm$ 0,75	<0,050

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что интрадермальное введение методом мезотерапии нереконструированного бычьего коллагена стимулирует пролиферацию клеток кожи. Однако механизмы запуска клетками собственного синтеза коллагена, неколлагиновых белков и др. компонентов межклеточного вещества для достижения основной цели – биоревитализации продуктами деградации коллагена – остаются не вполне ясными.

Выводы

Интрадермальное введение методом мезотерапии препарата нативного нереконструированного коллагена животным зрелого возраста в зонах инъекции стимулирует пролиферативные процессы эпителия, фибробластов, эпителиальных клеток волосяных фолликулов и эндотелия сосудов. Экспрессия маркеров пролиферации – белка Ki-67 и фактора роста фибробластов – наблюдается с 4-х суток после введения коллагена и максимально проявляется на 7-21-е сутки.

Список литературы

1. Иммуногистохимические методы: рук-во. Пер. с англ. / Под ред. Г.А. Франка, П.С. Малькова. – М., 2011. – 223 с.
2. **Камилов Ф.Х., Сельская Б.Н., Данилова О.В., Капулер О.М.** Метаболизм коллагена в коже экспериментальных животных при интрадермальной инъекции немодифицированного коллагена типа I // Вестник Удмуртского университета. – 2017. – Т. 27. – Вып. 3. – С. 356-361.
3. **Сельская Б.Н., Капулер О.М., Иванов В.Г., Камилов Ф.Х.** Обмен углеводов в коже в

области внутридермального введения препарата, содержащего немодифицированный коллаген типа I // Вестник Удмуртского университета. – 2017. – Т. 27. – Вып. 3. – С. 292-296.

4. **Chen L., Deny C.X.** Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases // Front. Biosci. – 2005. – No. 10. – Pp. 1961-1974.
5. **Jerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., et al.** Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential // Lancet Oncol. – 2010. – V. 11. – No. 2. – Pp. 174-183.

References

1. Immunogistokhimicheskie metody: ruk-vo. Per. s angl. [Immunohistochemical methods: guidance. Translation from English]. Ed. by G.A. Frank, P.S. Malkov. Moscow. 2011. 223 p. (In Russian).
2. **Kamilov F.Kh., Selskaya B.N., Danilova O.V., Kapuler O.M.** Metabolizm kollagena v kozhe eksperimentalnykh zhivotnykh pri intradermalnoj in'ektsii nemodifitsirovannogo kollagena tipa I [Metabolism of collagen in the skin of experimental animals with intradermal injection of unmodified type I collagen]. Vestnik Udmurtskogo universiteta [Bulletin of the Udmurt University]. 2017. V. 27. Issue 3. Pp. 356-361. (In Russian).
3. **Selskaya B.N., Kapuler O.M., Ivanov V.G., Kamilov F.Kh.** Obmen uglevodov v kozhe v oblasti vnutridermalnogo vvedeniya preparata, soderzhashchego nemodifitsirovannyj kollagen tipa I [Carbohydrate metabolism in the skin in the area of intradermal administration of a preparation containing unmodified type I collagen]. Vestnik Udmurtskogo universiteta [Bulletin of the Udmurt University]. 2017. V. 27. Issue 3. Pp. 292-296. (In Russian).
4. **Chen L., Deny C.X.** Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases. Front. Biosci. 2005. No. 10. Pp. 1961-1974.
5. **Jerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., et al.** Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. Lancet Oncol. 2010. V. 11. No. 2. Pp. 174-183.

Influence of intradermal administration of unmodified collagen on proliferative activity of skin cells of experimental animals

B.N. Selskaya, L.A. Musina, G.V. Ivanova, F.Kh. Kamilov

Immunohistochemical method using mouse polyclonal antibodies was used to study the expression of Ki-67 antigen cell proliferation markers and phagocytes-1 growth factor (FGF-1) in mature female rats (12-13 months) with intradermal mesotherapy of unmodified bovine collagen type I, as an analogue of which we used the domestic preparation "Collost® gel". It has been established that unmodified collagen stimulates the proliferation of skin epithelial cells and hair follicles, fibroblasts, and vascular endothelium. The most pronounced expression of the cytokines studied is observed on the 7-21th day after the injection of the collagen preparation.

Key words: skin, cell proliferation, intradermal administration of unmodified bovine collagen, Ki-67 antigen, fibroblast growth factor-1.

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



Филиал «Клиническая фармакология» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России работает в составе Научного центра с 2005 года. Научное руководство Филиалом осуществляет академик РАН Кукес В.Г.

Клинической базой Филиала является ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского ДЗМ» (Городская клиническая больница № 23, Медсантруд).

Основными научными направлениями деятельности Филиала являются:

- *фармакогенетическое тестирование для повышения эффективности и безопасности применения лекарственных средств у пациентов с заболеваниями внутренних органов (по CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, VKORC1, CYP4F2, GGXX):*
 - для персонализации дозирования непрямых антикоагулянтов (варфарин, аценокумарол, фениндион) у пациентов с высоким тромботическим риском;
 - для персонализации выбора целевой дозы липофильных бета-адреноблокаторов у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца;
 - для персонализации выбора антиагрегантов – блокаторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом или после стентирования коронарных сосудов;
 - для персонализации дозирования ингибиторов протонного насоса в составе схем антихеликобактерной терапии у пациентов с кислот-зависимыми заболеваниями;
 - для выявления генетической предрасположенности к развитию желудочно-кишечных кровотечений при применении НПВС.
- *поиск природных модуляторов (включая фитопрепараты и витамины) активности изоферментов цитохрома P-450 для повышения безопасности фармакотерапии препаратами-субстратами данной системы.*

Филиал «Клиническая фармакология» предлагает сотрудничество по разработке новых лекарственных препаратов, формированию регистрационного досье, клиническим исследованиям лекарственных препаратов (включая исследование биоэквивалентности на здоровых добровольцах), фармакогенетическому тестированию и консультированию пациентов в области персонализации фармакотерапии.