

2018 4

MEDICINE
ISSN 2074-5982

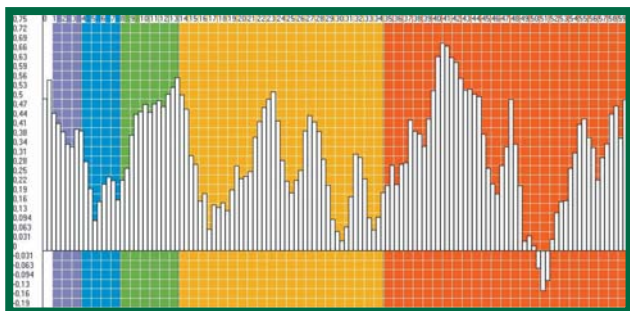
2018

4

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

Уважаемые коллеги!

Мы рады сообщить вам, что уходящий год выдался для нас весьма плодотворным. В журнале были опубликованы статьи, в которых освещены вопросы новых биомедицинских технологий, релевантного и альтернативного биомоделирования, методов биомедицинских, клинических и доклинических исследований, фармаконутриентов и спортивного питания. Большой акцент был сделан на проводимых в нашем филиале «Алтайский» работах по медико-генетическому изучению уникальных животных и растений Алтая и анализу биологически активных соединений источников сырья для новых лекарств и биоактивных субстанций.



В будущем году мы планируем изменить дизайн журнала при сохранении его основной тематики. Предполагаем также уделять особое внимание статьям на английском языке с абстрактом на русском языке. Публикации статей остаются бесплатными для всех, все авторы будут безвозмездно получать экземпляр журнала со своей статьёй. Однако реалии нашего времени таковы, что предпочтения при приёме статей будут иметь подписчики журнала. Подписной индекс в общероссийском каталоге «Роспечать. Издания органов НТИ» – 57995.

Мы надеемся на дальнейшее плодотворное сотрудничество и благодарны всем авторам, приславшим статьи в наш журнал. Приглашаем всех на нашу ежегодную научно-практическую конференцию «Биомедицина и биомоделирование», которая традиционно планируется на конец мая 2019 года.

Желаем всем крепкого здоровья, новых ярких статей, удачи и успехов в научной работе.

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



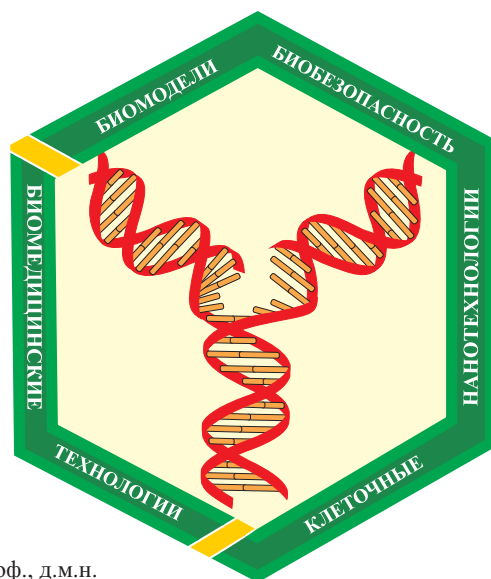
Научный журнал.

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 10.12.2018
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 БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, В.Н. Каркищенко, Л.А. Табаякова, С.Ю. Харитонов, О.В. Алимкина

Новые подходы к оценке интрацентральных отношений по показателям оперантного поведения и электрограмм мозга кошек 4

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

В.Н. Каркищенко, Р.А. Клёсов, О.И. Степанова, О.В. Баранова

Новые биомодели метаболического синдрома 18

С.В. Оковитый, Е.Б. Шустов, М.А. Белых, Н.В. Кириллова, О.М. Спасенкова, А.Г. Иванов, А.В. Караваева, А.В. Ткачева

Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных 29

В.Н. Байматов, Н.С. Тропская, Е.А. Кислякова, И.Г. Вилкова, О.С. Кислицына, Т.С. Попова

Влияние высокожирового рациона питания на морфофункциональное состояние печени крыс 44

Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, М.В. Лукина, Т.Б. Андрущишина, М.А. Чукина, И.Л. Царев, О.А. Варганова, Т.Е. Морозова

Математическое моделирование параметров фармакокинетики ванкомицина: возможности и сравнение с результатами терапевтического лекарственного мониторинга 51

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина, А.А. Николаев

Вариабельность сердечного ритма у пациентов с вегетососудистой дистонией головного мозга 63

Т.А. Ишунина, А.В. Шевченко, П.В. Калущкий, О.А. Медведева

Методика окрашивания и дифференцировки микроорганизмов с использованием красителя на растительной основе 72

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В.А. Пугач, М.А. Тюнин, Е.А. Тарасов, А.С. Гоголевский, Е.И. Строкина

Экспериментальная оценка риска геморрагических осложнений после парентерального введения прямых антикоагулянтных препаратов – дабигатрана этексилата и ривароксабана 79

ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

А.Н. Белявцев, Л.И. Николаева, Н.С. Шастина, В.В. Куприянов

Иммуногенные липопептиды 88

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, V.N. Karkischenko, L.A. Taboyakova, S.Yu. Kharitonov, O.V. Alimkina**
New approaches to the assessment of intracentral relations in terms of operant behavior and electrograms of the brain of cats..... 4

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- V.N. Karkischenko, R.A. Klesov, O.I. Stepanova, O.V. Baranova**
New biomodels of metabolic syndrome 18

- S.V. Okovitiy, E.B. Shustov, M.A. Belyh, N.V. Kirillova, O.M. Spasenkova, A.G. Ivanov, A.V. Karavaeva, A.V. Tkacheva**
Modeling of non-alcoholic liver steatosis: features of metabolic changes in the body of laboratory animals 29

- V.N. Baymatov, N.S. Tropkaya, E.A. Kislyakova, I.G. Vilkova, O.S. Kislitsyna, T.S. Popova**
The effect of high fat diets on the morphofunctional state of the liver of rats..... 44

- G.V. Ramenskaya, I.E. Shokhin, M.V. Lukina, T.B. Andrushchyshina, M.A. Chukina, I.L. Tsarev, O.A. Vartanova, T.E. Morozova**
Mathematical modeling of vancomycin pharmacokinetics parameters: opportunities and comparison with the results of therapeutic drug monitoring 51

BIOMEDICAL METHODS

- N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina, A.A. Nikolaev**
Variability of heart rate in patients with vegetal vascular dystonia of brain..... 63

- T.A. Ishunina, A.V. Shevchenko, P.V. Kalutskii, O.A. Medvedev**
The method of staining and differentiation of microorganisms using the plant-based dye 72

NON-CLINICAL RESEARCHES

- V.A. Pugach, M.A. Tyunin, E.A. Tarasov, A.S. Gogolevskiy, E.I. Strokina**
Experimental assessment of the risk of hemorrhagic complications following parenteral administration of direct anticoagulants: dabigatran etexilate and rivaroxaban 79

INFORMATION MATERIALS

- A.N. Belyavtsev, L.I. Nikolaeva, N.S. Shastina, V.V. Koupriyanov**
Immunogenic lipopeptides 88



Новые подходы к оценке интрацентральных отношений по показателям оперантного поведения и электрограмм мозга кошек

Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, В.Н. Каркищенко, Л.А. Табоякова,
С.Ю. Харитонов, О.В. Алимкина

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

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, fokin@scbmt.ru

Недостаточная информативность результатов стандартной энцефалографии побуждает создавать новые подходы к детекции и анализу биоэлектрической активности мозга по параметрам электрограмм (ЭГ).

На основе концепции нормирования результатов, полученных после воздействия, на результаты фоновых измерений, с помощью математических методов анализа, разработан микромодуль, включающий в себя усилитель биопотенциалов, микросхемы, контролирующие работу электронных устройств, и оригинальное программное обеспечение.

С помощью хронически имплантированных в заданные участки мозга электродных конструкций и микромодуля проанализированы ЭГ важнейших отделов головного мозга. Получены результаты, отражающие преимущественное повышение частотно-спектральных характеристик ЭГ при применении новых нейропсихоактивных средств с депримирующим действием в хвостатом ядре и поясной извилине, снижение спектральной мощности на всём диапазоне частот в коре больших полушарий, полифазные изменения мощности частот в заднем ядре гипоталамуса с элементами возрастания и снижения мощности анализируемых частотных диапазонов.

На фоне применения указанных средств изменяются пороговые величины чувствительности мозга к электрораздражению, при этом диапазон их преобразований значительно шире, чем в фоновых измерениях. Разные животные и препараты характеризуются в целом близкими оперантными поведенческими реакциями, что позволяет оценивать наблюдаемые тенденции, отражающие эффекты применяемых средств. Показано, что хвостатое ядро мозга формирует и контролирует возбуждающие реакции, а кора, заднее ядро гипоталамуса и конечный мозг – тормозные процессы.

Таким образом, при вызванной электростимуляции участков головного мозга и применении фармакологических нейропсихоактивных средств с депримирующим действием наблюдаются варьирования пороговых величин чувствительности и соответствующие поведенческие реакции, характеризующие изменения интрацентральных отношений мозга животных. Данные изменения коррелируют с электрограммами мозга, что повышает адекватность и надежность результатов исследований интрацентральных отношений.

Ключевые слова: интрацентральные отношения, нейропсихоактивные средства, оперантное поведение, биоэлектрическая активность мозга, кошки.

Введение

Изменения интрацентральных отношений, вызванные в т.ч. с помощью фармакологической коррекции ней-

ропсихоактивными средствами, могут быть визуализированы при использовании методов вторичной обработки выбранных информативных параметров,

включающих усреднение спектров и вычисление корреляционных взаимосвязей с последующим их факторным отображением. Такая многоэтапная обработка позволяет не только исследовать сложно детектируемые изменения электрограмм мозга, но и прогнозировать психоактивные свойства биологически активных соединений и их комбинаций [7]. В качестве исходных параметров для такой обработки можно брать не только мгновенные значения электрограммы (ЭГ), но и ее структурные характеристики – в частности, параметр Рила (Riehl J., 1966). Метод Рила заключается в измерении показателя, равного отношению частоты ЭГ к ее амплитуде, и вычислении интегральных значений этого параметра за 10-секундные временные интервалы. Сопоставление метода Рила с другими методами дало экспериментальное подтверждение большой информативности этого показателя [4]; его высокая чувствительность к минимальным сдвигам уровня бодрствования ценна в исследованиях фармакологических средств.

Некоторые исследования в данной области свидетельствуют об информативности усредненных параметров ЭГ мозга. Эти параметры, отражая особенности текущего функционального состояния мозга, оказываются определенным образом связанными с такими сложными характеристиками деятельности ЦНС, как запоминание и воспроизведение следов памяти, решение задач информационного поиска и распознавания зрительных образов [3, 6, 10, 11].

Оценка взаимосвязи биоэлектрических процессов различных структур мозга, получаемая не для мгновенных значений ЭГ, а для более общих элемен-

тов колебательного процесса, может являться еще более информативной.

Другим, не менее информативным, методом, позволяющим проводить прямое количественное измерение возбудимости структур мозга, является электрическая стимуляция его областей и конкретных отделов [7].

Показано, что электрическое раздражение различных областей лимбической системы вызывает изменения вегетативных функций (артериального давления, дыхания, движений пищеварительного тракта, тонуса матки и мочевого пузыря), на основании чего в коре мозга были выделены двигательные (моторные), чувствительные (сенсорные) и немые (ассоциативные) зоны.

Стимуляция ядер гипоталамуса приводит к формированию целенаправленного поведения – пищевого, полового, агрессивного и т.д. При возбуждении гипоталамических структур нервный компонент сложных реакций обязательно дополняется гормональным. Электростимуляция задних ядер гипоталамуса сопровождается эффектами, аналогичными раздражению симпатической нервной системы: расширением зрачков и глазной щели, возрастанием частоты сердечных сокращений, повышением давления, торможением моторной активности желудка и кишечника, возрастанием концентрации в крови адреналина.

Раздражение ретикулярной формации, не вызывая двигательного эффекта, изменяет имеющуюся деятельность, тормозя ее или усиливая. Торможение возникает при раздражении задних отделов ствола мозга, а усиление рефлексов – при раздражении передних отделов. Соответствующие зоны рети-

кулярной формации получили название тормозящей и активирующей зон [8].

Помимо изложенного, информативным биоэлектрическим показателем мозговой деятельности также являются сверхмедленные колебания электрического потенциала (СМКП) мозга, занимающие область частот между суточными ритмами и ритмами ЭГ.

Основные закономерности динамики СМКП были установлены с помощью электродов, вживленных в мозг животного. Была выявлена связь СМКП с высшей нервной деятельностью животных, с активностью гипоталамуса и миндалевидного образования; при помощи статистических методов была доказана связь между СМКП и ЭГ мозга, между ними же и импульсной активностью нейронов [1].

Анализ этих и других данных позволил сформулировать гипотезу о влиянии СМКП на более быстрые формы активности, проявляющиеся в ЭГ, и об особой роли СМКП в процессах регуляции функционального состояния мозговых структур. Некоторые закономерности в изменениях параметров СМКП близки к закономерностям изменения ЭГ мозга, однако особенностью СМКП является их выраженная межполушарная асимметрия. В разных областях конвексительной поверхности головы в один и тот же момент могут проявляться неодинаковые по частоте и амплитуде СМКП. Эта динамика меняется в зависимости от психической активности, причем характер распределения не является стабильным, он изменчив даже при повторном предъявлении одной и той же психологической нагрузки. СМКП отражают, по-видимому, еще мало нам известные глобальные процессы, объединяющие

активность нервных элементов в более крупную динамическую организацию, чем та, которая отражается в ЭГ мозга.

Целью работы явился анализ информативных параметров (маркеров) с помощью различных методов исследования биоэлектрической активности мозга, отражающих изменения интрацентральных отношений головного мозга крупных лабораторных животных (кошек).

Материалы и методы

Объектами исследований явились взрослые кошки обоего пола в возрасте более 3 лет, не имеющие признаков чистопородности, массой тела 4-6 кг.

Содержание и кормление. Кошки содержатся в индивидуальных клетках-вольерах из нержавеющей стали, согласно зоотехническим нормам. Места содержания поддерживаются в чистом и сухом состоянии.

В кормлении животных используется сухой гранулированный корм (Pronature Eureka Mix, Канада), по нормативам с учетом половозрастных характеристик. В качестве подкормки используются консервированные и натуральные корма. Водопроводная очищенная вода всем животным дается *ad libitum* в стандартных поилках.

Кормушки, поилки и туалеты изготовлены из безопасного для здоровья животных материала. Животные содержатся в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 50-60%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное (ритм «день-ночь»), достаточное количество дневного света – 300-450 люкс. Поме-

щения оборудованы системой приточной вентиляции воздуха. Место для сна, еды и туалета пространственно отделены друг от друга, клетки-вольеры имеют трехмерную структуру.

Емкости для корма и питья, а также кошачьи туалеты подвергаются ежедневной мойке и чистке с помощью сертифицированных чистящих и дезинфицирующих средств. Кошкам проведены процедуры дегельминтизации, все стерилизованы, имеют прививки против инфекционных заболеваний (ринотрахеит, чумка, бешенство).

Карантин. До начала исследований животные выдерживаются в отдельной карантинной зоне в течение 14 дней, проходят ежедневный осмотр (поведение и общее состояние).

Надлежащим образом регистрируются половозрастные и породные признаки, животным присваивается индивидуальный номер.

Обращение с животными в эксперименте регламентируется требованиями приказа Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Эксперименты на животных проводятся в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Исследования выполняются согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными проце-

дурами исследователя, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [9]. Протоколы экспериментов разрабатываются при участии и одобрении биоэтической комиссии ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Вживление электродов. В головной мозг животных операционным путем хронически имплантированы разработанные электродные конструкции для оценки интрацентральных отношений мозга. В работе использовалась заранее изготовленная конструкция для одномоментного вживления в мозг нескольких электродов, проводники присоединялись к разъему на специальном макете (фантоме), имитирующем дорсальную поверхность черепной коробки. На матрице и фантоме прорисовывались ориентиры – сагиттальный и коронарный шов (точка пересечения – брегма). На матрицу наносились точки внедрения электродов, рассчитанные по стереотаксическому атласу. Конструкция состояла из собственно электрода, который погружался в исследуемую область мозга, провода, который припаивался одним концом к электроду, а другим – к разъему марки IDC-16-2. Электроды, погружаемые в мозг, изготавливались из нихромовой проволоки и тщательно изолировались полиуретановым лаком УЛ-1 или другими лаками. Вживление электродов осуществлялось по общим правилам операционной техники, в асептических условиях, под общим наркозом. Подробно процесс изготовления конструкций и их вживления описан в ранее опубликованной работе

[8]. Изготовленная электродная конструкция и животное с имплантированными в головной мозг электродами представлены на рис. 1.

Для *регистрации и анализа биоэлектрической активности* мозга животных с целью исследования интрацентральных отношений головного мозга разработан и апробирован макет технического устройства (микромодуль), базирующегося на современных научных взглядах и технологиях (рис. 2). Он состоит из двух частей: физический электроэнцефалограф и

аппаратно-программный комплекс с математическим анализом выходных данных, поступающих на компьютер.

Справа на мониторе – нормализованные по фону частотно-спектральные характеристики ЭГ в режиме онлайн-детекции по каждой анализируемой зоне мозга: красный цвет указывает на повышение экспериментальных значений отдельных компонентов ЭГ по сравнению с фоновыми данными, зелёный цвет – на снижение. Остальные обозначения указаны на рисунке.



А



Б

Рис. 1. Готовая к установке электродная конструкция (А) и кошка с имплантированными в головной мозг электродами для исследований интрацентральных отношений (Б).



Рис. 2. Микромодуль для исследования интрацентральных отношений головного мозга.

Микромодуль включает в себя микроконтроллер (МК, микросхема, предназначенная для управления электронными устройствами), к которому подключены два аналоговых мультиплексора и дифференциальный аналогово-цифровой преобразователь (АЦП). Разрешение АЦП – 12 бит. Микроконтроллер после получения запрограммированных сигналов через UART-интерфейс от компьютера переключает мультиплексоры в соответствии с переданными ему данными, т.е. настраивает входы для АЦП, который затем начинает считывать заданное количество значений и по завершению отправляет их на компьютер. На выходе записываются параметры ЭГ – частота (Гц) и спектральная плотность мощности (СПМ) импульсов (%), отражающих биоэлектрическую активность мозга.

Подходы к анализу ЭГ мозга. Энцефалография, наряду с оценкой как нестационарный, стохастический и нелинейный процесс, может быть рассмотрен как одно из ключевых понятий математики *множества* непрерывных функций. В равной степени это относится и к ЭГ каждой нейрональной констелляции.

Множество – это всеобъемлющее понятие окружающего мира, а не только математики, которое воспринимается как единое целое совокупности элементов или объектов с едиными признаками, критериями или обстоятельствами. Этими признаками могут быть цифры, графы, теоремы, эмоции, мысли, концепции и т.д. Геометрическая интерпретация легко представляется числовой прямой.

Схематическое изображение действий с множествами можно представить кругами Эйлера или, точнее, диаграммами

Венна. В этом ключе используем операции *пересечения*, *объединения*, *разности* множеств, а также Декартовы (прямые) произведения множеств и их зеркально Декартовы произведения.

Наряду с этим мы можем прибегнуть к отображению множеств с определенной функцией. Размер множества, т.е. количество его элементов, определяют *мощность* множества.

Мы прибегли к понятию множества для анализа и интерпретации результатов нашей новой концепции, поскольку широта и всеобъемлющесть *теории множеств* тесно вовлечена во все смежные разделы математики и математической логики.

Если взять ЭГ нативно действующего мозга как множество А, то любой другой фрагмент, полученный под влиянием фармакологических, физических, биологических или химических факторов, можно рассматривать как подмножество В...С...D и т.д.

Мы априорно принимаем, что при действии любого фармакологического фактора картина ЭГ «обедняется» относительно всего диапазона ЭГ, но может «обогащаться» в отдельных своих элементах. Математически множества определяются элементами. Множества из трех элементов а, b, с допускают шесть видов записи, но для удобства допускают «пустое» множество, т.е. не содержащее ни одного элемента.

Собственным подмножеством определяют хотя бы один элемент, входящий в множество А, но не входящий в множество В. *Собственное подмножество* или *надмножество* и представляет реперную точку, определяющую отличие фоновых ЭГ от ЭГ при действии веществ. На самом деле эти элементы собственного подмножества и составля-

ют суть различий действия на ЭГ нейрорепсихотропных средств.

Инструментальный анализ нормализации ЭГ мозга. Технически мы использовали модифицированную процедуру быстрого преобразования Фурье (БПФ). Частота дискретизации при измерениях выбирается согласно следствию, вытекающему из теоремы Котельникова [2, 5]: любой аналоговый сигнал может быть восстановлен с какой угодно точностью по своим дискретным отсчётам, взятым с частотой $f > 2f_c$, где f_c – максимальная частота, которая ограничена спектром реального сигнала. Таким образом, для анализа 64 Гц она составляет 128 измерений в секунду, для 128 Гц – 256.

После получения данных от МК они раскладываются в спектр с использованием БПФ.

При нормализации всех БПФ-преобразований данного замера высчитывается среднее арифметическое значение.

Нормализация осуществляется по следующей формуле:

$$\text{Результат} = \left(\frac{\left(\frac{\text{БПФ}_{\text{Фона}}}{\text{БПФ}_{\text{Измерения}}} \right) - 0,5}{\pi * 0,5} \right) * 2$$

В результате мы получаем угол от 0 до 90 градусов (от -1 до 1 соответственно) между исходным (фоновым) значением (откладывается по оси абсцисс) и экспериментальным значением (откладывается по оси ординат). Данный угол позволяет анализировать степень изменения сигнала. Для анализа используется функция арктангенса (рис. 3).

Программа анализа записанных данных разделена на три блока: блок связи с МК; блок анализа и хранения данных; блок графического интерфейса.

В режиме онлайн-детекции на монитор компьютера выводится поле, на ко-

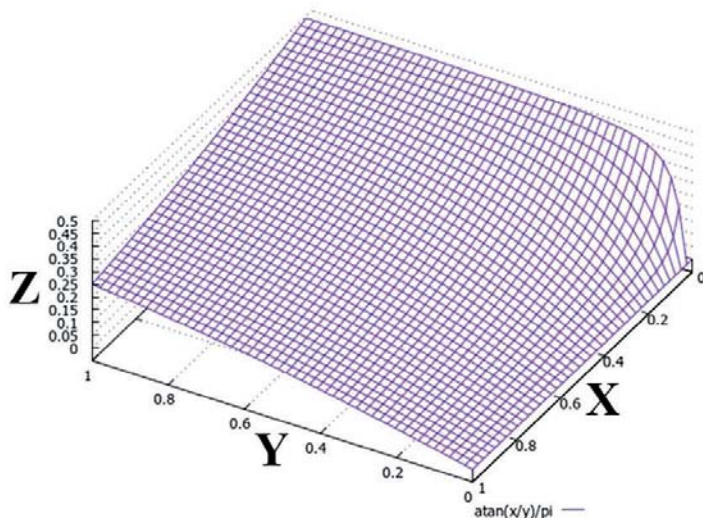


Рис. 3. График функции $z = \text{arctg}(y/x) / \pi$ в диапазоне $0 \leq (x,y) \leq 1$.

По оси X – значение фонового измерения, по оси Y – экспериментальное значение, по оси Z – угол между данными точками.

тором представлены все исследуемые области мозга тестируемого животного. В каждой области в цветовом режиме отражается изменение параметров ЭГ мозга по сравнению с фоновым измерением. После завершения процесса записи ЭГ по команде оператора выводится график в виде кривой, на котором по оси абсцисс отложена частота, а по оси ординат – СПМ импульсов. Для удобства восприятия частотные диапазоны (дельта- (0-3 Гц); тета- (4-7 Гц); альфа- (8-13 Гц); бета- (14-34 Гц); гамма- (35-60 Гц)) выделены контрастными цветами – фиолетовым, синим, зеленым, желтым и красным, соответственно. Расположение графика в области от 0 до 1 отражает повышение частотно-спектральных характеристик ЭГ по сравнению с фоновыми данными, от 0 до -1 – снижение.

Электростимуляция заданных отделов головного мозга проводится с помощью генератора электрических импульсов «Hantek-HDG2002B» и разработанного в НЦБМТ ФМБА России программного обеспечения.

По достижению пороговых величин мощности подаваемого напряжения визуально определяются характерные для раздражаемой области мозга **оперантные поведенческие реакции (отклики)**. Оперантное обусловливание – особый путь образования условных рефлексов, который заключается в подкреплении спонтанно возникающей у субъекта реакции, а не стимула, т.е. за счет последствий: подкрепления (усиления) или наказания (ослабления). Особым случаем оперантного обусловливания является формирование поведения, когда подкрепляемые действия постепенно изменяются, все более приближаясь к итоговому исполнению.

Результаты и их обсуждение

Посредством электрораздражения заданных отделов головного мозга кошек с имплантированными электродами и регистрации поведенческих проявлений, характерных для данных областей, определены информативные параметры, свидетельствующие об изменении интрацентральных отношений головного мозга (таблица).

Таблица

Пороговые величины (в вольтах) чувствительности раздражения отделов головного мозга (фоновые показатели и после применения нейрпсихоактивных средств с разной избирательностью депримирующего действия) и характерные поведенческие реакции

Отдел мозга	Фон (В)			Нейрпсихоактивные средства (В)			Поведенческая реакция
	кошка 1	кошка 2	кошка 3	кошка 1	кошка 2	кошка 3	
CD	6,8	7,0	7,2	4,2	5,0	5,6	моргание, беспокойство
кора	5,8	5,8	6,0	6,2	6,8	7,2	облизывание
NHP	3,2	3,2	3,4	3,6	3,8	3,8	расширение зрачков, втягивание подбородка
GC	4,0	4,2	4,4	4,6	5,4	6,4	отведение головы назад и вбок

Примечания: CD – *nucleus caudatus* – хвостатое ядро, кора – кора больших полушарий мозга, NHP – *nucleus hyphothalamicus posterior* – заднее ядро гипоталамуса, GC – *gyrus cinguli* – поясная извилина конечного мозга.

Пороговые величины, определяющие чувствительность к электростимуляции, в фоновых измерениях (состоянии спокойного бодрствования) имеют характерные для конкретного отдела мозга параметры и отличаются небольшой вариабельностью, в пределах 0,5 В. На фоне применения нейрорпсихоактивных средств с разной избирательностью депримирующего действия пороговые величины чувствительности изменяются (увеличиваются или снижаются), при этом диапазон их преобразований значительно шире, чем в фоновых измерениях. Разные животные и препараты характеризуются в целом близкими поведенческими реакциями, что позволяет оценивать наблюдаемые тенденции, отражающие эффекты применяемых средств. При этом хвостатое ядро мозга формирует и контролирует возбуж-

дающие реакции, а кора, заднее ядро гипоталамуса и конечный мозг – тормозные процессы.

На рис. 4-7 отражены параметры ЭЭГ, характеризующие биоэлектрическую активность исследуемых отделов мозга на фоне воздействия нейрорпсихоактивных свойств с депримирующим действием.

Из рис. 4 следует, что на фоне применения тестируемого средства в хвостатом ядре головного мозга наблюдается преимущественное повышение СПМ на всём диапазоне частот (коэффициент – до 0,7), с незначительным снижением на частоте около 50-51 Гц.

Анализ рис. 5 показывает, что на фоне применения тестируемого средства в коре больших полушарий головного мозга наблюдается абсолютное снижение СПМ на всём диапазоне частот (коэффициент – до 0,9).

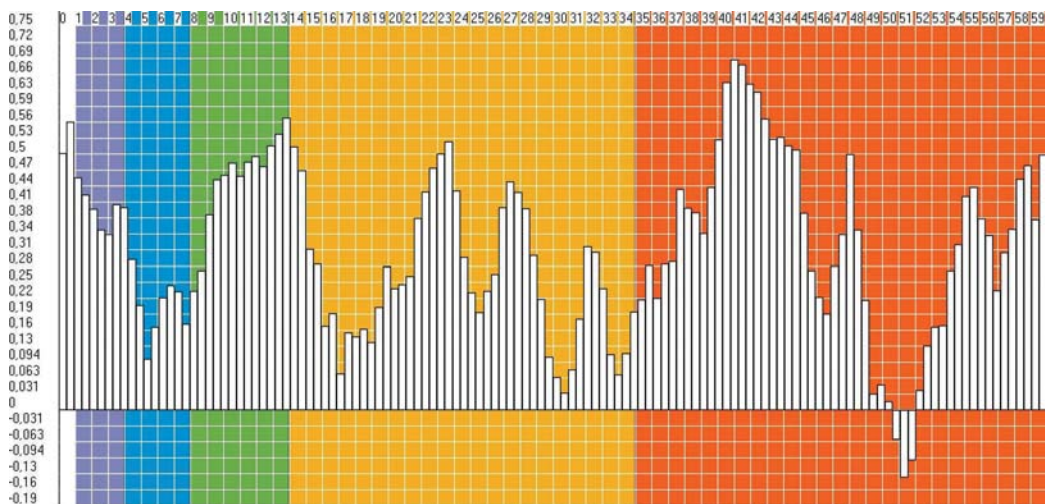


Рис. 4. Параметры ЭЭГ в отделе CD головного мозга при действии нового нейрорпсихоактивного средства с депримирующим действием (ННСДД).

По оси абсцисс – частота (Гц), по оси ординат – коэффициент спектральной плотности мощности (СПМ).

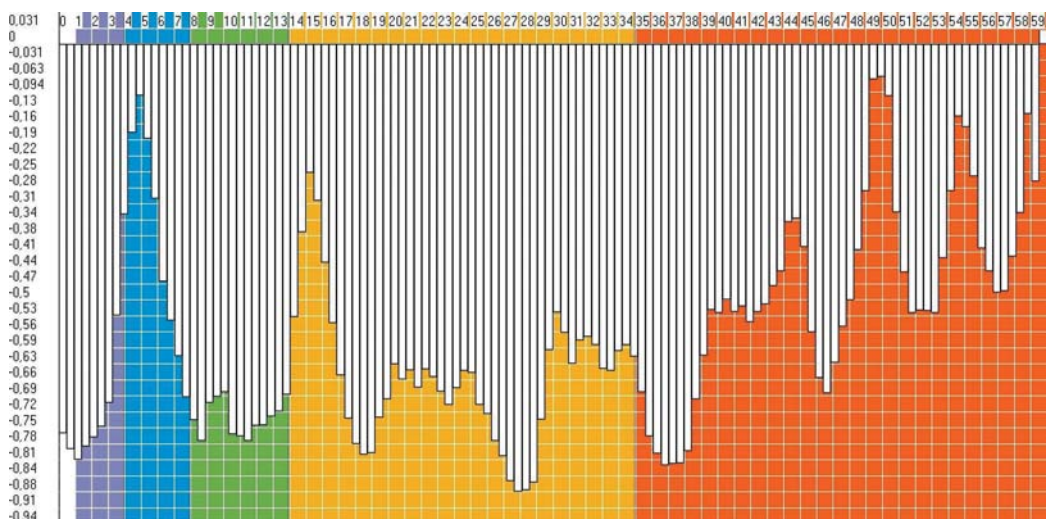


Рис. 5. Параметры ЭЭГ в коре головного мозга при действии ННСДД. Все обозначения – как на рис. 4.

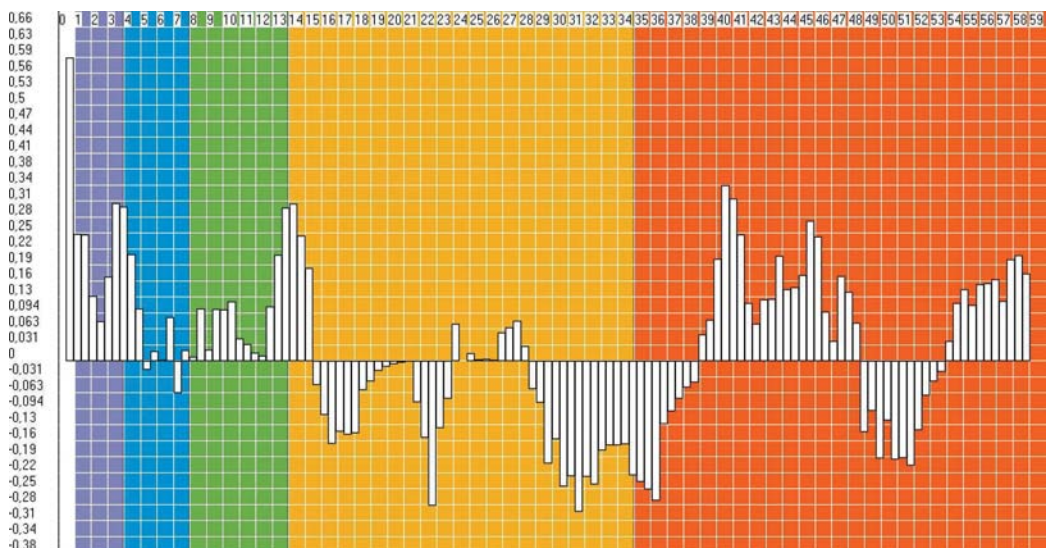


Рис. 6. Параметры ЭЭГ в отделе NHR головного мозга при действии ННСДД. Все обозначения – как на рис. 4.

Согласно рис. 6, применение тестируемого средства характеризуется полифазными изменениями мощности частот в заднем ядре гипоталамуса: преимущественное повышение СПМ в дельта-, тета- и альфа-диапазонах, снижение –

в бета-диапазоне, разнонаправленное действие в высоком гамма-диапазоне (коэффициент изменений – около 0,3).

По данным, представленным на рис. 7, на фоне применения тестируемого средства в поясной извилине

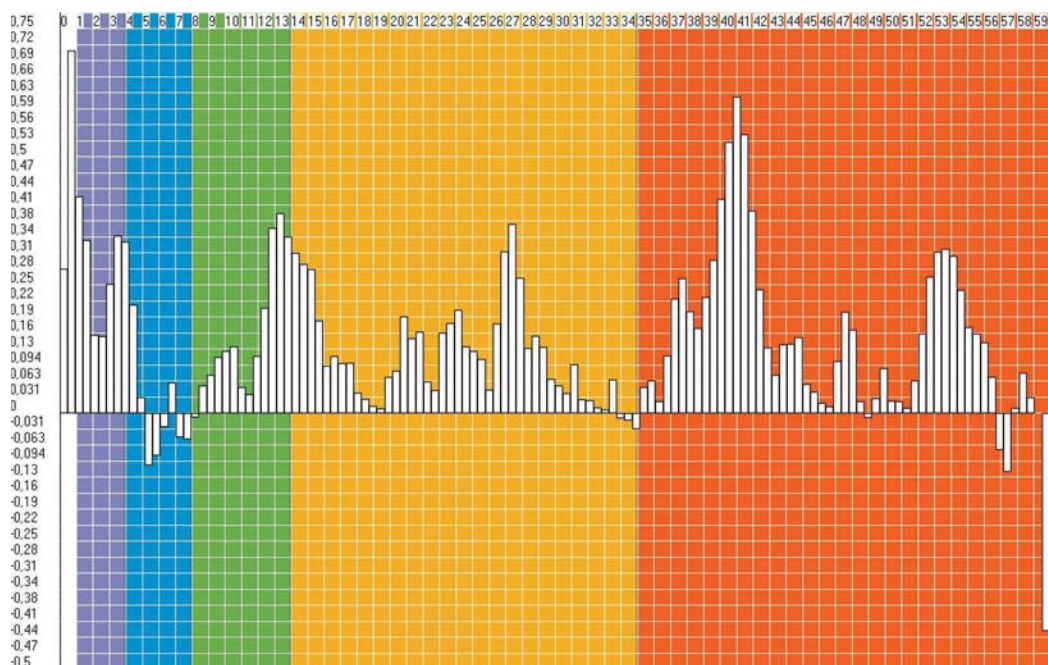


Рис. 7. Параметры ЭЭГ в отделе GC головного мозга при действии ННСДД. Все обозначения – как на рис. 4.

конечного мозга наблюдается преимущественное повышение СПМ на всём диапазоне частот (коэффициент – до 0,6), с эпизодическими снижениями – в основном, в тета-ритме и на частотах около 56 и 60 Гц.

Полученные результаты позволяют заключить, что изменения параметров ЭГ мозга, наблюдаемые при воздействии в т.ч. нейрпсихоактивных средств, информативно и убедительно отражают активность анализируемых участков мозга и являются маркерами преобразований интрацентральных отношений головного мозга животных.

Заключение

В силу того, что стандартный метод энцефалографии обладает значительными недостатками, а его результаты малоинформативны для адекватной оценки

интрацентральных отношений головного мозга, нами выбран новый подход к детекции и анализу биоэлектрической активности мозга по параметрам электрограмм.

Данный подход основан на концепции нормирования результатов, полученных после воздействия, на результаты фоновых измерений, с помощью математических методов анализа, в т.ч. быстрого преобразования Фурье [7]. Для верификации данного подхода разработан микромодуль, включающий в себя усилитель биопотенциалов, микросхемы, контролирующие работу электронных устройств, и соответствующее программное обеспечение.

С помощью микромодуля проанализированы ЭГ важнейших отделов головного мозга: хвостатого ядра, коры, гипоталамуса, прореальной извилины,

гиппокампа, ретикулярной формации, эпифиза, поясной извилины конечного мозга. Получены результаты, отражающие преимущественное повышение частотно-спектральных характеристик ЭГ при применении новых нейрпсихоактивных средств с депримирующим действием в хвостатом ядре и поясной извилине, снижение спектральной мощности на всём диапазоне частот в коре больших полушарий, полифазные изменения мощности частот в заднем ядре гипоталамуса с элементами возрастания и снижения мощности анализируемых частотных диапазонов.

На фоне применения нейрпсихоактивных средств с разной избирательностью депримирующего действия изменяются пороговые величины чувствительности мозга к электрораздражению, при этом диапазон их преобразований значительно шире, чем в фоновых измерениях. Разные животные и препараты характеризуются в целом близкими оперантными поведенческими реакциями, что позволяет оценивать наблюдаемые тенденции, отражающие эффекты применяемых средств. Показано, что хвостатое ядро мозга формирует и контролирует возбуждающие реакции, а кора, заднее ядро гипоталамуса и конечный мозг – тормозные процессы.

Таким образом, при локальной электрической стимуляции участков головного мозга и применении фармакологических нейрпсихоактивных средств с депримирующим действием наблюдаются варьирования пороговых величин чувствительности и соответствующие поведенческие реакции, характеризующие изменения интрацентральных отношений мозга животных. Данные изменения коррелируют с электрограм-

мами мозга, что повышает адекватность и надежность результатов исследований интрацентральных отношений.

Список литературы

1. *Аладжалова Н.А., Саксон М.Е., Потылицын Г.П.* Статистическая связь между импульсной активностью нейронов и сверхмедленными ритмическими колебаниями потенциалов в коре головного мозга кошки // Журнал высшей нервной деятельности. – 1969. – Т. 19. – № 6. – С. 1003-08.
2. *Беллами Д.К.* Цифровая телефония. – М.: Радио и связь, 1986.
3. *Бурбаки Н.* Очерки по истории математики. – М.: Мир, 1963.
4. *Генкин А.А., Медведев В.И.* Прогнозирование психофизиологических состояний // Вопросы методологии и алгоритмизации. – Л.: Наука, Ленинградское отделение, 1973. – 144 с.
5. *Гитлиц М.В., Лев А.Ю.* Теоретические основы многоканальной связи. – М.: Радио и связь, 1985.
6. История математики с древнейших времен до начала XIX столетия / Под ред. А.Н. Колмогорова и А.П. Юшкевича. Т. 1. – М.: Наука, 1970.
7. *Каркищенко Н.Н.* Фармакология системной деятельности мозга. – Ростов: Ростиздат, 1975, 152с.
8. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Таболякова Л.А., Мокроусов М.И., Алимкина О.В.* Конвергентная валидация интрацентральных отношений головного мозга животных // Биомедицина. – 2017. – № 3. – С. 16-39.
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.
10. *Русалов В.М., Бодунов М.В.* О факторной структуре интегральных электроэнцефалографических параметров человека // В кн.: Психофизиологические исследования интеллектуальной саморегуляции и активности. – М.: Наука, 1980. – С. 94-113.
11. *Хризман Т.П., Зайцева Л.М.* К вопросу о центральных механизмах зрительного опознания образов у детей (по данным ЭЭГ) // Физиология человека. – 1977. – Т. 3. – № 1. – С. 22-27.

References

1. *Aladzhhalova N.A., Sakson M.E., Potylicyn G.P.* Statisticheskaya svyaz' mezhdru impul'snoj aktivnost'yu neyronov i sverhmedlennymi ritmicheskimi kolebaniyami potencialov v kore golovnogo mozga koshki [Statistical connection between the impulse activity of neurons and superslow rhythmic fluctuations of potentials in the cat's cerebral cortex]. Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti [J. of Higher Nervous Activity]. 1969. V. 19. No. 6. Pp. 1003-08. (In Russian).
2. *Bellami D.K.* Cifrovaya telefoniya [Digital telephony]. Moscow: Radio i svyaz', 1986. (In Russian).
3. *Burbaki N.* Ocherki po istorii matematiki [Essays on the history of mathematics]. Moscow: Mir, 1963. (In Russian).
4. *Genkin A.A., Medvedev V.I.* Prognozirovanie psihofiziologicheskikh sostoyanij [Prediction of psycho-physiological states]. Voprosy metodologii i algoritimizacii [Questions of methodology and algorithmization]. Leningrad: Nauka, Leningradskoe otdelenie, 1973. 144 p. (In Russian).
5. *Gitlic M.V., Lev A.Yu.* Teoreticheskie osnovy mnogokanal'noj svyazi [Theoretical foundations of multi-channel communication]. Moscow: Radio i svyaz', 1985. (In Russian).
6. Istoriya matematiki s drevnejshih vremen do nachala XIX stoletiya [The history of mathematics from ancient times to the beginning of the XIX century]. Ed. by A.N. Kolmogorov and A.P. Yushkevich. V. 1. Moscow: Nauka, 1970. (In Russian).
7. *Karkischenko N.N.* Farmakologiya sistemnoj deyatel'nosti mozga [Pharmacology of systemic activity of the brain]. Rostov: Rostizdat, 1975, 152 p. (In Russian).
8. *Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Mokrousov M.I., Alimkina O.V.* Konvergentnaya validaciya intracentral'nyh otnoshenij golovnogo mozga zhivotnyh [Convergent validation of intracentral relationships of the brain of animals]. Biomedicine. 2017. No. 3. Pp. 16-39. (In Russian).
9. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomedicinskih issledovaniyah [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil'-2S, 2010, 358 p. (In Russian).
10. *Rusalov V.M., Bodunov M.V.* O faktornoj strukture integral'nyh ehlektroehncefalograficheskikh parametrov cheloveka [About the factor structure of the integral electroencephalographic parameters of a person]. V kn.: Psihofiziologicheskie issledovaniya intellektual'noj samoreguljatsii i aktivnosti [In the book: Psychophysiological studies of intellectual self-regulation and activity]. Moscow: Nauka, 1980. Pp. 94-113. (In Russian).
11. *Khrizman T.P., Zajceva L.M.* K voprosu o central'nyh mekhanizmah zritel'nogo opoznaniya obrazov u detej (po dannym EhEhG) [On the question of the central mechanisms of visual identification of images in children (according to EEG)]. Fiziologiya cheloveka [Human physiology]. 1977. V. 3. No. 1. Pp. 22-27. (In Russian).

New approaches to the assessment of intracentral relations in terms of operant behavior and electrograms of the brain of cats

N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, V.N. Karkischenko, L.A. Taboyakova,
S.Yu. Kharitonov, O.V. Alimkina

Insufficient informativeness of the results of standard encephalography prompts the creation of new approaches to the detection and analysis of the bioelectrical activity of the brain according to the parameters of electrograms (EG).

Based on the concept of rationing the results obtained after exposure, the results of background measurements, using mathematical methods of analysis, developed a micromodule, which includes an amplifier of biopotentials, microcircuits controlling the operation of electronic devices, and original software.

With the help of electrode constructions chronically implanted in prescribed areas of the brain and a micromodule, the EG of the most important brain regions were analyzed. Results have been obtained that reflect the preferential increase in the frequency-spectral characteristics of the EG when using new neuropsychotics with depriming effect in the caudate nucleus and cingulate gyrus, a decrease in the spectral power over the entire frequency range in the cerebral cortex, polyphase changes in the power of the frequencies in the posterior hypothalamus core with elements of increase and decrease power of the analyzed frequency ranges.

Against the background of the use of these medicines, the threshold values of the sensitivity of the brain to electro-irritation change, and the range of their transformations is much wider than in background measurements. Different animals and drugs are characterized in general by similar operant behavioral reactions, which allow to evaluate the observed trends reflecting the effects of the drugs used. It has been shown that the caudate nucleus of the brain forms and controls stimulating reactions, and the cortex, the posterior nucleus of the hypothalamus and the end brain – inhibitory processes.

Thus, when induced brain stimulation of areas of the brain and the use of pharmacological neuropsychotics with depriming effect, variations in the threshold values of sensitivity and corresponding behavioral responses characterizing changes in the intracentral relations of the brain of animals are observed. These changes correlate with brain electrograms, which increases the adequacy and reliability of the results of research of intracentral relations.

Key words: intracentral relations, neuropsychotics, operant behavior, brain bioelectrical activity, cats.



Новые биомодели метаболического синдрома

В.Н. Каркищенко¹, Р.А. Клёсов¹, О.И. Степанова¹, О.В. Баранова²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ФГАУ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава России, Москва

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

Работа посвящена поиску и исследованию новых биомоделей метаболического синдрома. Клиническими, биохимическими и морфологическими методами изучены линии мышей NZB и CC57Br, которые воспроизводят течение развития метаболического синдрома и соответствующие патогенетические, функциональные и структурные изменения в организме. Установлено, что мыши линии C57Bl/KsLepr^{db}/+ могут быть использованы в качестве биомодели метаболического синдрома с первого по третий месяц жизни, мыши линий NZB и CC57Br – начиная с шестого месяца. Животные линии NZB отличаются более высоким уровнем глюкозы и HbA1c, а также более выраженным ожирением, однако у данной линии отмечена агрессивность по сравнению с животными линии CC57Br.

Ключевые слова: биомодель, метаболический синдром, ожирение, NZB, CC57Br, C57Bl/KsLepr^{db}/+ (db/db), мыши.

Введение

Метаболический синдром (МС) представляет собой многофакторный комплекс патологических изменений, в основе которых лежит инсулинорезистентность. Еще в 1988 г. G.M. Reaven писал о сочетании инсулинорезистентности, артериальной гипертензии, гиперлипидемии и ожирении [9]. МС часто предшествует развитию сахарного диабета 2-го (СД 2) типа и таким образом представляет собой один из основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний в наше время [10]. Данный синдром также ассоциирован с развитием стеноза печени, с нарушением функции почек и повышенным развитием онкологических заболеваний [6,

7, 8], что делает необходимым не только выявление, но и своевременную коррекцию этих состояний. В связи с этим становится актуальным вопрос о поиске методов коррекции МС. Биомоделирование МС – необходимая составляющая доклинических исследований лекарственных препаратов для лечения МС.

Целью работы явился поиск и разработка биомоделей МС на лабораторных животных.

Материалы и методы

После изучения доступной литературы по данной тематике было принято решение, что наиболее подходящими для разработки в качестве биомодели

МС животными-моделями следует считать мышей линий NZB и CC57Br.

NZB (новозеландская черная мышь) – инбредная линия мышей, особи которой характеризуются спонтанным развитием аутоиммунного заболевания, сходного с красной волчанкой. Инбридинг: F92. Генотип: a, B, +rd, H-2^d. Окраска шерсти черная. Выведены Бельшевским (B1) в 1948 г. из смешанной колонии университета Отаго, которая была привезена в Новую Зеландию из Англии в 1930 г. Происходит от черной пары, отделившейся от NZO на F3 [1].

CC57Br. Инбридинг: F109. Генотип: a, b, H-2^b. Окраска шерсти коричневая. Выведена Н.Н. Медведевым (Mv) в 1943 г. от скрещивания BALB/cN х C57Bl/N [1].

Нами не обнаружено работ, в которых эти линии мышей изучались на наличие у них МС. Для изучения патофизиологических изменений МС в организме животных были использованы мыши линий NZB и CC57Br в возрасте 3-14 мес., для контроля динамики развития МС использовали группу мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db), являющейся генетической моделью СД 2 типа, с развитием МС, начиная с первого месяца жизни, и группу фенотипических здоровых гетерозиготных мышей той же линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/+) [4, 5]. В табл. представлено общее количество мышей в эксперименте.

Экспериментальных животных содержали в условиях свободного доступа к воде и пище на рациональном питании, кормление животных осуществлялось стандартным полнорационным гранулированным (экструдированным) комбикормом для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5 [2]. Животных содержали в микроизоляторной системе по 5 особей, при температуре 20-22°C, в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Биохимические исследования проводили в 10 мкл цельной крови, полученной пункцией малой подкожной вены голени у мышей после 16-18 ч голодания по ранее созданной методике [3].

Исследования показателей крови были проведены в динамике. Содержание глюкозы в крови измеряли на приборе Асси-ЧЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови наносили на тест-полоску. Диапазон измерения составлял 0,6-33,3 ммоль/л.

Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяли на приборе NycoCardREDERII (Норвегия).

Таблица

Распределение животных по группам

Группа	Контроль 1	Контроль 2	Эксперимент 1	Эксперимент 2
Линия животных	db/+	db/db с МС	NZB	CC57Br
Количество животных	20	20	20	20

Тест основан на методе боратного аффинного анализа, диапазон измерения: 3-18%.

Проводился постоянный контроль массы тела животных в динамике.

Для гистологических исследований использовался микроскоп Nikon-EclipseTS 100 (Япония) с программным обеспечением. Парафиновые срезы внутренних органов окрашивались гематоксилин-эозином, криосрезы печени – Суданом III.

Результаты и их обсуждение

Отмечено, что линии мышей NZB и CC57Br характеризуются инсулинорезистентностью и возникающим ожирением в возрасте 6-10 мес. Для подтверждения инсулинорезистентности проведено *биохимическое исследование* уровня глюкозы в крови животных. Было установ-

лено, что у мышей линии NZB **уровень глюкозы** в крови повышается с 5-го мес. жизни и составляет $7,9 \pm 1,34$ ммоль/л, рост гликемии продолжается и к 10-му мес. жизни, достигая $11,7 \pm 1,82$ ммоль/л. У мышей линии CC57Br отмечено аналогичное повышение – с $7,3 \pm 2,01$ до $12,3 \pm 1,30$ ммоль/л (CC57Br) в возрастном интервале 5-10 мес., у мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db) – до $25,9 \pm 1,90$ ммоль/л (рис. 1).

При исследовании **уровня гликозилированного гемоглобина (HbA1c)** у мышей линии NZB с 5-го мес. жизни значения HbA1c составляют 4,0-4,8%, у мышей линии CC57Br – 4,5-5,0%, у мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db) значения данного показателя оставались стабильно высокими, доходя до $9,4 \pm 0,21\%$, по сравнению с нормой – $3,2 \pm 0,13\%$ (рис. 2).

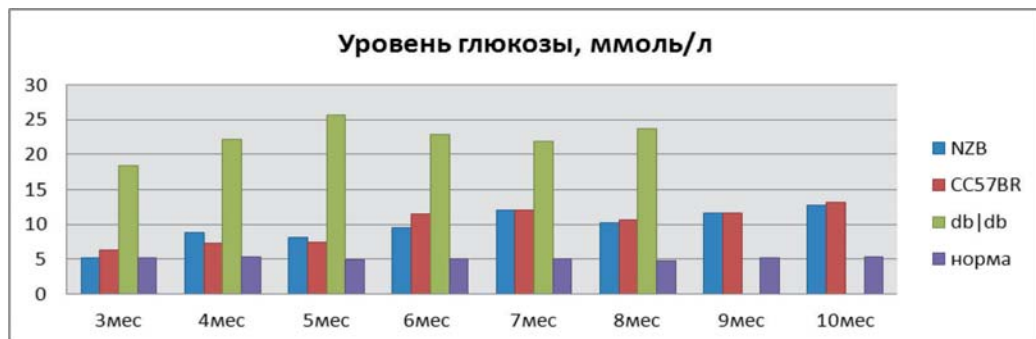


Рис. 1. Динамика изменения уровня глюкозы в крови лабораторных животных.

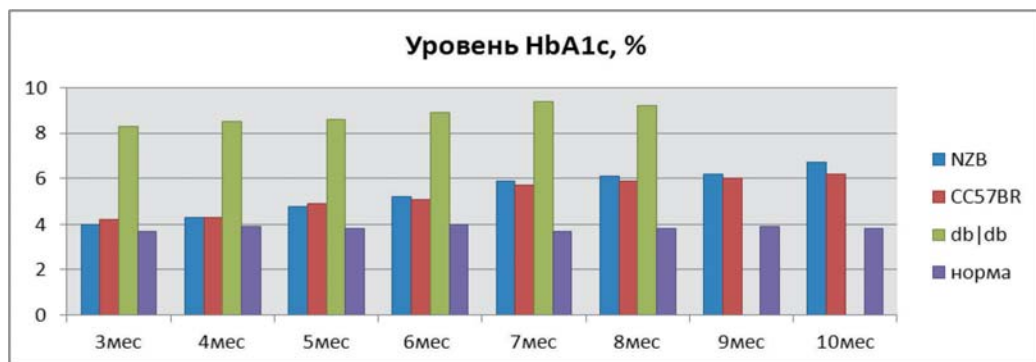


Рис. 2. Динамика изменения уровня HbA1c в крови лабораторных животных.

С возрастом уровень HbA1c у мышей линий NZB и CC57Br повышается и составляет 5,9-6,8% к 10-му мес. жизни. Продолжая динамические исследования уровня глюкозы и HbA1c, установлено, что у мышей линий NZB и CC57Br на 5-7 мес. жизни прогрессируют нарушения углеводного обмена и достоверно отличаются от аналогичных показателей в контрольной (здоровой) группе животных.

Помимо этого, в результате *взвешивания* отмечено увеличение массы тела (рис. 3, 4) у животных экспери-

ментальных групп. Так, у мышей линии NZB отмечен рост с $38,7 \pm 1,25$ до $43,7 \pm 1,30$ г, а в возрасте 12 мес. масса тела может составлять 52-59 г; мыши линии CC57Br прибавляли в весе с $32,7 \pm 2,41$ до $38,5 \pm 1,67$ г, доходя до 47-49 г в возрасте 12 мес.; у мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db) отмечено увеличение массы тела в течение всего исследования по сравнению с нормой ($29,7 \pm 1,07$ г), что свидетельствует о появлении ожирения, типичного для МС, и, следовательно, о нарушениях жирового обмена у этих животных.

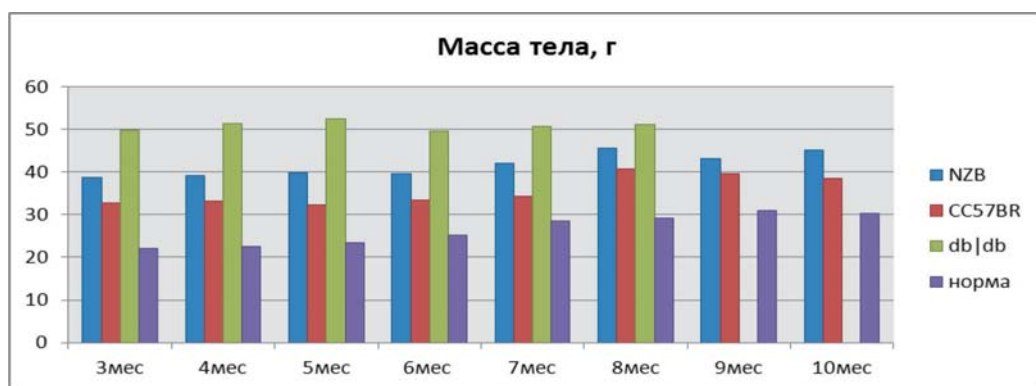


Рис. 3. Динамика изменения массы тела животных.

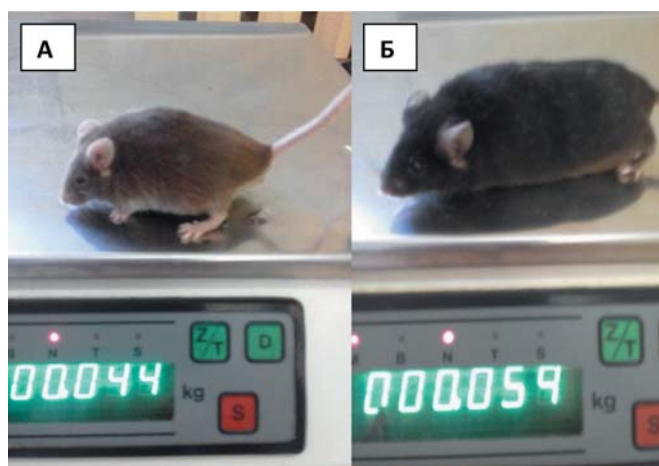


Рис. 4. Взвешивание экспериментальных животных в возрасте 12 мес. (на весах – масса в граммах): А – мыши линии NZB, Б – мыши линии CC57Br.

При *гистологическом исследовании* органов, участвующих в патогенезе МС, получены следующие результаты. Выявлены типичные для МС нарушения в структуре печени и почек.

Гистологическое исследование **печени мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** показало, что дольковое и балочное строение сохранено, отмечается выраженное полнокровие центральных вен, часть из которых паретически расширена, полнокровие центральных отделов синусоидов, сосудов порталных трактов. Гепатоциты всех отделов долек – с признаками плазморексиса, с фрагментированной,

эозинофильной цитоплазмой с просветленными ядрами и выраженными ядрышками (рис. 5). Отмечалась гибель единичных клеток по периферии центральных вен (некробиоз).

Гистологическое исследование **печени мышей линий NZB и CC57Br в возрасте 14 мес.** обнаружило, что строение органа сохранено, центральные вены расширены, часть из них полнокровна, отмечается выраженная очаговая жировая дисторфия гепатоцитов мелко-среднекапельного характера, с поражением преимущественно центральных отделов долек (рис. 6).

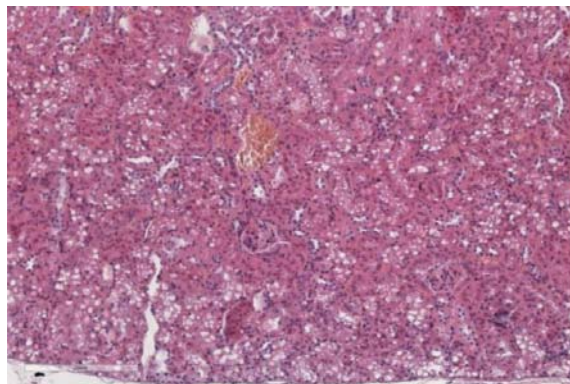


Рис. 5. Гистологическое исследование ткани печени мышей линии NZB в возрасте 12 мес. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х400.

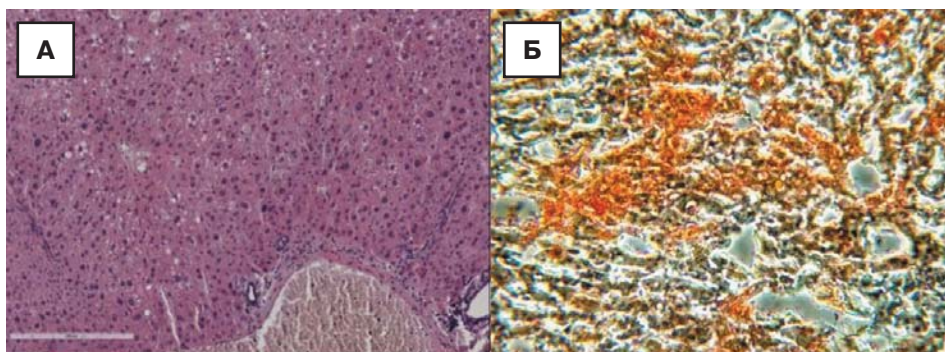


Рис. 6. Гистологическое исследование ткани печени мышей линии NZB в возрасте 14 мес. Окраска: гематоксилин-эозин (А); Судан III (Б). Ув. х200.

При исследовании **почки мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** установлено, что клубочки одинакового размера, с признаками умеренного и выраженного полнокровия капиллярных петель, единичными фокусами интра- и перигломерулярных кровоизлияний. В большей части клубочков отмечалась пролиферация эпителия наружного листка капсулы Боумена-Шумлянско-го. Выраженная жировая дистрофия эпителия проксимальных и дистальных извитых канальцев почки, в части канальцев эпителий некротизирован и слущен в просвет. В просвете единичных канальцев отмечалось скопление гомогенной эозинофильной жидкости. Выраженное полнокровие сосудов мозгового слоя с фокусами некротических кровоизлияний, отек стромы, мелкие перитубулярные кровоизлияния. В эпителии собирательных трубочек и эпителии проксимальных и дистальных каналь-

цев, в строме почек – скопление крупных липидных вакуолей в условиях выраженного кислородного голодания / тканевой гипоксии, накопление связано с инфильтрацией эпителия почечных канальцев жиром при липемии и гиперхолестеринемии (рис. 7А). **В возрасте 14 мес.** у животных в почке отмечаются участки с явлениями жировой дистрофии эпителия извитых канальцев, полнокровные сосуды капиллярного типа, мелкая очаговая лимфоцитарная инфильтрация. Мозговой слой с явлениями отека, полнокровия сосудов (рис. 7Б).

Гистоструктура **селезенки мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** нарушена, рисунок строения стерт, отмечается гиалиноз стенок селезеночных артерий, полнокровие сосудов красной пульпы, т.е. гистологические признаки гипоплазии селезенки (рис. 8). Масса селезенки составила $0,059 \pm 0,011$ г, при норме – $0,089 \pm 0,016$ г.

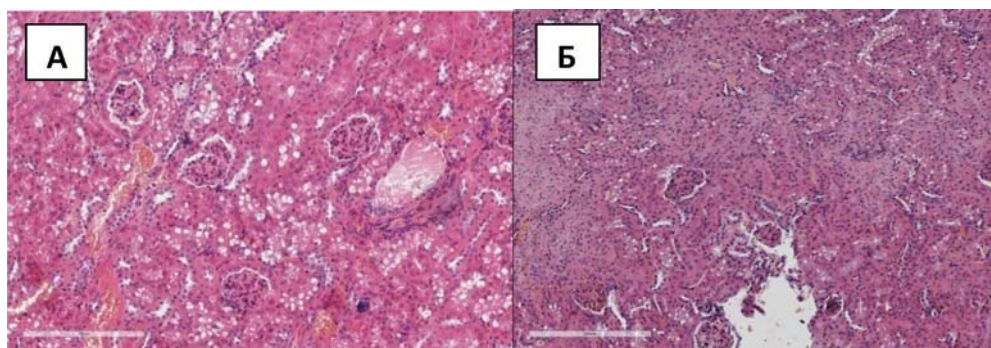


Рис. 7. Морфологические изменения в ткани почки мышей линии NZB в возрасте 12 и 14 мес.: А – в строме почек отмечается скопление крупных липидных вакуолей, ув. х 400; Б – ткань почки с полнокровными капиллярными петлями клубочков, участками жировой дистрофии эпителия извитых канальцев, ув. х200. Окраска гематоксилин-эозином.

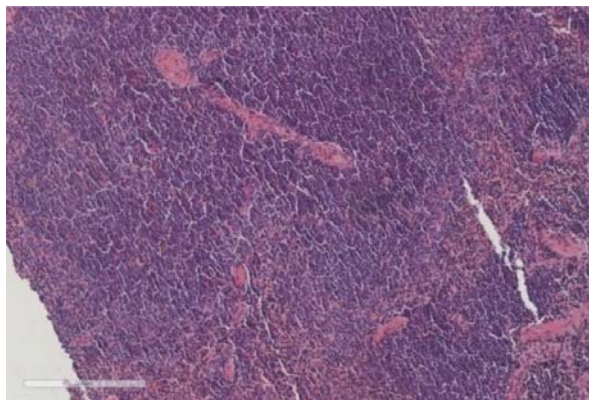


Рис. 8. Морфологические изменения в ткани селезенки мышей линии NZB в возрасте 12 мес.: гипоплазия. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

Дольковое строение **поджелудочной железы мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** сохранено. Экзокринная часть представлена панкреатическими ацинусами обычного гистологического строения, вставочными, внутри- и междольковыми протоками, между ацинусами отмечались полнокровные сосуды (кровеносные капилляры, междольковые артериолы и артерии). Протоки поджелудочной железы выстланы однорядным кубическим эпителием с базально-расположенными небольшими ядрами без видимых ядрышек. Эндокринная часть представлена островками Лангерганса преимущественно

округлой, правильной формы, среднего размера, клеточными, лежащими между панкреатическими, ацинусами (рис. 9).

Морфологические изменения внутренних органов **мышей линии CC57Br в возрасте 12 мес.** аналогичны изменениям у мышей линии NZB. В **печени** – дольковое и балочное строение сохранено, отмечалось выраженное полнокровие центральных вен, часть из которых паретически расширена, полнокровие центральных отделов синусоидов, сосудов порталных трактов. Гепатоциты всех отделов долек – с признаками плазмореаксиса, с фрагментированной, эозинофильной цитоплазмой

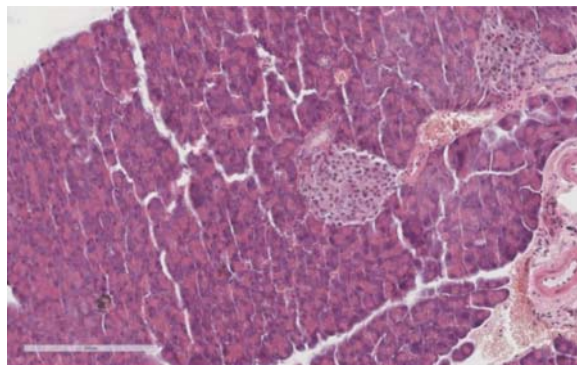


Рис. 9. Морфологические изменения ткани поджелудочной железы у мышей линии NZB в возрасте 12 мес. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

с просветленными ядрами и выраженными ядрышками. Отдельные гепатоциты – в состоянии средне-крупнокапельной жировой дистрофии, часть клеток – с фрагментированной цитоплазмой (рис. 10).

Почка: клубочки одинакового размера, с признаками умеренного и выраженного полнокровия капиллярных петель, единичными фокусами интра- и перигломерулярных кровоизлияний. В некоторых клубочках отмечалась незначительная пролиферация эпителия наружного листка капсулы Боумена-Шумлянського. Признаки жировой дистрофии

эпителия проксимальных и дистальных извитых канальцев почки. Выраженное полнокровие сосудов мозгового слоя с фокусами некротических кровоизлияний, отек стромы, мелкие перитубулярные кровоизлияния. Установлено, что в эпителии собирательных трубочек и эпителии проксимальных и дистальных канальцев, в строме почек присутствовало скопление крупных липидных вакуолей в условиях выраженного кислородного голодания / тканевой гипоксии, накопление связано с инфильтрацией эпителия почечных канальцев жиром при липемии и гиперхолестеринемии (рис. 11).

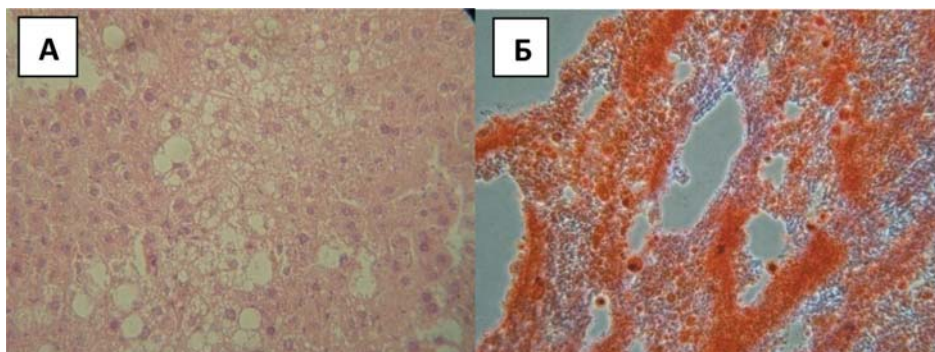


Рис. 10. Гистологическое исследование ткани печени мышей линии CC57B6 в возрасте 12 мес.: А – средне-крупнокапельная жировая дистрофия, окраска гематоксилин-эозином, ув. х400; Б – средне-крупнокапельная дистрофия, окраска Суданом III, ув. х200.

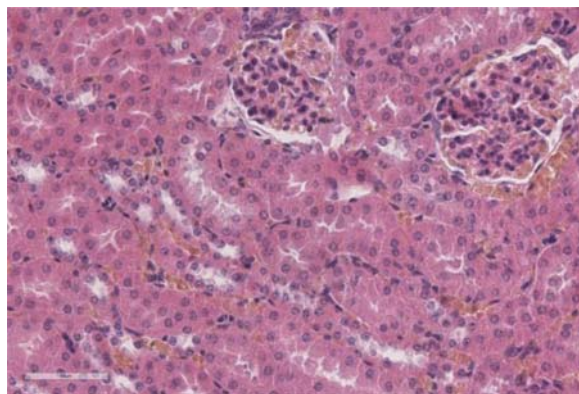


Рис. 11. Морфологические изменения в ткани почки мышей линии CC57B6 в возрасте 12 мес.: в строме почек отмечается скопление крупных липидных вакуолей. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х400.

Гистоструктура **селезенки** нарушена, рисунок строения стерт, отмечается полнокровие сосудов красной пульпы, обширные кровоизлияния, что соответствует признакам гипоплазии селезенки (рис. 12). Масса органа составила $0,603 \pm 0,013$ г.

Дольковое строение **поджелудочной железы** сохранено. Экзокринная часть представлена панкреатическими ацинусами обычного гистологического строения, вставочными, внутри- и междольковыми протоками, между ацинусами отмечались полнокровные сосуды (кровоеносные капилляры, междольковые ар-

териолы и артерии). Протоки поджелудочной железы выстланы однорядным кубическим эпителием с базально-расположенными небольшими ядрами без видимых ядрышек. Эндокринная часть представлена многочисленными островками Лангерганса преимущественно округлой, правильной формы, среднего и крупного размеров, клеточными, лежащими между панкреатическими, ацинусами (рис. 13).

В исследуемый период жизни (12-14 мес.) у экспериментальных животных возникают выраженные метаболические нарушения, сопровожда-

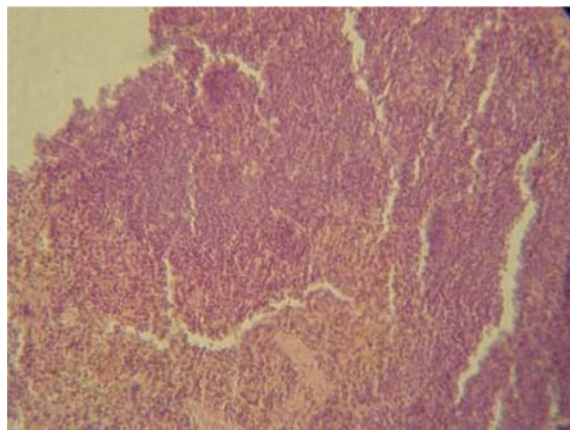


Рис. 12. Морфологические изменения в ткани селезенки мышей линии CC57B6 в возрасте 12 мес.: гипоплазия. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 200$.

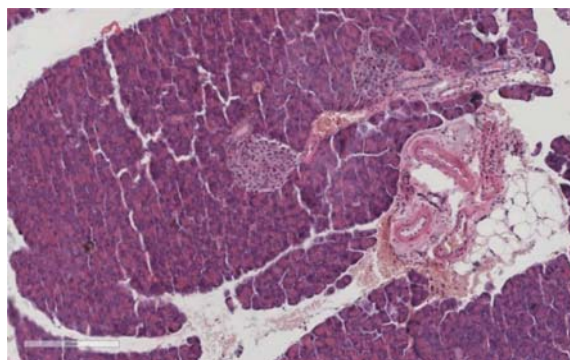


Рис. 13. Гистологическое исследование ткани поджелудочной железы мышей линии CC57B6 в возрасте 12 мес. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 200$.



Рис. 14. Развитие мацерации кожного покрова у мышей линии NZB в возрасте 14 мес.

ющиеся структурными изменениями внутренних органов. Обнаруженные гистологические изменения печени и почек у животных линий NZB и CC57Br укладываются в картину изменений при MC. Показано, что они сопровождаются клиническими и биохимическими признаками, характерными при MC, – стойкой инсулинорезистентностью и ожирением.

Также установлено, что у мышей линии NZB в возрасте 14 мес. возникает *мацерация кожного покрова* (рис. 14).

Выводы

1. Клинические и биохимические исследования, проведенные на мышах линий NZB и CC57Br, выявили убедительные изменения в виде нарастающего увеличения массы животных и устойчивой гипергликемии, свидетельствующие о развитии MC.

2. Гистологические исследования образцов тканей мышей линий NZB и CC57Br выявили структурно-морфологические изменения в печени, почках и селезенке.

3. Установлено, что мыши линии NZB характеризуются более высоким

уровнем глюкозы и гликозилированного гемоглобина, а также более выраженным ожирением, при этом животные данной линии более агрессивны по сравнению с CC57Br.

4. Показано, что мыши линий NZB и CC57Br имеют более позднее развитие MC по сравнению с мышами линии C57BL/KsLepr^{db}/. Начиная с 6-го мес. жизни мыши линий NZB и CC57Br могут быть использованы в качестве новой адекватной модели MC в эксперименте, включая отработку новых способов лечения и профилактики заболевания.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2005. – 608 с.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. – 2010. – 358 с.
3. Степанова О.И. Метод взятия крови у мышей из малой подкожной вены голени // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 137-139.
4. Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Галахова Т.В., Онищенко Н.А., Касинская Н.В. Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsLepr^{db}/+ // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 28-40.

5. *Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Галахова Т.В., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.* Мутантные мыши линии C57BL/KsLepr^{db}/+ как генетическая модель сахарного диабета 2-го типа // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2007. – № 12. – С. 664-667.
6. *Aschner P.* Diabetes epidemiology in Colombia // *Avances Diabetologia.* – 2010. – No. 29. – Pp. 95-100.
7. *Extermann M.* Metabolic syndrome and cancer: from bedside to bench and back // *Interdiscip. Top. Gerontol.* – 2013. – V. 38. – Pp. 49-60.
8. *Ferdinand K.C., Rodriguez F., Nasser S.A.* Cardiorenal metabolic syndrome and cardiometabolic risks in minority populations // *Cardiorenal. Med.* – 2014. – V. 4. – No. 1. – Pp. 1-11.
9. *Reaven G.M.* Role of insulin resistance in human disease // *Diabetes.* – 1988. – No. 37. – Pp. 1595-1607.
10. *Vanni E., Bugianesi E., Kotronen A., et al.* From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? // *Digest. Liver Dis.* – 2010. – V. 42. – No. 5. Pp. 320-330.
1. *Karkischenko N.N.* Osnovy biomodelirovaniya [Basics of biomodeling]. Moscow: Izd-vo VPK. 2005. 608 p. (In Russian).
2. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i alternativnym modelyam 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).
3. *Stepanova O.I.* Metod vzyatiya krovi u myshey iz maloy podkozhnoy veny goleni [Method of drawing blood from mice from the small saphenous vein of the leg]. *Biomedicine.* 2006. No. 2. Pp. 137-139. (In Russian).
4. *Stepanova O.I., Karkischenko V.N., Baranova O.V., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Galakhova T.V., Onishchenko N.A., Kasinskaya N.V.* Geneticheskaya model sakharnogo diabeta 2 tipa na mutantnykh myshakh linii C57BL/KsLepr^{db}/+ [Genetic model of type 2 diabetes mellitus in mutant mice of the C57BL/KsLepr^{db}/+ line]. *Biomedicine.* 2006. No. 2. Pp. 28-40. (In Russian).
5. *Stepanova O.I., Karkischenko N.N., Galakhova T.V., Baranova O.V., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Stepanova E.A., Zakirianov A.R., Onishchenko N.A.* Mutantnyye myshi linii C57BL/KsLepr^{db}/+ kak geneticheskaya model sakharnogo diabeta 2-go tipa [Mutant mice of the C57BL/KsLepr^{db}/+ line as a genetic model of type 2 diabetes mellitus]. *Byull. eksper. biol. and med.* [Bulletin of experimental biology and medicine]. 2007. No. 12. Pp. 664-667. (In Russian).
6. *Aschner P.* Diabetes epidemiology in Colombia. *Avances Diabetologia.* 2010. No. 29. Pp. 95-100.
7. *Extermann M.* Metabolic syndrome and cancer: from bedside to bench and back. *Interdiscip. Top. Gerontol.* 2013. V. 38. Pp. 49-60.
8. *Ferdinand K.C., Rodriguez F., Nasser S.A.* Cardiorenal metabolic syndrome and cardiometabolic risks in minority populations. *Cardiorenal. Med.* 2014. V. 4. No. 1. Pp. 1-11.
9. *Reaven G.M.* Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988. No. 37. Pp. 1595-1607.
10. *Vanni E., Bugianesi E., Kotronen A., et al.* From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digest. Liver Dis.* 2010. V. 42. No. 5. Pp. 320-330.

References

New biomodels of metabolic syndrome

V.N. Karkischenko, R.A. Klesov, O.I. Stepanova, O.V. Baranova

The work is devoted to the search and research of new biomodels of metabolic syndrome. Mouse line NZB and CC57Br was investigated like as new biomodel of metabolic syndrome by clinical, biochemical, and morphological methods of analysis, which reproduce the course of the development of the metabolic syndrome and the corresponding pathogenetic, functional and structural changes in the body. It was established that C57Bl/KsLepr^{db}/+ line of mice can be used as the metabolic syndrome biomodel from the first to the third month of life, NZB and CC57Br mice – starting from the sixth month. Animals of the NZB line have a higher level of glucose and HbA1c, as well as more pronounced obesity, however, aggressiveness was noted in this line compared to animals of the CC57Br.

Key words: biomodel, metabolic syndrome, obesity, NZB, CC57Br, C57Bl/KsLepr^{db}/+ (db/db), mice.

Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных

С.В. Оковитый¹, Е.Б. Шустов², М.А. Белых¹, Н.В. Кириллова¹,
О.М. Спасенкова¹, А.Г. Иванов¹, А.В. Караваева¹, А.В. Ткачева¹

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

² – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Контактная информация: д.м.н. Оковитый Сергей Владимирович, sergey.okovity@pharminnotech.com

В статье представлен анализ некоторых изменений, происходящих в организме лабораторных мышей при моделировании неалкогольной жировой болезни печени путем 6-месячного скормливания им высоколипидного пищевого рациона. Показано, что в течение этого периода в организме животных происходит перестройка метаболизма на преимущественную утилизацию липидов, сопровождающуюся выраженным нарушением углеводного обмена в печени и скелетных мышцах, активацией процессов перекисного окисления липидов при индукции активности каталазы, накоплении основных карбонильных групп белков. Выявленная перестройка энергетического обмена дополняется двукратным снижением физической работоспособности животных в тесте вынужденного плавания с грузом, двигательной активности и мотивационного компонента ориентировочной реакции в тесте «Открытое поле». Наиболее отчетливое ухудшение состояния животных происходит в конце 3-4-го месяца моделирования стеатоза печени.

Ключевые слова: биологическое моделирование, неалкогольная жировая болезнь печени, стеатоз печени, энергетический обмен.

Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП) является одним из наиболее распространенных заболеваний гепатобилиарной системы. В США на ее долю приходится 20-30% в структуре популяции, в азиатских странах – 12-24% [10, 21]. По результатам Всероссийского эпидемиологического исследования, которое проводилось в 16-ти городах РФ в 2013-2014 гг. и в котором приняли участие более 50 тыс. пациентов, НЖБП выявлена у 37,3% россиян, побывавших на первичном приеме у врача [4]. Согласно прогнозам экспертов ВОЗ, к 2020 г. доля взрослого

населения с ожирением в США составит 45-50%, странах Европейского союза – 30-40%, латиноамериканских странах – 20% [10, 11].

Важную роль в изыскании подходов к профилактике и лечению НЖБП играет использование приемлемых экспериментальных моделей ее формирования. Оптимальная модель НЖБП на животных должна отражать все гистопатологические и патофизиологические особенности поражения печени, встречающиеся у человека при рассматриваемом заболевании [16]. Соответственно, в печени у животных с моделью НЖБП должен выявляться стеатоз,

внутридольковое воспаление, гепатоцеллюлярная баллонная дистрофия, перисинусоидальный фиброз. Кроме того, должны наблюдаться метаболические нарушения – такие, как инсулинорезистентность, гипергликемия, дислипидемия, изменение адипокинового профиля, развитие ожирения [1, 20]. У животных НЖБП может быть воспроизведена разными способами, которые приводят к изменению жирового обмена в печени – дисбалансу между липогенезом и липолизом. Эти способы можно разделить на две обширные группы: развитие патологии печени, вызванной генетической мутацией (специализированные линии животных), и формирование НЖБП в фенотипе. Последняя группа объединяет модели, индуцированные алиментарным фактором.

Формирование диет-индуцированных моделей широко применяется в области экспериментального моделирования НЖБП. Использование метионин-холин-дефицитной (МХД) диеты позволяет моделировать тяжелую степень стеатоза печени и некротические изменения с воспалительным ответом уже на 2-й неделе эксперимента с дальнейшим прогрессированием до септального и препортального фиброза [12]. При всем сходстве патологических изменений в печени между НЖБП, вызванной МХД диетой у крыс, и клиническим течением НЖБП человека отмечаются некоторые различия. Так, при экспериментальном моделировании заболевания у крыс, содержащихся на МХД диете, наблюдается значительная потеря мышечной и жировой массы (до 40% за 10 недель), у животных не возникает инсулинорезистентность. Кроме того, заболевание развивается не у всех

животных, содержащихся на экспериментальном рационе, может наблюдаться резистентность к МХД диете.

Поскольку НЖБП рассматривается как печеночное проявление метаболического синдрома, данный факт предполагает использование модели с применением рациона, богатого фруктозой. При содержании животных на диете, включающей 70% фруктозы, на 5-й неделе эксперимента у них развиваются макровезикулярный стеатоз и внутридольковое воспаление, увеличивается масса печени [9, 15]. Однако тканевое расположение включений жиров при этой модели отличается от того, что встречается при НЖБП человека.

Диета с высоким содержанием жиров также достаточно широко используется для формирования стеатоза и стеатогепатита у животных [1, 9, 15, 16, 20]. НЖБП, вызванная в эксперименте воздействием высокожировой диеты, по своим основным характеристикам сходна с этим заболеванием у человека. У животных, содержащихся на такой диете, помимо гистопатологических изменений, характерных для НЖБП у людей, развиваются ожирение, дислипидемия, инсулинорезистентность. У всех экспериментальных животных высокожировой рацион вызывает формирование поражения печени. Он может приводить к различной степени развития стеатоза, воспаления и фиброза, что определяется характером рациона (процентное содержание и состав жиров) и продолжительностью его применения. Так, при воздействии высокожирового рациона, включающего по 10% растительного масла, сала и 2% холестерина от общего состава рациона, у крыс в течение 12-ти недель происходит жировая инфильтра-

ция печени и формируется стеатоз [13]. Недостатком данного метода является низкая вероятность развития глубоких структурных повреждений печени, способствующих формированию стеатогепатита и фиброза.

Известна модель C.S. Lieber и соавт., при которой НЖБП формируется путем интрагастрального кормления животных эмульсией с высоким содержанием растительных жиров (71% от общего рациона). При данной экспериментальной модели на 21-е сут происходит формирование стеатоза, воспалительная инфильтрация печени на фоне окислительного стресса и инсулинорезистентности [18].

В основе модели, разработанной для крыс популяции линий Wistar, лежит пролонгированное воздействие на животных (в течение 180-ти сут) высокожировой диеты, обогащенной топленым говяжьим салом (19%) и холестерином (2% от общего рациона) [5].

У мышей линии C57Bl/6 комбинированная диета, включающая 63% стандартного корма, 19% животного жира, 10% сахарозы и 8% изолированного соевого белка, не только приводила к жировому повреждению печени, но и способствовала ухудшению обучаемости и памяти животных [22].

Цель работы – выявить закономерности динамики метаболических и функциональных показателей у лабораторных животных в процессе моделирования НЖБП, позволяющие оценивать специфическую эффективность профилактического и лечебного действия лекарственных средств, влияющих на процессы печеночной липодистрофии.

Материалы и методы

Лабораторные животные (мыши линии C57Bl/6) были получены из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Содержание животных и экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

После завершения 14-дневного карантина животные были рандомизированы на две группы: интактную и с моделированием жировой болезни печени.

Для **моделирования стеатоза печени** была использована гиперкалорийная высокожировая диета при избытке легкоусваиваемых углеводов, которая создавалась путём добавления к стандартному корму (63%) топленого свиного жира (19%), сахарозы (10%) и изолированного соевого белка (8%) [22]. Такая диета оказывает влияние на жировой и углеводный обмен животных, способствуя развитию у них стеатоза печени и формированию дисгликемии. Общая длительность воздействия – 24 недели.

Биологический материал для исследования (кровь, ткани) у животных группы с моделированием жировой болезни печени забирали на следующие сутки после прекращения диетических мероприятий. По окончании эксперимента у наркотизированных хлоралгидратом (350 мг/кг, «Merck KGaA», Германия) животных забирали кровь методом кардиальной пункции в пробирки с активатором свертывания крови. После отстаивания (30 мин) кровь центрифугировали 10 мин при 1000 об./мин,

отделяли получившуюся сыворотку, затем вторично центрифугировали при 4000 об./мин 15 минут. Полученную сыворотку переносили во вторичные пробирки, которые затем загружали в анализатор. На биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ («Awareness Technology», США) и Эрба Лахема («Erba Lachema», Чехия) определяли **активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), уровни общего холестерина, липопротеидов низкой плотности и триглицеридов, концентрацию глюкозы.**

Кроме того, в сыворотке крови определяли **содержание нейтральных и основных карбонильных групп белков**, а в эритроцитах – **активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ).** Карбонильные группировки белков определяли по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием окрашенных гидразонов по методу Levine R., в модификации [3, 17, 19]. Определение активности каталазы крови проводили на основании способности перекиси водорода образовывать с солями молибдата стойкие окрашенные комплексы желтого цвета [14]. Активность супероксиддисмутазы определяли по скорости аутоокисления кверцетина в аэробных условиях [7].

В ткани печени определяли **содержание суммарных липидов и гликогена;** в скелетных мышцах – **гликогена.** Гликоген в тканях печени и мышц определяли по методике [2]. Количественное определение общих липидов в ткани печени проводили по методу Фолча [8].

В качестве системного маркера состояния здоровья животных и их функционального резерва во время моделирования НЖБП в динамике в конце каждого месяца приема высокожирового рациона использовали показатель физической работоспособности мышей в **тесте вынужденного плавания с грузом 7%** от массы тела животных. Спонтанные поведенческие характеристики в динамике оценивали по результатам выполнения животными **тестов «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Открытое поле»** (ООО «НПК Открытая наука», Россия) [6].

Статистическую обработку результатов проводили методами описательной статистики, дисперсионного, корреляционного и дискриминантного анализов с помощью пакета «Анализ данных» процессора таблиц Microsoft Excel и специализированной программы статистической обработки данных Statistica v.10. Для проведения многомерных статистических исследований массивы данных предварительно преобразовывали в Z-оценки, имеющие нормальное статистическое распределение.

Результаты и их обсуждение

Для анализа значимости влияния уровня липидов печени на другие метаболические показатели был выполнен однофакторный дисперсионный анализ, для которого животные интактной группы были разбиты на 3 подгруппы в зависимости от уровня содержания липидов в печени: с низким содержанием (менее 0,6 мг/г ткани), средним (0,6-0,7 мг/г ткани), высоким (более 0,7 мг/г ткани). Аналогичная разбивка массива проводилась и в отношении уровня холестерина крови, при этом границами сред-

него уровня были 1,0 и 1,3 ммоль/л. Результаты анализа гипотезы о роли липодистрофии печени и гиперхолестеринемии представлены в табл. 1.

Установлено, что фактор высокого содержания липидов в печени у интактных животных статистически достоверно влияет только на показатель активности

АлАТ, которая монотонно возрастает от животных с низким уровнем липидов печени к животным с высоким уровнем липидов. Вероятно, этот метаболический показатель может быть использован как косвенный маркер процессов липодистрофии печени, связанных с высоким накоплением липидов в этом органе.

Таблица 1

Результаты дисперсионного анализа влияния уровня липидов печени и гиперхолестеринемии на метаболические показатели интактных животных

Показатель	Фактор высокого содержания липидов в печени		Фактор гиперхолестеринемии	
	Коэффициент детерминации, D	Достоверность, p	Коэффициент детерминации, D	Достоверность, p
Липиды печени, мг/г ткани			0,16	0,26
Холестерин крови, ммоль/л	0,03	0,79		
ЛПНП крови, ммоль/л	0,10	0,44	0,007	0,94
Триглицериды крови, ммоль/л	0,02	0,84	0,69	8×10^{-5}
Глюкоза крови, ммоль/л	0,14	0,31	0,19	0,19
Гликоген печени, мг/г ткани	0,05	0,64	0,09	0,45
Гликоген мышц, мг/г ткани	0,19	0,17	0,10	0,43
АлАТ, МЕ/л	0,07	0,54	0,34	0,04
АсАТ, МЕ/л	0,34	0,04	0,27	0,08
ГГТП, МЕ/л	0,08	0,51	0,28	0,07
СОД эритроцитов, усл.ед. (%) / мл цельной крови	0,10	0,43	0,06	0,59
Каталаза эритроцитов, ммоль $\text{H}_2\text{O}_2 \times 10^3$ / мин*мл цельной крови	0,26	0,09	0,02	0,82
Нейтральные карбонильные группы белков крови, D_{370} / мг белка	0,01	0,92	0,12	0,34
Основные карбонильные группы белков крови, D_{430} / мг белка	0,10	0,40	0,01	0,91

Фактор гиперхолестеринемии существенно влияет на содержание триглицеридов плазмы крови (монотонное возрастание) и активность АлАТ (монотонное снижение). На уровне статистических тенденций выявлено умеренное влияние гиперхолестеринемии на активность ГГТП (возрастание в группе с высоким уровнем холестерина) и АсАТ плазмы крови (монотонное снижение).

Результаты исследования метаболических последствий моделирования НЖБП представлены в табл. 2.

При анализе табл. 2 обращает на себя внимание, что моделирование НЖБП у животных проявилось не столько в изменении показателей липидного, сколько углеводного обмена, что свидетельствует о завершении к моменту исследования перестройки метаболи-

Таблица 2
Влияние моделирования НЖБП на метаболические показатели животных

Показатель	Единица измерения	Значения в группах (M±m)		Влияние НЖБП, %	Достоверность различий, р
		интактные	НЖБП		
В плазме крови					
Глюкоза	ммоль/л	8,3±0,8	5,7±0,7	-32	0,04
АлАТ	МЕ/л	22,9±2,6	24,3±4,6	+6	0,77
АсАТ	МЕ/л	65,7±7,3	81,1±14,2	+23	0,31
ГГТП	МЕ/л	0,36±0,09	0,25±0,22	-29	0,64
Общий холестерин	ммоль/л	1,24±0,09	1,12±0,09	-9	0,40
ЛПНП	ммоль/л	0,23±0,03	0,19±0,01	-18	0,35
Триглицериды	ммоль/л	0,39±0,05	0,28±0,05	-27	0,20
Нейтральные карбонильные группы	D ₃₇₀ / мг белка	2,18±0,17	2,48±0,12	+13	0,20
Основные карбонильные группы	D ₄₃₀ / мг белка	0,62±0,06	1,43±0,07	+130	10 ⁻⁷
В эритроцитах					
СОД	усл.ед. (%) / мл цельной крови	34,2±1,70	36,3±0,77	+6	0,31
Каталаза	ммоль Н ₂ О ₂ ×10 ³ / мин×мл цельной крови	22,5±0,50	30,6±0,60	+36	6×10 ⁻⁹
В тканях					
Липиды печени	мг/г ткани	0,06±0,01	0,07±0,01	+10	0,12
Гликоген печени	мг/г ткани	0,90±0,06	0,53±0,05	-41	0,005
Гликоген скелетных мышц	мг/г ткани	0,40±0,02	0,27±0,02	-33	4×10 ⁻⁴

ческих процессов в организме мышей. Так, исследуемые показатели жирового обмена не имели статистически достоверных отличий от группы интактных животных, а значения их показателей в плазме были даже несколько ниже: например, холестерина – 91%, триглицеридов – 73%, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) – 82%. Выявленный прирост уровня липидов в печени (+10%) также не был статистически достоверным. В то же время содержание гликогена в печени и мышцах животных достоверно снижалось на 41 и 33% соответственно, уровень глюкозы в крови снижался на 32%. Обращает на себя внимание также накопление в крови мышей основных карбонильных групп (в 2,3 раза), что является маркером активного протекания процессов перекисного и свободно-радикального окисления. Об активации процессов перекисного окисления липидов также свидетельствует субстратная активация каталазы (+36%).

Корреляционный анализ показал, что с уровнем липидов печени связаны такие показатели, как содержание гликогена в печени и мышцах, АсАТ, общий холестерин, триглицериды, а также содержание основных карбонильных групп белков плазмы. С уровнем глюкозы крови оказываются связанными активность СОД, ГГТП, АсАТ, содержание триглицеридов. ЛПНП и каталаза практически не взаимодействуют с остальными показателями, содержание нейтральных карбонильных групп коррелирует только с уровнем основных карбонильных групп, а АлАТ – с активностью АсАТ. Особого внимания заслуживает тесный кластер положительных корреляционных

связей уровня липидов печени с содержанием гликогена как в печени, так и в скелетных мышцах. Отсутствие связей содержания гликогена в тканях от уровня глюкозы в крови, характерных для интактных животных, свидетельствует о возникновении глубокого нарушения обменных процессов в клетках.

Изменения структуры корреляционных связей метаболических показателей при формировании жировой болезни печени представлены в табл. 3.

Моделирование НЖБП проявлялось разрушением характерных для группы интактных животных корреляционных связей между метаболическими показателями. Причем разрушались преимущественно связи с липидами печени и ЛПНП, что подтверждает существенные повреждения механизмов захвата липопротеидов тканями при моделировании жировой болезни.

Специфичность перестройки обменных процессов при моделировании НЖБП у лабораторных животных отражает появление новых корреляционных связей, не характерных для интактных животных. Достаточно часто новые связи образуются с показателями, характеризующими жировой обмен (липиды печени, холестерин, триглицериды, ЛПНП), уровень карбонильных групп белков плазмы крови, трансаминаз, глюкозы, СОД. Тем самым корреляционный анализ показывает, что именно с этими показателями сопряжены более напряженно протекающие метаболические процессы.

При этом многие присутствующие в интактной группе корреляционные связи остаются в той или иной степени и

Таблица 3

Перестройка корреляционных связей метаболических показателей под влиянием моделирования НЖБП

Показатель А	Показатель Б	Коэффициенты корреляции		Эффект моделирования НЖБП
		интактные животные	НЖБП	
Липиды печени	Каталаза	+0,58	*	разрушение
	Холестерин	+0,68	+0,80	усиление
	Триглицериды	+0,50	+0,74	усиление
	АлАТ	-0,52	*	разрушение
	Глюкоза	*	-0,49	появление
	АсАТ	*	+0,60	усиление
	Нейтр. КГ	*	-0,47	появление
	Осн. КГ	*	+0,69	появление
	Гликоген печени	*	+0,79	появление
	Гликоген мышц	*	+0,53	усиление
Холестерин	Триглицериды	+0,88	+0,76	сохранение
	АлАт	-0,66	-0,53	сохранение
	Осн. КГ	*	+0,76	появление
	Глюкоза	*	+0,77	усиление
	ГГТП	*	+0,69	усиление
	АсАТ	*	+0,82	появление
АлАТ	ГГТП	-0,57	*	разрушение
	АсАт	*	+0,88	появление
	Нейтр. КГ	*	-0,68	появление
	Осн. КГ	*	-0,55	появление
АсАТ	ГГТФ	-0,64	-0,59	сохранение
	Нейтр. КГ	*	-0,63	появление
	Осн. КГ	*	-0,73	появление
	Глюкоза	*	-0,67	усиление
	ЛПНП	*	-0,51	инверсия
	Триглицериды	*	-0,54	появление
	СОД	*	+0,72	появление
ГГТП	Каталаза	*	+0,57	усиление
	Глюкоза	*	+0,53	появление
	АлАТ	*	-0,55	появление
ЛПНП	АсАТ	+0,40	-0,51	инверсия
	Глюкоза	-0,66	*	разрушение
	Глюкоза	+0,58	*	разрушение
Гликоген мышц	Нейтр. КГ	+0,49	-0,39	инверсия
	Триглицериды	-0,58	-0,62	сохранение
	СОД	*	+0,61	появление
	Гликоген печени	*	+0,81	появление
	Осн. КГ	+0,96	+0,78	сохранение
Нейтр. КГ	Триглицериды	*	+0,65	появление
	СОД	*	+0,57	усиление
Осн. КГ	Глюкоза	*	+0,78	усиление
	Триглицериды	*	+0,82	появление
СОД	Глюкоза	*	+0,66	появление

Примечание: * – коэффициент корреляции статистически не достоверен.

при моделировании жировой болезни (в табл. 3 – сохранение, усиление, ослабление). Следовательно, возникающая у животных перестройка метаболизма при моделировании НЖБП не является для них критической. Вероятно, происходящие перестройки энергопродуцирующих механизмов при этом в достаточной степени обеспечиваются субстратами и не вызывают энергодиффицита.

Сформированное многомерное пространство метаболических показателей двух состояний животных – интактное (здоровые животные) и модельное (экспериментальная НЖБП) – было подвергнуто пошаговому дискриминантному анализу. Были получены две группы коэффициентов (стандартизированные – для z-оценок и свободные – для натуральных оценок) для линейной дискриминантной функции, дифференцирующей положение конкретного наблюдения на шкале расстояний между центроидами состояний (табл. 4).

Таким образом, линейная дискриминантная функция, дифференцирующая по метаболическим показателям состояние экспериментальной НЖБП от интактных животных, имеет следующий вид:

$$F1=3,73\times X2+3,72\times X3-1,91\times X1-80,21\times X4+5,62,$$

где X1 – основные карбонильные группы, X2 – нейтральные карбонильные группы, X3 – гликоген печени, X4 – липиды печени.

Положительные значения этой функции означают, что экспериментальная НЖБП не сформирована, а отрицательные – что сформирована. Чем дальше конкретное расчетное значение от нулевого, тем более показательным является положение экспериментального наблюдения в соответствующей группе (здоровых или больных) животных.

При моделировании НЖБП каждое животное в конце каждого месяца моделирования подвергалось плавательному

Таблица 4
Коэффициенты линейной дискриминантной функции, разделяющей состояние интактных животных и животных с экспериментальной НЖБП

Показатель	Коэффициенты линейной дискриминантной функции	
	стандартизированные	свободные
Основные карбонильные группы (X1)	-2,12	-11,91
Нейтральные карбонильные группы (X2)	+1,64	+3,73
Гликоген печени (X3)	+0,66	+3,72
Липиды печени (X4)	-0,69	-80,26
Константа (b)	0	+5,62



Рис. 1. Динамика показателя физической работоспособности животных в процессе моделирования НЖБП (плавательный тест, % от уровня интактных животных).

тесту на работоспособность. Динамика длительности вынужденного плавания с грузом отражена на рис. 1.

Установлено, что перевод животных с обычного рациона питания на высокожировую диету при моделировании НЖБП вызывает достаточно быстрое (к концу первого месяца) ухудшение функционального состояния, проявляющееся снижением работоспособности в 2 раза. Однако в последующем, с 4-го мес. такого питания, начинается постепенное восстановление физической работоспособности, что может свидетельствовать об адаптации организма мышей к такой диете. Вероятно, к этому сроку завершаются основные процессы перестройки энергетического обмена на преимущественную утилизацию липидов и восстанавливается способность к адекватному энергообеспечению мышечной деятельности. Дисперсионный анализ показателя физической работоспособности животного показал значимость фактора «Длительность моделирования» (коэффициент детерминации

$D=0,248$, $p=0,0009$) в вариативности времени предельного плавания. Анализ частот распределения данного показателя в группе контроля и при моделировании НЖБП показал, что при этом происходит полное исчезновение животных с высокой работоспособностью и переход существенной части животных со средним уровнем физической работоспособности в группу животных с низкой оценкой этого показателя (рис. 2).

Необходимо отметить, что моделирование НЖБП высокожировой диетой практически не влияет на базовые характеристики спонтанного поведения животных в тестах «ПКЛ» и «Открытое поле» (табл. 5).

Как следует из табл. 5, в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» моделирование НЖБП не сопровождалось какими-либо неблагоприятными изменениями поведенческой активности животных. В поздние сроки (4-5 мес.) отмечалась адаптация животных к условиям исследования, что проявлялось в положительной динамике их активности

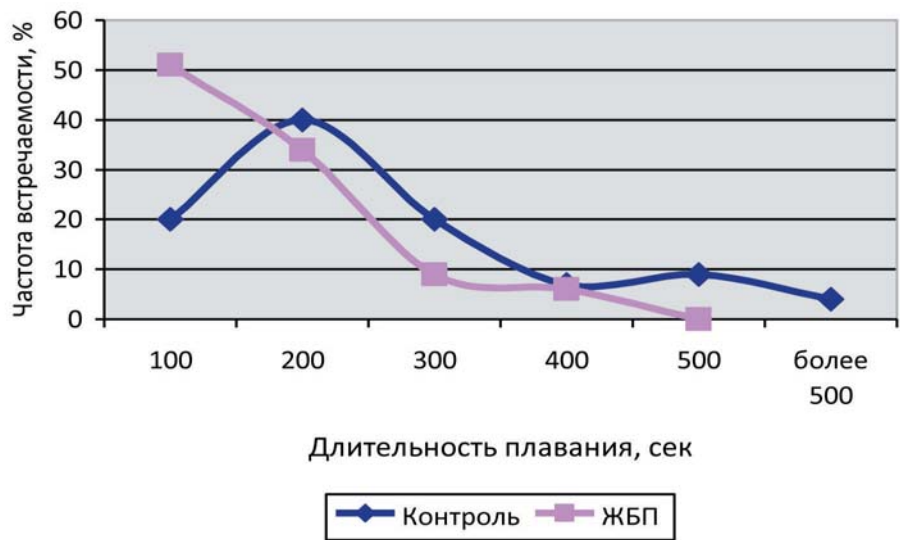


Рис. 2. Частотные кривые распределения длительности вынужденного плавания в группе контроля и при моделировании НЖБП.

Таблица 5
Динамика базовых характеристик спонтанного поведения животных

Показатель, ед. изм.	Центроиды групп по месяцам моделирования						D	p
	фон	1	2	3	4	5		
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»								
Вр ЦП, с	12	9	10	6	17	26	0,06	0,44
Вр ЗР, с	138	165	159	166	160	144	0,07	0,34
Вр ОР, с	30	6	11	8	3	10	0,08	0,31
ЛППЗОР, с	121	108	96	99	93	126	0,02	0,89
КЗ ОР, шт	0,8	0,8	1,0	0,8	0,7	0,3	0,04	0,75
КЗ ЗР, шт	2,1	2,1	2,8	2,2	2,6	2,7	0,02	0,86
Груминг, шт	2,4	2,2	2,4	2,9	3,8	4,8	0,38	2×10 ⁻⁶
ЭЛ, балл	0,2	0,7	0,3	0,2	0,5	0,2	0,12	0,10
ПИА, балл	5,7	7,2	8,0	4,6	12,0	13,0	0,20	0,007
КФ Активность, балл	2,9	3,4	3,7	3,0	4,7	4,8	0,17	0,02
КФ Стресс, балл	1,1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,3	0,08	0,31
Тест «Открытое поле»								
Двигательная активность, балл	106	60	30	34	24	39	0,43	6×10 ⁻⁸
Ориентировочная реакция, балл	5,7	2,2	3,5	2,7	1,2	2,0	0,10	0,14
Мотивационный компонент ориентировочной реакции, балл	5,8	5,6	2,7	3,9	1,8	5,2	0,14	0,05

Примечания: Вр – время, ЦП – центральное положение, ЗР – закрытый рукав, ОР – освещенный рукав, ЛППЗОР – латентный период первого захода в освещенный рукав, КЗ – количество заходов, ЭЛ – эмоциональная лабильность, ПИА – поисково-исследовательская активность, КФ – комплексный фактор, D – коэффициент детерминации, p – уровень достоверности.

(ПИА, КФ Активность) и комфортности (груминг). В тесте «Открытое поле» отмечено достоверное снижение двигательной активности и мотивационного компонента ориентировочной реакции с частичным восстановлением в завершающем периоде моделирования. Восстановление этих показателей начинается с 5-го мес. моделирования НЖБП.

Заключение

Проведенное исследование показало, что применение гиперкалорийной высокожировой диеты (6 мес.) при избытке легкоусваиваемых углеводов, которая создавалась путём добавления к стандартному корму (63%) топленого свиного жира (19%), сахарозы (10%) и изолированного соевого белка (8%), формирует у мышей линии C57Bl/6 неалкогольную жировую болезнь печени. Моделирование НЖБП у лабораторных животных проявилось не столько в изменении показателей липидного, сколько – углеводного обмена, что свидетельствует о завершении к моменту исследования перестройки метаболических процессов в организме мышей.

Показатели липидного обмена в крови животных нечувствительны к формированию НЖБП. Для лабораторной верификации этого патологического процесса необходимо изучение липидов и гликогена печени.

Выявленные закономерности динамики метаболических показателей у лабораторных животных в процессе моделирования НЖБП могут быть использованы для доклинической оценки специфических механизмов профилактического или лечебного действия лекарственных средств, влияющих на процессы печеночной липодистрофии.

Список литературы

1. Бивалькевич Н.В., Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П. Методические подходы к экспериментальному моделированию неалкогольной жировой болезни печени // РЖГГК. – 2015. – № 4. – С. 39-45.
2. Давченко Е.О., Чиркин А.А. Новые методические подходы к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – № 3. – С. 25-28.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
4. Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Тихонов И.Н., Широкова Е.Н., Буверов А.О., Дранкина О.М., Шульпекова Ю.О., Цуканов В.В., Маммаев С.Н., Маев И.В., Пальгова Л.К. Клинические рекомендации по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации // РЖГГК. – 2016. – № 2. – С. 24-42.
5. Караман Ю.К., Новгородцева Т.П., Гвозденко Т.А. Моделирование неалкогольного стеатогепатита // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 3. – С. 378-382.
6. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции. – М.-СПб.: Айсинг. – 2013. – 288 с.
7. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.
8. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. Прохоровой. – Л.: ЛГУ. – 1982. – 272 с.
9. Anstee Q.M., Goldin R.D. Mouse models in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research // Int. J. Exp. Pathol. – 2006. – V. 87, No. 1. – Pp. 1-16.
10. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E., Charlton M., Cusi K., Rinella M., Harrison S.A., Brunt E.M., Sanyal A.J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease:

- Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases // *Hepatology*. – 2018. – V. 67, No. 1. – Pp. 328-357.
11. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease // *J. Hepatol.* – 2016. – V. 64, No. 6. – Pp. 1388-1402.
 12. **Fan J.G., Qiao L.** Commonly used animal models of nonalcoholic steatohepatitis // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* – 2009. – V. 8, No. 3. – Pp. 233-240.
 13. **Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., Tia L.Y., Ding X.D., Li M.S., Wang G.L.** Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – V. 9, No. 9. – Pp. 2045-49.
 14. **Goth L.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // *Clinica Chimica Acta.* – 1991. – V. 196, No. 2-3. – Pp. 143-152.
 15. **Larter C., Yeh M.** Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2008. – V. 23, No. 11. – Pp. 1635-48.
 16. **Lau J.K., Zhang X., Yu J.** Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances // *J. Pathol.* – 2017. – V. 241, No. 1. – Pp. 36-44.
 17. **Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 186. – Pp. 464-478.
 18. **Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., Xu Y., Cao Q., Ren C., Ponomarenko A., DeCarli L.M.** Model of nonalcoholic steatohepatitis // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – V. 79, No. 3. – Pp. 502-509.
 19. **Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R.** Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88, No. 23. – Pp. 10540-43.
 20. **Stephenson K., Kennedy L., Hargrove L., Demieville J., Thomson J., Alpini G., Francis H.** Updates on dietary models of nonalcoholic fatty liver disease: current studies and insights // *Gene Expr.* – 2018. – V. 18, No. 1. – Pp. 5-17.
 21. **Watanabe S., Hashimoto E., Ikejima K., Uto H., Ono M., Sumida Y., Seike M., Takei Y., Takehara T., Tokushige K., Nakajima A., Yone-da M., Saibara T., Shiota G., Sakaida I., Nakamura M., Mizuta T., Tsubouchi H., Sugano K., Shimosegawa T.** Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis // *Hepatol. Res.* – 2015. – V. 45, No. 4. – Pp. 363-377.
 22. **Xu B.L., Wang R., Ma L.N.** Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – S. 759803. – Pp. 1-6.

References

1. **Bivalkevich N.V., Denisenko Yu.K., Novgorodceva T.P.** Metodicheskie podhody k eksperimentalnomu modelirovaniyu nealkogolnoy zhirovoy bolezni pecheni [Methodical approaches to experimental modeling of non-alcoholic fatty liver disease]. RZhGGK [Russian J. of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology]. 2015. No. 4. Pp. 39-45. (In Russian).
2. **Davchenko E.O., Chirkin A.A.** Novye metodicheskie podhody k opredeleniyu koncentracii glikogena v tkanyah i nekotorye kommentarii po interpretacii rezultatov [New methodological approaches to determining the concentration of glycogen in tissues and some comments on the interpretation of results]. Sudebno-medicinskaya ekspertiza [Forensic-medical examination]. 2010. No. 3. Pp. 25-28. (In Russian).
3. **Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov G.E.** Okislitel'naya modifikatsiya belkov sivorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya [Oxidative modification of human serum proteins, method of its determination]. Voprosi med. himii [Questions of medical chemistry]. 1995. V. 41, No. 1. Pp. 24-26. (In Russian).
4. **Ivashkin V.T., Maevskaya M.V., Pavlov Ch.S., Tihonov I.N., Shirokova E.N., Bueverov A.O., Drapkina O.M., Shulpekova Yu.O., Cukanov V.V., Mammaev S.N., Maev I.V., Palgova L.K.** Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu nealkogolnoy zhirovoy bolezni pecheni Rossiyskogo obshchestva po izucheniyu pecheni i Rossiyskoy gastroenterologicheskoy associacii [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease of the Russian Society for the Study of the Liver and the Russian Gastroenterological Association]. RZhGGK [Russian J. of Gastroenterology, Hepatology,

- Coloproctology]. 2016. No. 2. Pp. 24-42. (In Russian).
5. **Karaman Yu.K., Novgorodceva T.P., Gvozdenko T.A.** Modelirovanie nealkogolnogo steatohepatita [Modeling of non-alcoholic steatohepatitis]. Byull. eksper. biol. i med. [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2012. V. 153, No. 3. Pp. 378-382. (In Russian).
 6. **Karkischenko N.N., Uyba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B.** Ocherki sportivnoy farmakologii. T. 1. Vektori erctrapolyacii [Sketches of sports pharmacology. Vol. 1. Vectors of extrapolation]. Moscow - Saint-Petersburg: Aysing. 2013. 288 p. (In Russian).
 7. **Kostyuk V.A., Potapovich A.P., Kovaleva Zh.V.** Prostoy i chuvstvitelnyy metod opredeleniya aktivnosti superoksiddismutasi, osnovanny na reakcii okisleniya kvverticina [A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the reaction of oxidation of quercetin]. Vopr. med. himii [Questions of medical chemistry]. 1990. V. 36, No. 2. Pp. 88-91. (In Russian).
 8. Metodi biohimicheskikh issledovaniy (lipidnyy i energeticheskiy obmen) [Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism)]. Ed. by M. Prohorova. Leningrad: LGU. 1982. 272 p. (In Russian).
 9. **Anstee Q.M., Goldin R.D.** Mouse models in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int. J. Exp. Pathol. 2006. V. 87, No. 1. Pp. 1-16.
 10. **Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E., Charlton M., Cusi K., Rinella M., Harrison S.A., Brunt E.M., Sanyal A.J.** The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2018. V. 67, No. 1. Pp. 328-357.
 11. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. 2016. V. 64, No. 6. Pp. 1388-1402.
 12. **Fan J.G., Qiao L.** Commonly used animal models of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 2009. V. 8, No. 3. Pp. 233-240.
 13. **Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., Tia L.Y., Ding X.D., Li M.S., Wang G.L.** Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. World J. Gastroenterol. 2003. V. 9, No. 9. Pp. 2045-49.
 14. **Goth L.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta. 1991. V. 196, No. 2-3. Pp. 143-152.
 15. **Larter C., Yeh M.** Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. J. Gastroenterol. Hepatol. 2008. V. 23, No. 11. Pp. 1635-48.
 16. **Lau J.K., Zhang X., Yu J.** Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. J. Pathol. 2017. V. 241, No. 1. Pp. 36-44.
 17. **Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990. V. 186. Pp. 464-478.
 18. **Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., Xu Y., Cao Q., Ren C., Ponomarenko A., DeCarli L.M.** Model of nonalcoholic steatohepatitis. Am. J. Clin. Nutr. 2004. V. 79, No. 3. Pp. 502-509.
 19. **Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R.** Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88, No. 23. Pp. 10540-43.
 20. **Stephenson K., Kennedy L., Hargrove L., Demieville J., Thomson J., Alpini G., Francis H.** Updates on dietary models of nonalcoholic fatty liver disease: current studies and insights. Gene Expr. 2018. V. 18, No. 1. Pp. 5-17.
 21. **Watanabe S., Hashimoto E., Ikejima K., Uto H., Ono M., Sumida Y., Seike M., Takei Y., Takehara T., Tokushige K., Nakajima A., Yoneda M., Saibara T., Shiota G., Sakaida I., Nakamura M., Mizuta T., Tsubouchi H., Sugano K., Shimosegawa T.** Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol. Res. 2015. V. 45, No. 4. Pp. 363-377.
 22. **Xu B.L., Wang R., Ma L.N.** Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. Biomed. Res. Int. 2015. S. 759803. Pp. 1-6.

Modeling of non-alcoholic liver steatosis: features of metabolic changes in the body of laboratory animals

S.V. Okovitiy, E.B. Shustov, M.A. Belyh, N.V. Kirillova, O.M. Spasenkova,
A.G. Ivanov, A.V. Karavaeva, A.V. Tkacheva

The article presents an analysis of some changes occurring in laboratory mice after modeling of non-alcoholic fatty liver disease by 6-month feeding them with a high-lipid diet. It has been shown that during this period, metabolism is reorganized in the body for the primary utilization of lipids, accompanied by severe carbohydrate metabolism in the liver and skeletal muscles, activation of lipid peroxidation processes in the induction of catalase activity, and accumulation of the main carbonyl groups of proteins. The revealed restructuring of energy metabolism is supplemented by a two-fold decrease in the physical performance of animals in the test of forced swimming with a load, motor activity and motivational component of the indicative reaction in the «open field» test. The most distinct deterioration of the animals occurs at the end of 3–4 months of modeling of liver steatosis.

Key words: biological modeling, non-alcoholic fatty liver disease, liver steatosis, energy metabolism.

Влияние высокожирового рациона питания на морфофункциональное состояние печени крыс

В.Н. Байматов¹, Н.С. Тропская², Е.А. Кислякова², И.Г. Вилкова²,
О.С. Кислицына², Т.С. Попова²

¹ – ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва

² – ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Контактная информация: д.б.н. Тропская Наталья Сергеевна, ntropskaya@mail.ru

Исследовано влияние высокожирового рациона на морфофункциональное состояние печени. Эксперименты выполнены на 19-ти крысах, которым в течение трех недель внутрижелудочно вводили стандартную питательную смесь (контрольная группа) либо стандартную питательную смесь с добавлением кукурузного масла (опытная группа), что соответствовало дополнению к основному рациону 40%-ной доли жира от общей суточной калорийности. Выявлено, что высокожировая нагрузка приводит к формированию стеатоза и воспалительной инфильтрации печени.

Ключевые слова: высокожировая диета, кукурузное масло, стеатоз, крысы.

Введение

В мире неуклонно растет количество людей с избыточной массой тела и алиментарным ожирением, что обусловлено нарушениями структуры питания и гиподинамией. Одним из факторов, которые приводят к увеличению массы тела, является избыток жиров в пище. Высокожировая нагрузка способствует аккумуляции липидов в гепатоцитах, что является триггерным механизмом развития стеатоза печени и неалкогольного стеатогепатита.

В качестве животных-моделей часто используются крысы и мыши, поскольку у них сравнительно короткий срок беременности, большое по численности потомство, а также дешевое содержание и разведение [2]. Наиболее распространенными лабораторными животными для большинства биомедицинских ис-

следований являются популяция линий крыс Wistar и инбредные линии мышей C57Bl6/J и Balb/c. Животные этих линий отличаются высокой воспроизводимостью результатов с однотипным и стабильным ответом организма на экспериментальные воздействия пищевыми веществами и фармакологическими препаратами.

У грызунов предложена следующая классификация жировых рационов: диета с низким содержанием жира (до 10% от калорийности суточного рациона), диета с высоким содержанием жира (30-50% от суточной калорийности), диета с очень высоким содержанием жира (более 50% от суточной калорийности) [7]. Необходимо отметить, что в рационы включают либо животные, либо растительные жиры, либо их сочетание. Из животных жиров используют сливочное

масло, свиное сало, говяжий жир, а из растительных – подсолнечное, оливковое, пальмовое, кокосовое, кукурузное масла [1, 4, 5, 8].

Высокожировая диета может приводить к различной степени развития стеатоза, воспаления и фиброза, что определяется характером рациона (процентное содержание и состав жиров) и продолжительностью его применения. Так, диета, состоящая из 10% растительного масла, сала и 2% холестерина от общего состава рациона, у крыс в течение 12-ти недель приводит к жировой инфильтрации печени и формированию стеатоза [6]. При кормлении животных эмульсией с очень высоким содержанием растительных жиров (71% от общего рациона) уже на 21-е сут происходит формирование стеатоза и воспалительной инфильтрации печени [9].

В экспериментальных исследованиях жировой компонент добавляют, как правило, к стандартному сухому корму, реже – используют жидкие стандартные диеты. При этом животные получают питание *ad libitum*, что является, на наш взгляд, существенным недостатком, т.к. количество потребляемого корма не стандартизировано в этих условиях.

В конце прошлого века Американский институт питания предложил использовать для изучения всех аспектов нормальных и патологических состояний у животных очищенные ингредиенты для создания стандартного корма с открытой формулой. Например, для грызунов был принят стандартный рацион AIN-формула 76А, где требования по белку покрываются за счет молочного белка казеина с добавлением метионина. Углеводы в этом случае поставляются за счет кукурузного крахмала и сахарозы, кукурузное масло

обеспечивает потребности в жирах, а целлюлоза является источником волокон. Витамины и минеральные вещества добавляются в специальных для грызунов пропорциях. Поскольку формула такого корма «открыта», она может быть доступна для научного сообщества, что делает возможным ее воспроизведение и модификацию с учетом др. питательных компонентов [2, 7]. В качестве стандартной жидкой диеты можно использовать также готовые смеси для энтерального питания. Так, белковый, углеводный и жировой состав изокалорической смеси для энтерального питания «Нутризон» соответствует стандартному рациону, описанному выше. Введение таких смесей через зонд экспериментальным животным обеспечит стандартизацию потребляемых питательных веществ.

Целью настоящего исследования явилось экспериментальное моделирование стеатоза печени путем энтерального зондового введения питательной смеси с добавлением в качестве жирового компонента кукурузного масла.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 19-ти крысах-самцах популяции линий Wistar в возрасте 12-ти мес. массой тела 400-450 г. Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

За 10 дней до экспериментов животным была выполнена предварительная оперативная подготовка, заключающаяся во вживлении зонда в антральный отдел желудка. После фиксации зонд проводили через мягкие ткани брюшной стенки и тазовой области и затем протаскивали

под кожей хвоста и выводили наружу. Брюшную полость ушивали послойно. После чего животные помещались в металлические индивидуальные клетки.

Все животные содержались в лаборатории, в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20-24°C и влажности 45-65%, с режимом освещенности 12/12: 8-20 ч – свет, 20-8 ч – сумеречное освещение.

В экспериментах в качестве стандартной диеты использовали изокалорическую смесь для энтерального питания «Нутризон», содержащую 16% белка, 49% углеводов и 35% жиров.

На протяжении эксперимента в течение 21 дня ежедневно животным контрольной группы (n=9) внутрижелудочно вводили смесь «Нутризон», крысам опытной группы (n=10) также внутрижелудочно ежедневно вводили смесь «Нутризон» с добавлением кукурузного масла, что соответствовало дополнению к основному рациону 40%-ной доли жира от общей суточной калорийности.

В начале эксперимента и по его окончании, перед эвтаназией, у всех животных измеряли массу тела. На 22-й день эксперимента после введения летальной дозы наркоза и вскрытия брюшной полости отбирали печень, почки, надпочечники, селезенку, слепую кишку для определения относительной массы ор-

ганов и проводили взятие образцов из левой боковой доли печени для гистологического анализа. Для этого материал фиксировали 12%-ным нейтральным формалином, делали парафиновые срезы толщиной 7 мкм, окрашивание – гематоксилин-эозином. Срезы просматривали на микроскопе «Биомед-2» (Россия) с применением цифровой фотокамеры с архивацией изображений.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Для каждой группы животных для всех параметров рассчитывали среднее арифметическое значение, стандартное отклонение, медиану, персентили. В связи с тем, что распределения значений не носили нормального характера, данные в окончательном варианте представляли как медиану и персентили – Me (25; 75)%. При сравнении данных значений относительной массы органов опытной группы с контрольной группой использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались значения при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Анализ данных показал, что содержание животных на высокожировом рационе в течение трех недель приводит к изменению относительной массы внутренних органов (табл.). Наблюдалось

Таблица

Относительная масса органов, Me (25; 75)%

Орган	Контрольная группа	Опытная группа
Печень	2,45 (2,26; 2,60)	2,58 (2,49; 2,72)
Почки	0,52 (0,51; 0,52)	0,54 (0,53; 0,57)*
Селезенка	0,22 (0,20; 0,28)	0,30 (0,25; 0,30)
Надпочечники	0,015 (0,014; 0,016)	0,016 (0,014; 0,017)
Слепая кишка	0,67 (0,67; 0,71)	0,58 (0,54; 0,63)

Примечание: * – отличия опытной группы от контрольной статистически значимы, $p < 0,05$.

статистически значимое по сравнению с контролем увеличение относительной массы почек. Относительная масса печени и селезенки статистически значимо не изменялись, однако имелась соответствующая тенденция.

У крыс контрольной группы морфологическая структура гепатоцитов соответствовала норме. Печеночные пластинки начинались от центральной вены, дольки печени располагались веерообразно от центра к периферии.

У крыс опытной группы в печени нарушалось пластинчатое строение,

происходила дезорганизация гепатоцитов. Наблюдалось расширение внутридольковых синусоидных кровеносных капилляров и изменение направленности печеночных пластинок. Гепатоциты были с плохо выраженной цитолеммой, содержали мелкие капли жира разного размера (рис. 1).

Между печеночными пластинками отмечалось увеличение количества макрофагов, которые имели вытянутую или звездчатую форму, лейкоцитов (рис. 2). В центральной вене нередко наблюдали стаз, что, вероятно, приводило

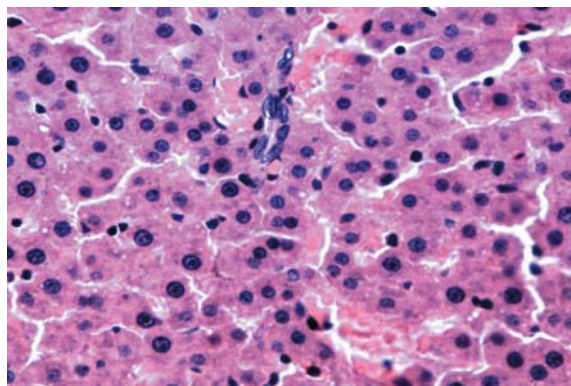


Рис. 1. Гепатоциты с плохо выраженной цитолеммой, содержат мелкие капли жира, разнообразной формы, имеют разное количество ядер. Гематоксилин-эозин. Ув. x10 (окуляр), x40 (объектив).

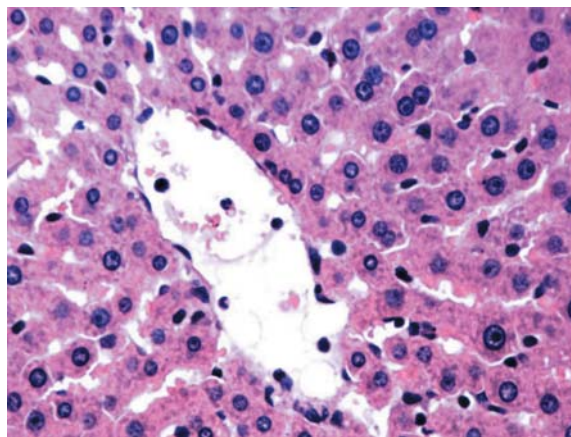


Рис. 2. Пикноз и хроматолиз ядер гепатоцитов, различное их функциональное состояние. Гематоксилин-эозин. Ув. x10 (окуляр), x40 (объектив).

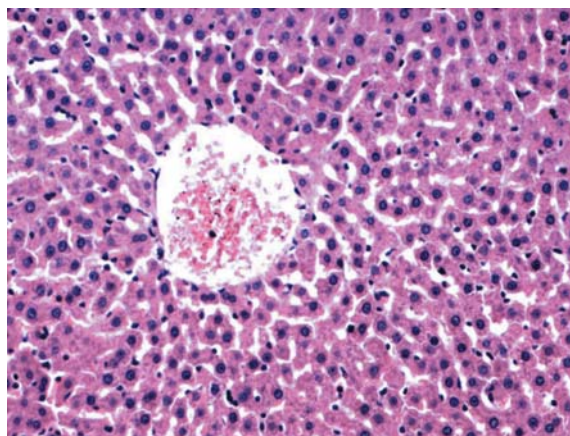


Рис. 3. Расширение внутридольковых синусоидальных кровеносных капилляров и дезорганизация печеночных пластинок. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 8$ (окуляр), $\times 20$ (объектив).

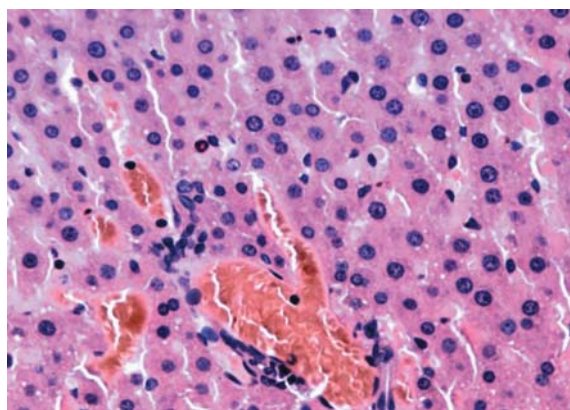


Рис. 4. Микроциркуляторные расстройства в печени крыс опытной группы при мелкокапельной жировой дистрофии. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 10$ (окуляр), $\times 20$ (объектив).

к изменению и увеличению перисинусоидального пространства (рис. 3, 4).

Наряду с дистрофическими изменениями в печеночных дольках происходила и функциональная перестройка. В них наблюдались признаки регенераторной активности, которая выражалась в клеточном полиморфизме. Подтверждением этого являлась и гипертрофия гепатоцитов с появлением полиплоидных двуядерных, и, реже, трехядерных клеток.

Важно отметить, что, в отличие от человека, патологические изменения у крыс сохраняются на протяжении 1-1,5 мес., после чего подвергаются регрессии.

Закключение

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что высокожировая нагрузка способствует развитию деструктивно-дистрофических изменений ткани печени,

морфологически классифицирующихся как стеатоз. Это связано с тем, что макрофаги печени, активно захватывая липиды, не успевают их биотрансформировать. В результате чего увеличивается как количество измененных макрофагов, так и количество жира в печени. Параллельно с вышеописанными изменениями в исследованных органах удалось выявить наличие компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на нивелирование морфофункциональных изменений. Процессы регенерации на данном этапе структурной реорганизации печени осуществляются, по-видимому, гипертрофией гепатоцитов. Увеличение массы почек является важным критерием компенсаторной гипертрофии данного органа в условиях повышения метаболической нагрузки [3], а, возможно, и ватной, для выведения накапливаемых продуктов метаболизма.

Список литературы

1. Байматов В.Н., Козлов В.Н., Иванов С.П. Структурные изменения печени у крыс при коррекции экспериментальных послерадиационных поражений // Морфология. – 2016. – Т. 149, № 3. – С. 27.
2. Лещенко Д.В., Костюк Н.В., Белякова М.Б., Егорова Е.Н., Миняев М.В., Петрова М.Б. Диетически индуцированные животные модели метаболического синдрома (обзор литературы) // Верхневолжский медицинский журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 34-39.
3. Медведев В.И. Адаптация человека. – СПб: ИМЧ РАН, 2003. – 584 с.
4. Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Гвозденко Т.А., Жукова Н.В. Модификация состава жирных кислот печени крыс в условиях высокожирового рациона // Бюллетень СО РАМН. – 2012. – Т. 32, № 2. – С. 9-14.
5. Buettner R., Parhofer K.G., Woenckhaus M., et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types // J. of Molecular Endocrinology. – 2006. – V. 36, No. 3. – Pp. 485-501.
6. Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., et al. Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia // World J. Gastroenterol. – 2003. – No. 9. – Pp. 2045-49.
7. Gadja A.M., Pellizzon M.A., Ricci M.R., Ulman E.A. Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models // Laboratory Equipment. – 2008.
8. Hsu C.L., Wu C.H., Huang S.L., Yen G.C. Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats // J. of Agricultural and Food Chemistry. – 2009. – V. 57, No. 2. – Pp. 425-431.
9. Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis // Am. J. of Clin. Nutr. – 2004. – No. 3(79). – Pp. 502-509.

References

1. Bajmatov V.N., Kozlov V.N., Ivanov S.P. Strukturnye izmeneniya pecheni u krysv pri korrekcii ehksperimental'nyh posleradiacionnyh porazhenij [Structural changes in the liver of rats during correction of experimental post-radiation lesions]. Morphology. 2016. V. 149, No. 3. P. 27. (In Russian).
2. Leshchenko D.V., Kostyuk N.V., Belyakova M.B., Egorova E.N., Minyaev M.V., Petrova M.B. Dieticheski inducirovannye zhivotnye modeli metabolicheskogo sindroma (obzor literatury) [Diet-induced animal models of metabolic syndrome (Literature review)]. Verhnevolzhskij medicinskij zhurnal [Upper Volga Medical Journal]. 2015. V. 14, No. 2. Pp. 34-39. (In Russian).
3. Medvedev V.I. Adaptatsiya cheloveka [Human adaptation]. Saint-Petersburg: IMCh RAN, 2003. 584 p. (In Russian).
4. Novgorodceva T.P., Karaman Yu.K., Gvozdenko T.A., Zhukova N.V. Modifikatsiya sostava zhirnykh kislot pecheni krysv v usloviyakh vysokozhirovogo rationa [Modification of the fatty acids of rat liver in conditions of highfat load]. Byulleten' SO RAMN [The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences]. 2012. V. 32, No. 2. Pp. 9-14. (In Russian).
5. Buettner R., Parhofer K.G., Woenckhaus M., et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. J. of Molecular Endocrinology. 2006. V. 36, No. 3. Pp. 485-501.

6. *Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., et al.* Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J. Gastroenterol.* 2003. No. 9. Pp. 2045-49.
7. *Gadja A.M., Pellizzon M.A., Ricci M.R., Ulman E.A.* Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models. *Laboratory Equipment.* 2008.
8. *Hsu C.L., Wu C.H., Huang S.L., Yen G.C.* Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *J. of Agricultural and Food Chemistry.* 2009. V. 57, No. 2. Pp. 425-431.
9. *Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. of Clin. Nutr.* 2004. No. 3(79). Pp. 502-509.

The effect of high fat diets on the morphofunctional state of the liver of rats

V.N. Baymatov, N.S. Tropskaya, E.A. Kislyakova, I.G. Vilkova,
O.S. Kislitsyna, T.S. Popova

The effect of the high fat diets on the morphofunctional state of the liver was studied. The experiments were performed on 19 rats, which for three weeks were intragastrically injected with standard nutrient mixture (control group) or standard nutrient mixture with corn oil (experimental group), which corresponded to the addition to the basic diet of 40% fat content calorie content. It is revealed that high-fat load leads to the formation of steatosis and inflammatory infiltration of the liver.

Key words: high fat diets, corn oil, steatosis, rats.

Математическое моделирование параметров фармакокинетики ванкомицина: возможности и сравнение с результатами терапевтического лекарственного мониторинга

Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, М.В. Лукина, Т.Б. Андрущишина, М.А. Чукина, И.Л. Царев, О.А. Варганова, Т.Е. Морозова

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Контактная информация: Лукина Мария Владимировна, mari-luk2010@yandex.ru

Цель проспективного обсервационного исследования – сопоставить фармакокинетические параметры ванкомицина, полученные методом терапевтического лекарственного мониторинга и методом математического моделирования у пациентов хирургического профиля с нарушениями функции почек. Обследован 61 пациент (мужчины – 47 чел., женщины – 14) в возрасте $60,59 \pm 12,23$ лет. Участники исследования разделены на две группы: первая – с острым почечным повреждением (66,6%), вторая – без него (33,4%). Равновесные остаточные и пиковые концентрации ванкомицина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Установлено, что значения равновесных остаточных концентраций ванкомицина через 48 ч от начала терапии достоверно ниже значений, полученных при математическом моделировании в группе пациентов с острым почечным повреждением ($p=0,004$). Значения равновесных остаточных концентраций на момент завершения терапии ванкомицином в группах с острым почечным повреждением ($p=0,092$) и без него ($p=0,087$) достоверно не отличаются. Фактические значения площади под фармакокинетической кривой за 24 ч были достоверно выше расчетного уровня в группах с острым почечным повреждением ($p=0,011$) и близки к достоверным в группе без него ($p=0,056$). При достижении равновесных остаточных концентраций на уровне 10–15 мкг/мл отношение площади под фармакокинетической кривой за 24 ч к минимальной подавляющей концентрации достигает целевых значений (более 400 мкг*ч/мл) через 48 ч от начала терапии и на момент завершения антибактериальной терапии. Различия фактических значений параметров фармакокинетики и полученных методом математического моделирования свидетельствуют о необходимости обязательного применения терапевтического лекарственного мониторинга у пациентов с нарушениями функции почек.

Ключевые слова: фармакокинетика ванкомицина, математическое моделирование, терапевтический лекарственный мониторинг, нарушения функции почек.

Введение

Индивидуальный подход к выбору режима дозирования антибактериальных препаратов (АБП) с узким терапевтическим диапазоном реализуется с помощью методики терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) [9]. В настоящее время при назначении АБП с узким терапевтическим диапазоном,

для контроля параметров фармакокинетики (ФК), предусмотрено проведение ТЛМ. Согласно международным рекомендациям, контроль эффективности и безопасности терапии ванкомицином подразумевает оценку равновесных остаточных концентраций (C_{trough}). В некоторых клинических ситуациях рекомендуют расчет площади под фарма-

кокинетической кривой за 24 ч (ПФК_{24}), с последующим определением целевого отношения $\text{ФК}/\text{ФД}$, который выражается как отношение ПФК_{24} к минимальной подавляющей концентрации (МПК) [18].

В качестве альтернативы ТЛМ возможно применение математического моделирования ФК и фармакодинамических (ФД) параметров АБП. Моделирование параметров ФК может быть основой для выбора стартового режима дозирования «проблемных» АБП (ванкомицин, аминогликозиды) [1]. Наиболее известными примерами практического применения математического моделирования параметров $\text{ФК}/\text{ФД}$ являются медицинские калькуляторы. В основе математического моделирования параметров ФК ванкомицина лежит однокомпарментная фармакокинетическая модель [7, 9].

Анализ существующей литературы свидетельствует об ограниченных возможностях применения математических калькуляторов в отдельных группах больных, когда резко изменяется объем распределения, скорость биотрансформации или элиминации лекарственного препарата за короткий промежуток времени. Существующие математические модели не могут предусмотреть динамику изменения концентраций АБП в органах и тканях, связанных с процессом распределения лекарственного вещества между кровью и тканями. Для более точного моделирования параметров ФК в отдельных клинических ситуациях необходима информация о показателях перфузии тканей, проницаемости мембран, связывания препарата в крови и тканях, скорость элиминации [2, 4].

Внедрение в практику математических калькуляторов, которые используют для расчета параметров ФК ванкомицина и коррекции режима дозирования, позволяет снизить потребность в проведении ТЛМ. Другим аргументом в пользу использования математических моделей для расчета целевых параметров $\text{ФК}/\text{ФД}$ зачастую является невозможность получения большого количества образцов крови, необходимых для расчета ПФК_{24} и отношения $\text{ПФК}_{24}/\text{МПК}$ [18]. Ограниченное число исследований по оценке сопоставимости результатов математического моделирования и ТЛМ в отдельных группах пациентов диктует необходимость проведения дополнительных исследований [13].

Цель работы – сопоставить фармакокинетические параметры ванкомицина по данным ТЛМ и методом математического моделирования у пациентов хирургического профиля с острым нарушением функции почек.

Материалы и методы

Проведено проспективное исследование на базе Университетской клинической больницы № 1 ПМГМУ им. И.М. Сеченова в период с сентября 2016 г. по январь 2018 г. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом (№ 05-16 от 18.05.2016).

В проспективное исследование включен 61 пациент с гнойно-септическими осложнениями после оперативного вмешательства. Средний возраст – $60,59 \pm 12,23$), из них мужчин – 47 (77%), женщин – 14 (23%). В послеоперационном периоде пациенты были разделены на две группы в зависимости от острого почечного повреж-

дения (ОПП): группа 1 – пациенты с ОПП (n=35; 66,6%), группа 2 (контрольная) – без ОПП (n=26; 33,4%). ОПП в представленной когорте носило «транзиторный» характер и было обусловлено проведенным оперативным вмешательством. В группе с ОПП преобладали пациенты с легким и умеренным нарушением функции почек: первая стадия ОПП была диагностирована у 19-ти (31,1%) пациентов, вторая стадия – у 13-ти пациентов (21,3%), третья стадия – у трех пациентов (4,9%) [8]. Подробная характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

При сравнении групп между собой достоверно старше были пациенты в группе с ОПП (p=0,004), также обращают внимание более высокие значения альбумина в послеоперационном периоде в группе с ОПП (p=0,047).

Режим назначения ванкомицина

Все пациенты с инфекционными осложнениями получали ванкомицин (международное непатентованное название) в виде препарата Эдицин (ЗАО «Сандоз», Россия). Режим дозирования ванкомицина определяли в соответствии с инструкцией по медицинскому применению (максимальная суточная доза – 2 г).

Таблица 1
Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование (M±σ)

Клиническая характеристика	Всего, n=61	Без ОПП, n=26 (44,8%)	С ОПП, n=35 (55,7%)	p
Возраст, лет	60,59±12,23	55,46±12,89	64,40±10,33	0,004*
ИМТ, кг/м ²	27,40±5,20	27,12±6,10	27,29±4,50	0,726
ФВ ₀ , %	59,02±7,86	62,53±6,74	56,89±7,83	0,018*
КК ₀ , мл/мин	96,48±29,01	96,26±24,76	96,64±32,16	0,960
КК ₁ , мл/мин	61,50±27,20	81,51±23,54	46,64±19,10	<0,0001*
КК ₂ , мл/мин	85,98±32,33	87,37±33,52	84,95±31,86	0,776
Альбумин ₀ (мг/дл)	41,21±4,20	42,46±4,35	40,29±3,97	0,447
Альбумин ₁ (мг/дл)	33,56±1,52	32,21±2,84	44,57±1,61	0,047*
Длительность госпитализации, сут	25,07±15,07	26,77±4,27	23,80±1,17	0,451
Длительность ИВЛ, сут	3,30±1,75	3,00±1,29	3,51±0,89	0,736
Длительность ОРИТ, сут	6,46±1,19	6,5±2,27	6,43±1,23	0,977
Кровопотеря, мл	653,44±604,65	512,10±258,80	758,00±754,66	0,118
Летальность, %	11 (18%)	4 (36,4%%)	7 (63,6%)	0,454

Примечание: ИМТ – индекс массы тела, ФВ₀ – фракция выброса, КК – клиренс креатинина по Кокрофту-Голту; КК₀ – до операции, КК₁ – на 2-3-и сут после операции, КК₂ – на 7-10-е сут после операции, ИВЛ – искусственная вентиляция легких, ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии, * – достоверные различия p_{value} < 0,05.

Расчет параметров фармакокинетики для ванкомицина методом ТЛМ и с использованием математического моделирования на основе однокомпарментной модели

Анализировали следующие фармакокинетические параметры:

K_{el_1} час⁻¹ – константа элиминации через 48 ч от начала терапии;

K_{el_2} час⁻¹ – константа элиминации на момент завершения терапии ванкомицином;

$C_{trough1}$, мкг/мл – равновесная остаточная концентрация через 48 ч от начала терапии;

$C_{trough2}$, мкг/мл – равновесная остаточная концентрация на момент завершения терапии ванкомицином;

C_{peak1} , мкг/мл – равновесная пиковая концентрация через 48 ч от начала терапии;

C_{peak2} , мкг/мл – равновесная пиковая концентрация на момент завершения терапии ванкомицином;

ПФК₁, мкг/ч/мл – площадь под фармакокинетической кривой через 48 ч от начала терапии;

ПФК₂, мкг/ч/мл – площадь под фармакокинетической кривой на момент завершения терапии ванкомицином.

Методика проведения математического моделирования

Математическое моделирование проводили с использованием компьютерной программы R 4.3.0. RFoundation for Statistical Computing [5]. Определяли расчетные значения C_{peak} , C_{trough} и ПФК₂₄ с использованием уравнений «динамики» для однокомпарментной модели по формулам [2]:

$$C_{peak} = \frac{Dose * 1 - e^{-T_{inf} * K_{el}}}{T_{inf} * V_d * K_{el} * (1 - e^{-\tau * K_{el}})}$$

$$C_{trough} = C_{peak} * e^{-K_{el} * (\tau - T_{inf})},$$

где $Dose$ – разовая доза ванкомицина (мг), T_{inf} – продолжительность инфузии (ч), τ – время между инфузиями (ч), K_{el} – предсказанная константа элиминации (ч⁻¹), V_d – кажущийся объем распределения (л/кг):

$$V_d = 0,7 * M,$$

где M – абсолютная масса тела пациента (кг).

Для расчета предсказанной константы элиминации применяли следующее уравнение [11]:

$$K_{el} = 0,00083 * Cl_{Cr} + 0,0044,$$

где Cl_{Cr} – клиренс креатинина (мл/мин) по Кокрофту–Голту:

$$Cl_{Cr} = \frac{[140 - \text{возраст}] * \text{масса тела (кг)} * (10,05 \text{ для жен. или } 10,23 \text{ для муж.})}{\text{креатинин плазмы крови (мкмоль/л)}}.$$

Для расчета ПФК₂₄ применяли «метод трапеции»:

$$ПФК_{24} = \frac{(Lintrap + Logtrap) * 24}{\tau},$$

где $Lintrap$ – площадь под фармакокинетической кривой линейной фазы инфузии:

$$Lintrap = \frac{(C_{trough} + C_{peak}) * T_{inf}}{2},$$

где T_{inf} – продолжительность инфузии (ч).

$Logtrap$ – площадь под «логарифмической» фазой элиминации:

$$Logtrap = \frac{(C_{peak} - C_{trough}) * (\tau - T_{inf})}{\ln \frac{C_{peak}}{C_{trough}}},$$

где τ – время между инфузиями (ч).

Методика проведения фармакокинетического исследования на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

На основании полученных равновесных значений C_{peak} и C_{trough} по данным ВЭЖХ проводили расчет ПФК₂₄ с помощью уравнений динамики как сумму различных фаз («метод трапеций»):

$$ПФК_{24} = \frac{(Lintrap + Logtrap) * 24}{\tau}.$$

Для определения равновесных концентраций C_{peak} (через 60 мин после окончания в/в инфузии) и C_{trough} (за 60 мин перед введением очередной дозы препарата) отбор проб крови проводили через 48 ч от начала (1) и на момент завершения АБТ (2) (табл. 2).

Подготовку образцов проводили путем осаждения белков метанолом. Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260, оснащенном градиентным насосом, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-селективным детектором Agilent 6460 («AgilentTechnologies», США). Хроматографическое разделение проводили на колонке ZorbaxEclipse Plus-C18 2,1*50 мм, 1,8 мкм с предколонкой ZorbaxEclipsePlus C18 12,5*2,1 мм 1,8 мкм («AgilentTechnologies», США).

Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных программ IBMSPSSStatistics 18.0 и R 3.4.0. Данные представлены в виде средних величин (М), среднего квадратичного отклонения (σ). Достоверность различий частот определяли при помощи критерия χ^2 (для таблиц 2*2 – в точном решении Фишера). Достоверность различий среднего арифметического в группах определяли при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Помимо дисперсионного анализа, использовали непараметрические методы, определяли достоверность различия средних рангов между двумя критериями – U-test Mann-Whitney и Wilcoxon. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

В ходе математического моделирования фармакокинетические параметры ванкомицина достоверно не различались в группах с нарушением функции почек и без такового. Параметры ФК по данным ТЛМ также достоверно не различались, за исключением уровня Kel₁ час⁻¹, который был достоверно выше в группе пациентов с ОПП (0,123±0,037 и 0,096±0,037 соответственно; $p = 0,037$).

При последующем сравнении параметров ФК между собой по данным ма-

Таблица 2

Кратность и время забора образцов для исследования

№ пробы	Период взятия пробы	C_{peak} через 60 мин после окончания в/в инфузии	C_{trough} за 60 мин до введения очередной дозы препарата
проба 1	Перед введением 4-5 дозы	1 образец	1 образец
проба 2	7-10 сут с момента начала АБТ	1 образец	1 образец

Таблица 3

Сравнение фармакокинетических параметров ванкомицина, полученных в результате проведения ТЛМ и рассчитанных методом математического моделирования, в группах больных с ОПП и без ОПП

Показатель ФК	Группа	Математическое моделирование	Фактическое значение	U-test Mann-Whitney – Wilcoxon
Kel ₁ , час ⁻¹	ОПП+	0,049±0,017	0,123±0,037	<0,0001
	ОПП-	0,068±0,008	0,096±0,037	0,112
Kel ₂ , час ⁻¹	ОПП+	0,077±0,031	0,095±0,058	0,274
	ОПП-	0,087±0,032	0,097±0,035	0,398
C _{trough1} , мкг/мл	ОПП+	19,74±9,49	11,56±5,08	0,004
	ОПП-	16,58±5,89	15,23±7,10	0,102
C _{trough2} , мкг/мл	ОПП+	15,39±19,39	16,31±9,23	0,092
	ОПП-	12,48±10,35	14,54±6,08	0,087
C _{peak1} , мкг/мл	ОПП+	30,26±18,03	34,83±4,76	0,019
	ОПП-	30,19±7,98	35,64±4,72	0,011
C _{peak2} , мкг/мл	ОПП+	27,79±3,93	36,89±5,94	0,002
	ОПП-	28,08±9,92	37,15±6,14	0,004
ПФК ₁ , мкг/мл*ч	ОПП+	566,89±244,12	493,15±106,51	0,715
	ОПП-	515,45±160,32	566,38±154,71	0,891
ПФК ₂ , мкг/мл*ч	ОПП+	484,75±419,891	607,44±198,11	0,011
	ОПП-	458,93±250,36	577,11±152,29	0,056

тематического моделирования и ТЛМ были получены следующие значения (табл. 3). Фактические значения Kel₁ в группе с ОПП достоверно выше значений Kel₁, рассчитанных методом математического моделирования (p<0,0001).

Фактические значения C_{trough1} достоверно ниже значений, полученных при математическом моделировании в группе пациентов с ОПП (p=0,004). При этом C_{trough2} в группах с ОПП (p=0,092) и без ОПП (p=0,087) достоверно не отличаются. Фактиче-

ские значения ПФК₂₄ были достоверно выше расчетного уровня в группах с ОПП (p=0,011) и близки к достоверным в группе без ОПП (p=0,056). Разброс между рассчитанными и фактическими значениями C_{trough} через 48 ч от начала терапии и на момент завершения АБТ достаточно высок, что также можно объяснить индивидуальными особенностями ФК ванкомицина в представленной группе пациентов (рис. 1).

Значение C_{trough}, в свою очередь, объясняет высокий разброс значений

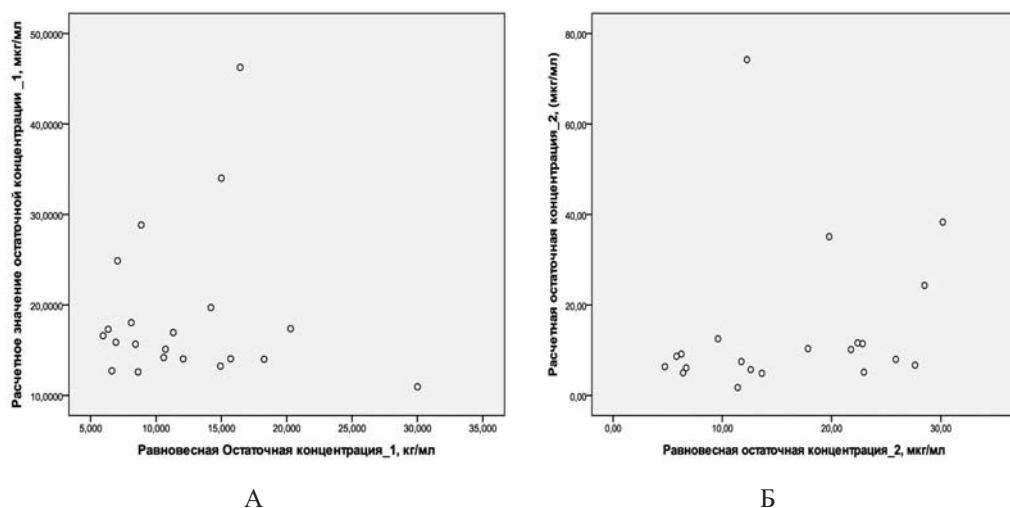


Рис. 1. Разброс значений C_{trough} (мкг/мл) в группе пациентов после хирургического вмешательства с нарушением функции почек – через 48 ч (А) и на момент завершения АБТ (Б).

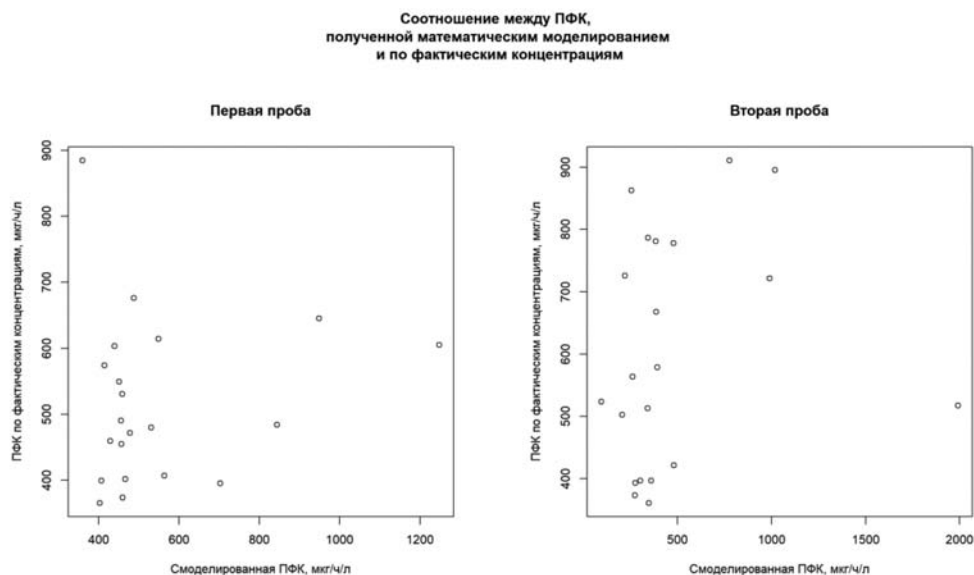


Рис. 2. Разброс значений PK_{24} , рассчитанных на основании математической модели и данных ТЛМ, в когорте хирургических пациентов с нарушениями функции почек.

PK_{24} , рассчитанных на основании математического моделирования и по данным ТЛМ (рис. 2).

При этом в когорте пациентов, у которых значения равновесных C_{trough}

достигали 10-15 мкг/мл, отношение PK_{24}/MPK также достигает целевых значений (>400 мкг/мл*ч) как через 48 ч от начала терапии (рис. 3), так и на момент завершения АБТ (рис. 4).

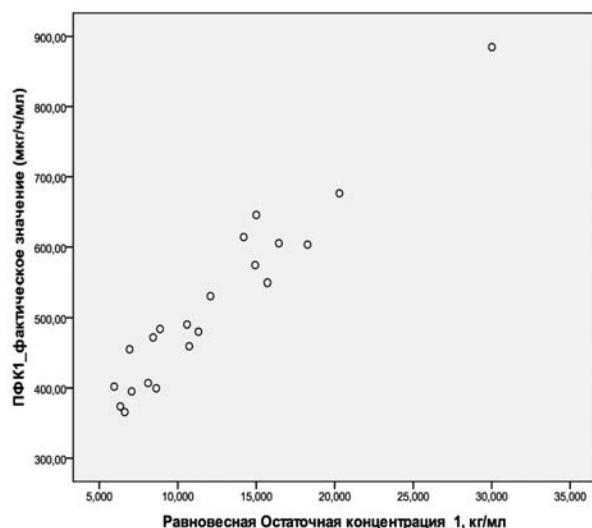


Рис. 3. Зависимость значения ПФК₂₄ от уровня C_{trough1} через 48 ч от начала антибактериальной терапии.

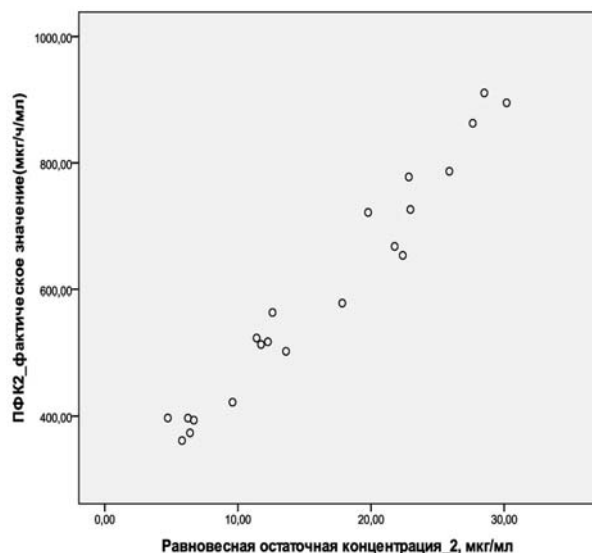


Рис. 4. Зависимость значения ПФК₂₄ от уровня C_{trough2} на момент завершения антибактериальной терапии.

Обсуждение результатов

В ходе исследования было продемонстрировано, что при стандартном подходе к дозированию не удастся достичь целевых значений C_{trough1} ($12,84 \pm 5,97$ мкг/мл).

При этом предсказанные значения C_{trough1} ($18,68 \pm 8,44$ мкг/мл), рассчитанные с помощью математического моделирования на основании стандартного режима дозирования, достигают целевого уровня

ня – 15-20 мкг/мл. Однако, несмотря на высокий процент недостижения целевых значений C_{trough} по данным ТЛМ, показатель ПФК₂₄/МПК превышал целевое значение – более 400 мкг/мл*ч, при МПК=1.

Ряд исследований в отдельных популяциях демонстрируют высокую вариабельность параметров ФК. При этом целевых значений C_{trough} (15-20 мкг/мл) и отношения ПФК₂₄/МПК (>400 мкг/мл*ч) не достигали в среднем 30-33% исследуемой популяции [10]. Другой проблемой является решение вопроса о необходимости достигать столь высоких значений C_{trough} , для того, чтобы обеспечить соотношение ПФК₂₄/МПК на уровне или выше 400 мкг/мл*ч. В исследовании Patel N. и соавт. [16] пришли к выводу, что нет необходимости достигать столь высокого значения C_{trough} (15-20 мкг/мл), особенно если локальные значения МПК равны или менее 1 мг/л. В исследовании Neely M.N. и соавт. [14] около 60% пациентов достигали целевого значения ПФК₂₄/МПК (>400 мкг/мл*ч), при этом C_{trough} были значительно ниже 15 мкг/мл. По данным ретроспективного исследования Bel K.A. и др. [3] была обнаружена слабая корреляция между равновесными C_{trough} и расчетными показателями ПФК₂₄/МПК. При этом более 30% пациентов достигали целевого ФД значения ПФК/МПК даже при C_{trough} ниже 15 мкг/л. По данным регрессионного анализа даже значение C_{trough} на уровне 10,8 мкг/мл являлось предиктором достижения целевого значения ПФК/МПК (>400 мкг/мл*ч).

В исследовании Pai M.P. и соавт. [15] изменение режимов дозирования на основе математического моделирования

для достижения целевых C_{trough} всё равно ассоциировалось с высокой вариабельностью значений ПФК₂₄ и соотношения ПФК₂₄/МПК= 400 мкг/мл*ч.

Ряд авторов также отмечают в своих исследованиях, что метод применения стандартных номограмм или математического моделирования для предсказания параметров ФК имеет множество ограничений. Это связано с тем, что исходно большинство этих методов были валидированы для ограниченной популяции пациентов и ориентировались на целевые значения равновесных C_{trough} в пределах 5-10 мкг/л. В настоящее время диапазон целевых концентраций значительно вырос, до 15-20 мкг/мл [17]. На современном этапе ни один из этих методов не смог заменить ТЛМ. Вероятно, это может быть связано с рядом недостатков большинства математических моделей, поскольку в них используется расчёт V_d и K_{el} . При этом за V_d принимается средняя величина 0,7 л/кг, а для расчета K_{el} используют значение клиренса креатина (Cl_{cr}) по Кокрофту-Голту, что также может влиять на точность предсказанных параметров ФК для АБП, элиминирующихся через почки [12]. Результаты этих исследований, в свою очередь, могут объяснить высокий разброс параметров ФК по данным ТЛМ с результатами математического моделирования в группе пациентов хирургического профиля с нарушением функции почек.

Закключение

Таким образом, данные проведенного исследования свидетельствуют о высокой вариабельности параметров

ФК ванкомицина, полученных различными методами, особенно – в группе пациентов с нарушениями функции почек. Различия фактических значений параметров ФК и полученных методом математического моделирования свидетельствуют о необходимости обязательного применения ТЛМ в данной группе пациентов.

Список литературы

1. **Бондарева И.Б.** Программное обеспечение для анализа данных ФК/ФД исследований // Клиническая фармакокинетика. 2005. № 2(3). С. 9-13.
2. **Bauer L.A.** Chapter 5. Vancomycin. In: Bauer L.A., ed. Applied Clinical Pharmacokinetics, 2nd. New-York: McGraw-Hill. 2008.
3. **Bel K.A., Bourguignon L., Marcos M., Ducher M., Goutelle S.** Is trough concentration of vancomycin predictive of the area under the curve? A clinical study in elderly patients // Ther. Drug Monit. 2017; 39(1): 83-7.
4. **Burton M.E., Gentle D.L., Vasko M.R.** Evaluation of a Bayesian method for predicting vancomycin dosing // DICP, 1989; 4: 294-300.
5. **Core T.** A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017.
6. **DeRyke C.A., Alexander D.P.** Optimizing Vancomycin Dosing Through Pharmacodynamic Assessment Targeting Area Under the Concentration-Time Curve/Minimum Inhibitory Concentration // Hospital Pharmacy, 44(9): 751-765.
7. **Eyob D.A., Herald M., Koura F.** Pharmacokinetics of Vancomycin in Extremely Obese Patients with Suspected or Confirmed Staphylococcus aureus Infections // PHARMACOTHERAPY. 2015. V. 35, No. 2. Pp. 127-139.
8. **KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury.** Kidney International. 2012. V. 2. Issue 1.
9. **Lake K.D., Peterson C.D.** A simplified dosing method for initiating vancomycin therapy // Pharmacotherapy: J. of Human Pharmacology and Drug Therapy. 1985. V. 5, No. 6. Pp. 340-344.
10. **del Mar Fernández de Gatta García M., Revilla N., Calvo M.-V., Domínguez-Gil A., Navar-**

ro A.S. Pharmacokinetic / pharmacodynamic analysis of vancomycin in ICU patients // Intensive Care Med., 2007; 33: 279-285.

11. **Matzke G.R., McGory R.W., Halstenson C.E., Keane W.F.** Pharmacokinetics of vancomycin in patients with various degrees of renal function // Antimicrob Agents Chemother. 1984; 25(4): 433-437.
12. **Moise-Broder P.A., Forrest A., Birmingham M.C., et al.** Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with Staphylococcus aureus lower respiratory tract infections // Clin. Pharmacokinet., 2004; 43: 925-942.
13. **Murphy J.E., Gillespie D.E., Bateman C.V.** Predictability of vancomycin trough concentrations using seven approaches for estimating pharmacokinetic parameters // Am. J. Health Syst. Pharm., 2006; 63: 2365-70.
14. **Neely M.N., Youn G., Jones B., Jelliffe R.W., Drusano G.L., Rodvold K.A., et al.** Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? // Antimicrob Agents Chemother., 2014; 58(1): 309-316.
15. **Pai M.P., Neely M., Rodvold K.A., Lodise T.P.** Innovative approaches to optimizing the delivery of vancomycin in individual patients // Advanced drug delivery reviews, 2014; 77: 50-57.
16. **Patel N., Pai M.P., Rodvold K.A., Lomaestro B., Drusano G.L., Lodise T.P.** Vancomycin: we can't get there from here // Clinical infectious diseases, 2011; 52(8): 969-974.
17. **Prybylski J.P.** Vancomycin trough concentration as a predictor of clinical outcomes in patients with Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis of observational studies // Pharmacotherapy: J. of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2015; 35(10): 889-898.
18. **Rybak M., et al.** Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists // Am. J. of Health-System Pharmacy, 2009; 66(1): 82-98.

References

1. **Bondareva I.B.** Programmnoe obespechenie dlya analiza dannyh FK/FD issledovanij [Software for data analysis of PK/PD studies].

- Klinicheskaya farmakokinetika [Clinical Pharmacokinetics]. 2005. No. 2(3). Pp. 9-13. (In Russian).
2. **Bauer L.A.** Chapter 5. Vancomycin. In: Bauer L.A., ed. Applied Clinical Pharmacokinetics, 2nd. New-York: McGraw-Hill. 2008.
3. **Bel K.A., Bourguignon L., Marcos M., Ducher M., Goutelle S.** Is trough concentration of vancomycin predictive of the area under the curve? A clinical study in elderly patients. *Ther. Drug Monit.* 2017; 39(1): 83-7.
4. **Burton M.E., Gentle D.L., Vasko M.R.** Evaluation of a Bayesian method for predicting vancomycin dosing. *DICP*, 1989; 4: 294-300.
5. **Core T.** A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017.
6. **DeRyke C.A., Alexander D.P.** Optimizing Vancomycin Dosing Through Pharmacodynamic Assessment Targeting Area Under the Concentration-Time Curve/Minimum Inhibitory Concentration. *Hospital Pharmacy*, 44(9): 751-765.
7. **Eyob D.A., Herald M., Koura F.** Pharmacokinetics of Vancomycin in Extremely Obese Patients with Suspected or Confirmed Staphylococcus aureus Infections. *PHARMACOTHERAPY*. 2015. V. 35, No. 2. Pp. 127-139.
8. KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International*. 2012. V. 2. Issue 1.
9. **Lake K.D., Peterson C.D.** A simplified dosing method for initiating vancomycin therapy. *Pharmacotherapy: J. of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1985. V. 5, No. 6. Pp. 340-344.
10. **del Mar Fernández de Gatta García M., Revilla N., Calvo M.-V., Domínguez-Gil A., Navarro A.S.** Pharmacokinetic / pharmacodynamic analysis of vancomycin in ICU patients. *Intensive Care Med.*, 2007; 33: 279-285.
11. **Matzke G.R., McGory R.W., Halstenson C.E., Keane W.F.** Pharmacokinetics of vancomycin in patients with various degrees of renal function. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25(4): 433-437.
12. **Moise-Broder P.A., Forrest A., Birmingham M.C., et al.** Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with Staphylococcus aureus lower respiratory tract infections. *Clin. Pharmacokinet.*, 2004; 43: 925-942.
13. **Murphy J.E., Gillespie D.E., Bateman C.V.** Predictability of vancomycin trough concentrations using seven approaches for estimating pharmacokinetic parameters. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2006; 63: 2365-70.
14. **Neely M.N., Youn G., Jones B., Jelliffe R.W., Drusano G.L., Rodvold K.A., et al.** Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? *Antimicrob Agents Chemother.*, 2014; 58(1): 309-316.
15. **Pai M.P., Neely M., Rodvold K.A., Lodise T.P.** Innovative approaches to optimizing the delivery of vancomycin in individual patients. *Advanced drug delivery reviews*, 2014; 77: 50-57.
16. **Patel N., Pai M.P., Rodvold K.A., Lomaestro B., Drusano G.L., Lodise T.P.** Vancomycin: we can't get there from here. *Clinical infectious diseases*, 2011; 52(8): 969-974.
17. **Prybylski J.P.** Vancomycin trough concentration as a predictor of clinical outcomes in patients with Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis of observational studies. *Pharmacotherapy: J. of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 2015; 35(10): 889-898.
18. **Rybak M., et al.** Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am. J. of Health-System Pharmacy*, 2009; 66(1): 82-98.

Mathematical modeling of vancomycin pharmacokinetics parameters: opportunities and comparison with the results of therapeutic drug monitoring

G.V. Ramenskaya, I.E. Shokhin, M.V. Lukina, T.B. Andrushchyshina, M.A. Chukina, I.L. Tsarev, O.A. Vartanova, T.E. Morozova

The purpose of a prospective observational study is to compare the pharmacokinetic parameters of vancomycin, obtained by therapeutic drug monitoring and mathematical modeling of surgical patients with renal dysfunction. A total of 61 patients (men – 47 people, women – 14) aged 60.59 ± 12.23 years were examined. The study participants were divided into two groups: the first with acute renal damage (66.6%), the second without it (33.4%). Equilibrium residual and peak concentrations of vancomycin were determined by high performance liquid chromatography.

It was established that the values of the equilibrium residual concentrations of vancomycin after 48 hours from the start of therapy were significantly lower than the values obtained by mathematical modeling in the group of patients with acute renal damage ($p=0.004$). The values of the equilibrium residual concentrations at the time of completion of vancomycin therapy in groups with acute renal damage ($p=0.092$) and without it ($p=0.087$) do not differ significantly. The actual values of the area under the pharmacokinetic curve for 24 hours were significantly higher than the calculated level in the groups with acute renal damage ($p=0.011$) and close to reliable in the group without it ($p=0.056$). When equilibrium residual concentrations of 10-15 $\mu\text{g/ml}$ are reached, the ratio of the area under the pharmacokinetic curve for 24 hours to the minimum inhibitory concentration reaches target values (more than 400 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$) after 48 hours from the start of therapy and at the time of completion of antibiotic therapy. Differences in the actual values of pharmacokinetic parameters and those obtained by the method of mathematical modeling indicate the need for mandatory use of therapeutic drug monitoring in patients with renal dysfunction.

Key words: vancomycin pharmacokinetics, mathematical modeling, therapeutic drug monitoring, renal dysfunction.



Вариабельность сердечного ритма у пациентов с вегетососудистой дистонией головного мозга

Н.Н. Каркищенко¹, Д.Б. Чайванов^{2,3}, Ю.А. Чудина^{2,3}, А.А. Николаев^{2,3}

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

³ – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, chaivanov@ya.ru

Настоящее экспериментальное исследование посвящено изучению показателей variability сердечного ритма у пациентов с вегетососудистой дистонией головного мозга. Динамические изменения сердечной деятельности у пациентов с вегетососудистой дистонией головного мозга отличаются от нормы по некоторым показателям. Было показано, что у пациентов с нарушениями мозгового кровообращения вследствие вегетососудистой дистонии головного мозга длина кардиоинтервалов, все частотные составляющие variability сердечного ритма, суммарная мощность спектра и вариационный размах увеличиваются на фоне уменьшения частоты сердечных сокращений, показателя вегетативного баланса, амплитуды моды и индекса напряжения регуляторных систем.

Ключевые слова: variability сердечного ритма, вегетососудистая дистония, головной мозг.

Введение

Понятие вегетососудистой дистонии (ВСД) было широко распространено несколько десятилетий назад, затем его стали рассматривать не как самостоятельное заболевание, а как синдром ВСД [2]. Системное проявление синдрома ВСД было обозначено новым термином – нейроциркуляторная дистония [10].

В настоящее время термин ВСД снова используется во врачебной практике для обозначения функционального расстройства, связанного с понижением активности кровеносных сосудов, кото-

рые снабжают кровью различные ткани организма и его систем. Причиной данного функционального расстройства является нарушение вегетативной нервной регуляции. ВСД является одним из самых распространенных проявлений патологии сердечно-сосудистой системы среди населения развитых стран, данная патология выявляется в 30-50% случаев среди общего числа такого рода заболеваний [7].

ВСД имеет функциональную природу и является патологией психогенного и неврологического происхождения, возникающей вследствие нарушения

нервной регуляции сосудистого тонуса. ВСД проявляется в виде разнонаправленных изменений тонуса сосудов, что приводит к функциональным изменениям многих органов и систем. Так, например, при ВСД по гипотоническому типу наблюдается существенное преобладание влияния парасимпатической системы на регуляцию сосудов, что является причиной их сниженного тонуса. Причинами данной патологии считают генетическую предрасположенность и особенности реагирования на изменения условий окружающей среды, определяющие созревание организма и его систем в пубертатный период, а также стрессовые воздействия, не способствующие адаптации [3].

ВСД характеризуется различными дисфункциями, в частности, проявляющимися в нарушении микроциркуляции крови в сосудистой системе. У пациентов, страдающих этим синдромом, наблюдаются нарушения устойчивого состояния внутренней среды организма (гомеостаза), прогрессирование которого может приводить к дистрофическим изменениям сердца, легких, желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата [10]. Такие пациенты жалуются на общую слабость, снижение умственной и физической работоспособности, повышение реактивности сердечно-сосудистой системы, снижение общего и мышечного тонуса, нарушение биоритмов.

Вегетососудистая дистония головного мозга (ВСДГМ) – это заболевание, которое характеризуется патологическим изменением сосудов и артерий, снабжающих кислородом ткани головного мозга. Следствием данной патологии является ухудшение зрения и коор-

динации движений, эмоциональные и психические расстройства, ухудшение и нарушение высших психических функций. Причиной перечисленных патологических состояний является кислородное голодание клеток головного мозга, развивающееся в результате нарушения мозгового кровообращения и спазмов сосудов головы, приводящее к необратимым изменениям ткани головного мозга вследствие гибели его нервных клеток (резидуальная энцефалопатия у взрослых). Нарушение мозгового кровообращения и спазмы сосудов сопровождаются сильными мигренозными болями, головокружением, потерей ориентации в пространстве, снижением концентрации внимания, эпилептическими припадками и т.п.

В целом ВСДГМ может стать причиной не только ухудшения работоспособности любого специалиста, но и полной потери им трудоспособности, в особенности это относится к профессиям, требующим напряжения высших психических функций (внимания, восприятия, памяти). Следовательно, диагностика ВСДГМ является актуальной на сегодняшний день задачей, решение которой позволит, в частности, оптимизировать систему профотбора персонала в профессиональных областях, сопряженных с использованием высших психических функций для принятия решений в ограниченных временных рамках, в состоянии стресса и экстремальных условиях.

В настоящее время для диагностики ВСДГМ применяются в основном сложные медицинские методы: эхоэнцефалография (ЭхоЭГ), магнитно-резонансная томография (МРТ), компьютерная томография (КТ).

ЭхоЭГ – неинвазивный метод исследования головного мозга с помощью ультразвуковой эхографии, позволяющий определить наличие различных органических патологических изменений в ткани мозга (абсцессы, кисты, гематомы, инородные тела, переломы костей черепа и т.п.). В основе метода эхоЭГ лежит применение ультразвука частотой от 0,5 до 15 МГц/с, который проникает сквозь ткани организма и отражается от поверхностей на границе тканей разной плотности и состава. ЭхоЭГ при ВСДГМ показывает состояние сосудов и их возможные патологические изменения.

МРТ является довольно эффективным методом визуализации мягкотканых образований мозга, в т.ч. его сосудистых элементов, состояние которых оценивается при ВСДГМ. Метод МРТ основан на воздействии магнитного поля, которое вызывает в исследуемом органе радиочастотный резонансный радиосигнал, фиксируемый приемником, который выдает изображение исследуемого объекта. Качество изображения возрастает по мере увеличения мощности магнитов. Создание сильного магнитного поля требует значительных энергозатрат, что делает этот метод относительно дорогостоящим. Магнитное поле не оказывает повреждающего воздействия на живые ткани, но оно способно изменять активность различных областей мозга, связанных с движением глаз, поддержанием равновесия, мышечным контролем и двигательной регуляцией [13], что может изменять общее состояние пациента во время процедуры обследования.

КТ – это усовершенствованный метод рентгенографии, позволяющий

получить срезы в трансверсальной плоскости с изображений – например, сосудов. Основным недостатком метода КТ является неблагоприятное влияние на организм ионизирующего излучения, которое способствует развитию онкологических заболеваний как у детей [12], так и у взрослых [14, 15].

Преимуществом всех перечисленных методов является возможность визуализации структурных изменений сосудов мозга, снимок которых получен в момент обследования, но они не позволяют осуществить диагностику функциональных изменений, которая может быть осуществлена, например, с помощью методов диагностики состояния сердечно-сосудистой системы, среди которых хорошо зарекомендовал себя метод variability сердечного ритма (VCP) [1, 4, 8, 11].

Цель настоящей работы – изучение показателей VCP у пациентов с ВСДГМ по сравнению с нормой.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие две группы испытуемых: экспериментальная и контрольная. Экспериментальная группа (ЭГ) состояла из пациентов, у которых диагностировали ВСДГМ. Контрольная группа (КГ) включала людей, практически здоровых, без каких-либо сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения. В состав каждой группы входили и мужчины, и женщины в возрасте 19-57 лет. ЭГ состояла из 14-ти человек (средний возраст – 29 лет), в КГ было 16 человек (средний возраст – 22 года). Испытуемые обеих групп участвовали в одной

и той же процедуре тестирования: им предъявляли на экране компьютера зрительные стимулы, сопровождающиеся звуковыми сигналами. Во время стимуляции у испытуемых производили запись электрокардиограммы (ЭКГ).

В результате записи для каждого испытуемого по данным ЭКГ была подсчитана частота сердечных сокращений (ЧСС), длина кардиоинтервала (RR). В ходе обработки получили показатели variability сердечного ритма отдельно для каждой группы испытуемых. Вычислили следующие показатели variability сердечного ритма: высокочастотная составляющая (HF), низкочастотная составляющая (LF), сверхнизкочастотная составляющая (VLF), вегетативный баланс (LF/HF), индекс центрации (ИЦ), индекс активации

подкорковых центров (ИАП), суммарная мощность спектра (TP), амплитуда моды (АМо), индекс напряжения регуляторных систем (ИН), вариационный размах (BP), тип вегетативного реагирования (тип BP).

Значимость различий (p) между группами испытуемых по показателям variability сердечного ритма определяли на основе непараметрического критерия Манна-Уитни (U).

Результаты и их обсуждение

Для каждой из двух групп вычислили средние значения показателей variability сердечного ритма (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что исследуемые группы практически не различаются по следующим показателям: процентное выражение частотных составляющих, индекс центрации и индекс активации

Таблица 1

Усредненные значения показателей variability сердечного ритма, представленные для экспериментальной и контрольной группы испытуемых

Показатель	ЭГ	КГ
RR	0,911	0,772
ЧСС	68	79
HF	3064,2	835,2
HF(%)	49	49
LF	2447,9	770,2
LF(%)	46	45
VLF	1114,4	373,9
LF/HF	1,3	1,6
ИЦ	2,4	2,6
ИАП	0,8	0,8
TP	7179	2091
АМо	30,9	44,3
ИН	61,97	150,86
BP	0,350	0,214

подкорковых центров. Различия обнаруживаются по всем остальным показателям: длина кардиоинтервалов, частота сердечных сокращений, частотные составляющие variability сердечного ритма, показатели вегетативного баланса, суммарная мощность спектра, амплитуда моды, индекс напряжения регуляторных систем и вариационный размах.

Из полученных данных, представленных в табл. 1, видно, что для ЭГ характерно увеличение длины кардиоинтервалов, всех частотных составляющих variability, суммарной мощности спектра и вариационного размаха по сравнению со значениями тех же показателей для КГ. При этом по сравнению с нормой отмечается снижение значений ЧСС, показателя вегета-

тивного баланса, который определяли как отношение низкочастотной к высокочастотной составляющей, амплитуды моды и индекса напряжения регуляторных систем.

Сравнительный анализ на основе непараметрической статистики Манна-Уитни позволил определить параметры variability сердечного ритма, по которым различия ЭГ от КГ являются значимыми. Результаты сравнительного анализа представлены в табл. 2. Оказалось, что только по 10-ти показателям variability сердечного ритма из 15-ти были получены значимые различия ($p < 0,05$).

Далее будут проанализированы только значимые показатели, среди них: RR, ЧСС, HF, LF, VLF, TP, АМо, ИН, BP и тип BP.

Таблица 2

Сравнительный анализ ЭГ и КГ испытуемых на основе непараметрической статистики Манна-Уитни для показателей variability сердечного ритма: средние ранги, значения критерия Манна-Уитни (U), его статистическая значимость (p)

	ЭГ	КГ		
Показатели	Ср. ранг	Ср. ранг	U	p
RR	19,07	9,93	34,0	0,003
ЧСС	10,11	18,89	36,5	0,005
HF	19,14	9,86	33,0	0,003
HF%	14,64	14,36	96,0	0,927
LF	18,93	10,07	36,0	0,004
LF%	14,71	14,29	95,0	0,890
VLF	19,00	10,00	35,0	0,004
LF/HF	14,21	14,79	94,0	0,854
ИЦ	14,29	14,71	95,0	0,890
ИАП	13,25	15,75	80,5	0,419
TP	20,43	8,57	15,0	0,000
АМо	8,96	20,04	20,5	0,000
ИН	8,79	20,21	18,0	0,000
BP	19,21	9,79	32,0	0,002
тип BP	14,14	14,86	93,0	0,807

Примечание: цветом выделены значимые различия при $p < 0,05$.

ЧСС в ЭГ значимо выше, чем в КГ, а для RR наблюдается противоположная зависимость [5, 8]. Низкая ЧСС указывает на преобладание в экспериментальной группе гипотоников.

Значимые различия обнаружены также для всех частотных показателей variability сердечного ритма. Высокочастотная, низкочастотная и сверхнизкочастотная составляющие в ЭГ значительно выше, чем в КГ, что указывает на увеличение роли вегетативной нервной системы в регуляции сосудистого тонуса при ВСДГМ по сравнению с нормой.

Группы значимо различаются общей мощностью спектра (TP), амплитудой моды, вариационным размахом и индексом напряжения регуляторных систем. Значения TP для обеих групп превышают 400 мс^2 , что указывает на нормальное или пониженное давление у испытуемых [8, 11].

Вариационный размах и амплитуда моды характеризуют variability: чем больше ВР и меньше АМо, тем ниже variability сердечного ритма. Из полученных данных видно, что ВР и АМо у пациентов ЭГ отличаются от нормы в сторону снижения variability. Это является, в частности, косвенным признаком причины патологии. В случае ВСДГМ variability снижена в результате нарушения нейрогуморальной регуляции просвета сосудов [6].

Индекс напряжения регуляторных систем в ЭГ значительно меньше по сравнению с КГ. Снижение индекса напряжения у пациентов с ВСДГМ отражает снижение у них тонуса симпатической нервной системы на фоне преобладания парасимпатической регуляции (HF выше, чем LF).

В целом можно говорить, что ЭГ достоверно отличается от КГ набором показателей variability сердечного ритма с разнонаправленными их изменениями, что может быть связано с характером патологии, изменениями сердечно-сосудистой системы в результате активации определенных компенсаторных механизмов.

Пациенты с ВСДГМ характеризуются усилением вегетативного влияния на сердечно-сосудистую деятельность, что делает их более чувствительными к внешним воздействиям и менее приспособленными к их резким изменениям, даже мешает своевременно реагировать на внешние изменения и адаптироваться к ним. Это, в частности, проявляется в некотором преобладании парасимпатической регуляции над симпатической, на фоне общей повышенной активации обоих отделов вегетативной нервной системы по сравнению с нормой, что снижает эффективность и скорость приспособления к быстрым изменениям внешних условий. Пациенты с ВСДГМ характеризуются нарушениями на уровне микроциркуляторного русла [9, 10], что является причиной патологии мозгового кровообращения. Возможно, снижение усиленного влияния вегетативной нервной системы на сердечно-сосудистую деятельность и, в первую очередь, на сосуды, будет способствовать улучшению общего состояния пациентов с данным синдромом.

Выводы

По результатам проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

Во-первых, совокупность изменений значений определенного набора

показателей variability сердечного ритма может использоваться как признак сосудистой патологии, связанной с нарушениями мозгового кровообращения, вызванного вегетососудистой дистонией головного мозга.

Во-вторых, основанием для дифференциации патологического состояния – вегетососудистой дистонии головного мозга от нормы является совокупность следующих показателей: частота сердечных сокращений, длина кардиоинтервала, высокочастотная, низкочастотная и сверхнизкочастотная составляющая сердечного ритма, суммарная мощность спектра, амплитуда моды, индекс напряжения регуляторных систем, вариационный размах, тип вегетативного реагирования.

В-третьих, пациенты с вегетососудистой дистонией головного мозга отличаются от нормы снижением значений частоты сердечных сокращений (на 14%), индекса напряжения регуляторных систем (на 59%) и вариационного размаха (на 64%) и повышением значений показателей длины кардиоинтервала (на 18%), высокочастотной составляющей (на 267%), низкочастотной составляющей (на 218%), сверхнизкочастотной составляющей сердечного ритма (на 198%), суммарной мощности спектра (на 243%), амплитуды моды (на 30%).

Список литературы

1. Анализ variability сердечного ритма при использовании различных кардиографических систем (метод. реком.) // Вестник аритмологии. – 2001. – № 24. – С. 65-87.
2. Вегетативные расстройства: клиника, лечение, диагностика / Под ред. А.М. Вейна. – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 752 с.
3. Вейн А.М. Заболевания вегетативной нервной системы: рук-во для врачей. – М.: Медицина, 2003. – 620 с.
4. Гавеский Ю.Г., Рафф С.А. Показатели суточной variability сердечного ритма больных ишемической болезнью сердца гипертонической болезнью и нейроциркуляторной дистонией: новый подход в бальной оценке отклонений от нормы показателей больных и здоровых // Вестник аритмологии. – 2004. – № 35. – С. 16.
5. Кильдебекоева Р.Н., Гайсина Э.В., Нигматуллин И.М. Влияние мануальной терапии на электрическую деятельность сердца больных остеохондрозом шейного отдела позвоночника по результатам холтеровского мониторирования // Вестник аритмологии. – 2002. – № 28. – С. 5.
6. Коваленко В.Н., Несукай Е.Г., Дмитриченко Е.В. Variability ритма сердца как показатель функции вегетативной нервной системы у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Український кардіологічний журнал. – 2006. – № 3. – С. 68-71.
7. Маколкин В.И., Овчаренко С.И., Семенов И.И. Внутренние болезни: учеб. для мед. училищ. – М.: Медицина, 1998. – 430 с.
8. Михайлов В.М. Variability ритма сердца. Опыт практического применения метода. – Иваново, 2000. – 200 с.
9. Покалев Г.М. Нейроциркуляторная дистония. – М., 1997. – 76 с.
10. Частная патология: уч. пособ. для студ. ВУЗов / Под ред. С.Н. Попова. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 256 с.
11. Яблучанский Н.И., Мартыненко А.В. Variability сердечного ритма. В помощь практикующему врачу. Для настоящих врачей. – Харьков, 2010. – 131 с.
12. Miglioretti D.L., Johnson E., Williams A., Greenlee R.T., Weinmann S., Solberg L.I., Feigelson H.S., Roblin D., Flynn M.J., Vanneman N., Smith-Bindman R. The use of computed tomography in pediatrics and the associated radiation exposure and estimated cancer risk // JAMA Pediatr. – 2013. – No. 167(8). – Pp. 700-7.
13. Roberts D.C., Marcelli V., Gillen J.S., Carney J.P., Santina Ch.C.D., Zee D.S. MRI Magnetic Field Stimulates Rotational Sensors of the Brain // Current Biology. – 2011. – V. 21, Issue 19. – Pp. 1635-40.

14. **Smith-Bindman R.** Environmental causes of breast cancer and radiation from medical imaging: findings from the Institute of Medicine report // Arch. Intern. Med. – 2012. – No. 172(13). – Pp. 1023-7.
15. **Smith-Bindman R., Boone J.M.** Introduction to the Special Issue: Radiation Dose Optimization-Improving the Safety of CT // J. Am. Coll. Radiol. – 2014. – No. 11(3). – Pp. 229-30.

References

1. Analiz variabel'nosti serdechnogo ritma pri ispol'zovanii razlichnyh kardiograficheskikh sistem (metod. rekom.) [Analysis of heart rate variability in the use of various respiratory support systems (guidelines)]. Vestnik aritmologii [Bulletin of Arrhythmology]. 2001. No. 24. Pp. 65-87. (In Russian).
2. Vegetativnye rasstrojstva: klinika, lechenie, diagnostika [Vegetative disorders: clinic, treatment, diagnosis]. Ed. by A.M. Wein. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2000. 752 p. (In Russian).
3. **Vejn A.M.** Zabolevaniya vegetativnoj nervnoj sistemy: ruk-vo dlya vrachej [Zabolevaniya vegetativnoj nervnoj sistemy: manual for doctors]. Moscow: Medicina, 2003. 620 p. (In Russian).
4. **Gaevskij Yu.G., Raff S.A.** Pokazатели sutochnoj variabel'nosti serdechnogo ritma bol'nyh ishemicheskoy boleznyu serdca gipertonicheskoy boleznyu i neirocirkulyatornoj distoniej: novyj podhod v bal'noj ocenke otklonenij ot normy pokazatelej bol'nyh i zdorovyh [Indicators of the daily rate variability in patients with coronary heart disease, essential hypertension and neurocirculatory dystonia: a new approach in the ballroom the assessment of deviations from normal parameters of patients and healthy]. Vestnik aritmologii [Bulletin of Arrhythmology]. 2004. No. 35. P. 16. (In Russian).
5. **Kil'debekova R.N., Gajsina Eh.V., Nigmatullin I.M.** Vliyanie manual'noj terapii na ehlektricheskuyu deyatel'nost' serdca bol'nyh osteohondrozom shejnogo otdela pozvonochnika po rezul'tatam holterovskogo monitorirovaniya [The influence of manual therapy on the electrical activity of the heart in patients with cervical spine osteochondrosis by the results of Holter monitoring]. Vestnik aritmologii [Bulletin of Arrhythmology]. 2002. No. 28. P. 5. (In Russian).
6. **Kovalenko V.N., Nesukaj E.G., Dmitrichenko E.V.** Variabel'nost' ritma serdca kak pokazatel' funkcii vegetativnoj nervnoj sistemy u bol'nyh s serdechno-sosudistymi zabolevaniyami [Heart rate variability as an indicator of autonomic nervous system function in patients with cardiovascular diseases]. Ukrains'kij kardiologichnij zhurnal [Ukrainian J. of Cardiology]. 2006. No. 3. Pp. 68-71. (In Russian).
7. **Makolkin V.I., Ovcharenko S.I., Semenov I.I.** Vnutrennie bolezni: ucheb. dlya med. uchilishch [Internal medicine: textbook for medical schools]. Moscow: Medicina, 1998. 430 p. (In Russian).
8. **Mihajlov V.M.** Variabel'nost' ritma serdca. Opyt prakticheskogo primeneniya metoda [Heart rate variability. Experience of practical application of the method]. Ivanovo, 2000. 200 p. (In Russian).
9. **Pokalev G.M.** Nejrocirkulyatornaya distoniya [Neurocirculatory dystonia]. Moscow, 1997. 76 p. (In Russian).
10. Chastnaya patologiya: uch. posob. dlya stud. VUZov [Private pathology: textbook for university students]. Ed. by S.N. Popov. Moscow: Izdatel'skij centr «Akademiya», 2004. 256 p. (In Russian).
11. **Yabluchanskij N.I., Martynenko A.V.** Variabel'nost' serdechnogo ritma. V pomoshch' praktikuyushchemu vrachu. Dlya nastoyashchih vrachej [Heart rate variability. To help the practitioner. For real doctors]. Kharkiv, 2010. 131 p. (In Russian).
12. **Miglioretti D.L., Johnson E., Williams A., Greenlee R.T., Weinmann S., Solberg L.I., Feigelson H.S., Roblin D., Flynn M.J., Vanneman N., Smith-Bindman R.** The use of computed tomography in pediatrics and the associated radiation exposure and estimated cancer risk. JAMA Pediatr. 2013. No. 167(8). Pp. 700-7.
13. **Roberts D.C., Marcelli V., Gillen J.S., Carey J.P., Santina Ch.C.D., Zee D.S.** MRI Magnetic Field Stimulates Rotational Sensors of the Brain. Current Biology. 2011. V. 21, Issue 19. Pp. 1635-40.
14. **Smith-Bindman R.** Environmental causes of breast cancer and radiation from medical imaging: findings from the Institute of Medicine report. Arch. Intern. Med. 2012. No. 172(13). Pp. 1023-7.
15. **Smith-Bindman R., Boone J.M.** Introduction to the Special Issue: Radiation Dose Optimization-Improving the Safety of CT. J. Am. Coll. Radiol. 2014. No. 11(3). Pp. 229-30.

Variability of heart rate in patients with vegetal vascular dystonia of brain

N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina, A.A. Nikolaev

The present experimental investigation was dedicated to research of indices of heart rate variability in patients with vegetal vascular dystonia of brain. Dynamic changes in cardiac activity in patients with vascular dystonia of the brain differ from the norm in some indicators. It was found out that patients with vegetal vascular dystonia of brain were characterized by increase of cardiac interval duration, all frequency components of heart rate variability, total power spectrum, magnitude variation and decrease of heart rate, vegetative balance, mode amplitude, index of regulatory system effort.

Key words: heart rate variability, vegetal vascular dystonia, brain.

Методика окрашивания и дифференцировки микроорганизмов с использованием красителя на растительной основе

Т.А. Ишунина, А.В. Шевченко, П.В. Калущкий, О.А. Медведева

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск

Контактная информация: к.м.н. Ишунина Татьяна Александровна, ishunina@gmail.com

Предложен новый метод идентификации микроорганизмов в простых и сложных схемах окраски, включая дифференцировку грамположительных, грамотрицательных и кислотоустойчивых бактерий с использованием красителя на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины, обладающего основными свойствами. Красящий пигмент нового красителя – цианидин – имеет в своей структуре положительно заряженный оксониевый кислород, вступающий в донорно-акцепторную связь с атомом меди медного купороса. В результате этого взаимодействия происходит окрашивание базофильных структур клетки и микроорганизмов. Следует отметить выраженное сходство химической структуры цианидина и основных микробиологических красителей крезилового фиолетового и метиленового синего, что подтверждает возможность использования нового растительного красителя в микробиологических исследованиях.

Ключевые слова: дифференцировка микроорганизмов, грамположительные и грамотрицательные бактерии, цианидин, черноплодная рябина.

Введение

Для окраски микроорганизмов чаще всего используют основные красители – генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый и метиленовый синий, имеющие сродство к кислым компонентам клетки. Благодаря этому основные красители хорошо окрашивают ядра клеток и микроорганизмы в простых (ориентировочных с использованием одного красителя) и сложных (дифференцирующих, с применением двух красителей) методиках окраски [2]. Из сложных методов наиболее популярен метод дифференцировки микроорганизмов по Граму, основанный на различиях толщины, плотности и химического состава их клеточной стенки. Грамположительные бактерии легко воспринимают

основные красители фиолетового цвета и прочно фиксируют их в своих стенках. Толщина клеточной стенки грамотрицательных бактерий не позволяет краске проникнуть внутрь, в результате чего она не фиксируется и легко смывается спиртом с поверхности бактерий, которые затем воспринимают дополнительный краситель другого цвета (чаще, фуксин контрастирующего красного цвета). Известны лишь единичные аналоги методики окраски по Граму. Среди них запатентованные способы с использованием насыщенного щелочного р-ра метиленового синего после фиксации ацетоном [9] и с применением метиленового синего и основного фуксина, растворённых в метиловом спирте [8]. В обоих случаях для грамположительных бактерий вме-

сто генцианового или кристаллического фиолетового применяют метиленовый синий. В настоящее время доступность и цена основных красителей преимущественно импортного происхождения несколько ограничивают их использование в повседневной микробиологической и гистологической практике.

В связи с этим, **целью** настоящего исследования стала разработка альтернативных методов окраски микроорганизмов на основе доступных, недорогих и нетоксичных ингредиентов. В качестве аналога генцианового/кристаллического фиолетового и метиленового синего был использован новый растительный краситель на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины, который прекрасно зарекомендовал себя в гистологии для окраски ядер и др. базофильных компонентов клетки [7].

Материалы и методы

Для разработки нового способа окрашивания микроорганизмов использованы тест-штаммы *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) и *Mycobacterium smegmatis*, которые были получены из коллекции ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (Москва). Исследованные культуры микроорганизмов хранятся на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России в столбиках полужидкого мясо-пептонного агара под вазелиновым маслом. Перед окраской и микроскопией микроорганизмы отсеивали на скошенный мясо-пептонный агар штриховым методом и инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч.

Для приготовления красящего р-ра свежие или размороженные плоды черноплодной рябины разминают, сливают образовавшийся сок и заливают 90% этиловым спиртом в соотношении 1,25-1,3:1. Настаивание производится в защищённом от света месте, в тёмной посуде при комнатной температуре в течение 3-4 дней, затем настойку отжимают через 4-5-слойную марлю и получают густой тёмно-красный непрозрачный р-р, который помещают в посуду из тёмного стекла в холодильник (+4-6°C) для дальнейшего хранения. К 40 мл фильтрата добавляют 2-2,5 г медного купороса, размешивают, после чего он готов к использованию в течение 1 мес.

Результаты исследований

Простой метод окрашивания новым красителем

Бактериологические мазки фиксируют над пламенем спиртовки, наносят новый краситель на основе экстракта плодов черноплодной рябины на 4,5-5 мин, промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и изучают под микроскопом с объективом х90 и иммерсионным маслом. Грамположительные бактерии окрашиваются в различные оттенки синего цвета.

Сложные методы окрашивания новым красителем

Дифференцировка грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов

На фиксированные мазки музейных культур стафилококка (*S. aureus*), бацилл (*B. cereus*, *B. subtilis*) и кишечной палочки (*E. coli*) наносят новый краситель на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины, содержащего медный купорос, на 4,5 мин, смы-

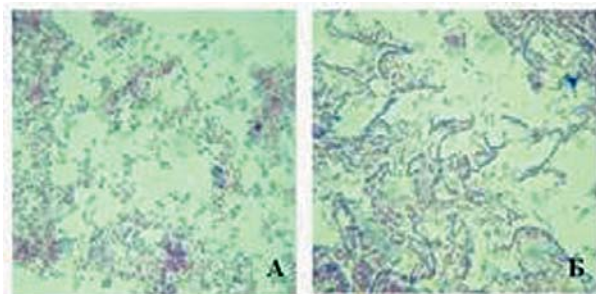


Рис. 1. Окраска смеси музейных культур стафилококка (*S. aureus*) и кишечной палочки (*E. coli*) (А) и смеси музейных культур *B. cereus* и *E. coli* (Б) новым способом с использованием красителя на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины. Дифференцировка грамположительных бацилл и стафилококков (тёмно-синего или фиолетового цвета) и грамотрицательных кишечных палочек (окрашены в красный цвет) возможна в смешанных культурах с наличием нескольких типов микроорганизмов. Ув. $\times 10$ (окуляр), $\times 100$ (объектив).

вают 2 раза 96% спиртом, наносят 96% спирт на 20 с, промывают водой и наносят 1% эозин на 1 мин, затем промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой. Результат представлен на рис. 1.

B. cereus (рис. 2А) и стафилококки (рис. 2Б) и окрашиваются в тёмно-синий цвет, сенная палочка (рис. 2В) – в сине-фиолетовый, кишечные палочки – в красный (рис. 2Г). Для сравнения

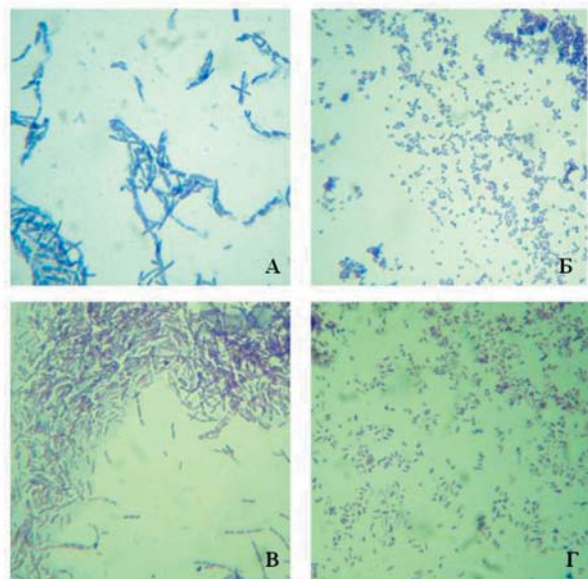


Рис. 2. Окраска бацилл (*B. cereus*) (А), стафилококков (*S. aureus*) (Б), сенных палочек (*B. subtilis*) (В) и кишечных палочек (*E. coli*) (Г) новым способом с использованием красителя на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины. Грамположительные бациллы и стафилококки окрашиваются в синий или фиолетовый цвет, кишечные палочки – в красный. Ув. $\times 10$ (окуляр), $\times 100$ (объектив).

культуры стафилококка и кишечной палочки были окрашены классическим методом по Граму. Как оказалось, новый метод не уступает, а иногда и превосходит рутинный по чёткости идентификации микробов. От классического способа по Граму новый метод отличается не только заменой основного, но и кислого красителя. Вместо обычного кислого фуксина используется эозин, исключена экспозиция в р-ре Люголя, отмечено влияние кратности промывания в 96% спирте.

С помощью новой методики дифференцировка грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов возможна и в смешанных бактериологических мазках (рис. 1). Например, при одновременном окрашивании в одном мазке стафилококки (*S. aureus*) окрашиваются в тёмно-синий цвет, кишечные палочки (*E. coli*) – в красный (рис. 1А), бациллы (*B. cereus*) окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, кишечные палочки – в красный (рис. 1Б).

Дифференцировка кислотоустойчивых микробов

Новый растительный краситель может быть использован и в протоколе окраски бактериологических мазков по Циллю-Нильсену. После окраски карболовым фуксином и дифференцировке в кислоте кислотоустойчивые бактерии *Mycobacterium smegmatis* не воспринимали новый краситель и сохраняли красную окраску. Напротив, кишечные палочки и стафилококки после обесцвечивания в р-ре кислоты быстро окрашивались новым красителем в синий или фиолетовый цвет. Таким образом, новый краситель может быть использован на втором этапе окраски в протоколе по Циллю-Нильсену вместо метиленового синего.

Обсуждение результатов

Основные свойства нового красителя объясняются наличием в структуре его красящих пигментов (антоцианов) оксониевого кислорода, проявляющего катионные свойства в кислой среде [11]. Основные свойства антоциановых красителей, приготовленных на основе спиртовых экстрактов плодов черноплодной рябины, винограда, смородины и бузины, были наглядно продемонстрированы в гистологических исследованиях для окраски ядер клеток и др. базофильных структур [4-7]. При этом способность окрашивать базофильные структуры связана с преобладанием моногликозидных форм антоцианов [6]. Для микробиологических исследований наиболее подходит экстракт плодов черноплодной рябины. Это связано с наличием в них преимущественно моногликозидов цианидин 3-галактозида и цианидин 3-арабинозида [3, 13], большей стабильностью спиртового экстракта и тёмно-фиолетовым/синим цветом окрашиваемых структур, сходным с привычным оттенком метиленового синего и кристаллического/генцианового фиолетового, что особенно важно для дифференцировки микроорганизмов при одновременном окрашивании разными красителями. Для поддержания кислотности среды и стабильности антоциановых пигментов в качестве экстрагента используется спирт [1, 10, 12] и хранение в тёмном, защищённом от света месте при низких (+4-6°C) температурах в холодильнике [12]. Немаловажно, что структура основного пигмента плодов черноплодной рябины – цианидина – очень близка к химическому строению кристаллического/генцианового фиолетового и метиленового синего,

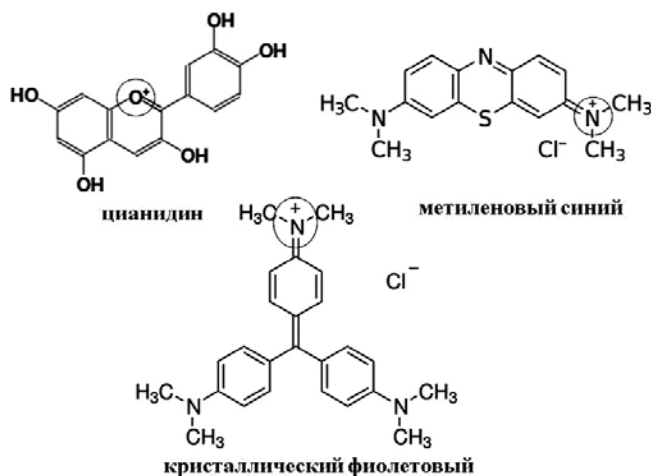


Рис. 3. Химическое строение основного красящего пигмента плодов черноплодной рябины (цианидина) и микробиологических красителей – кристаллического фиолетового и метиленового синего. Для всех приведенных красителей характерны сходная фенольная структура и наличие катионов (выделены кружочками), объясняющих их основные свойства.

содержащих похожие катионы (рис. 3). Сходство химического строения свидетельствует об аналогичном механизме окрашивания микроорганизмов новым растительным красителем и подтверждает возможность его использования с этой целью.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе предложен новый метод окраски и дифференцировки микроорганизмов с помощью растительного красителя на основе антоцианов плодов черноплодной рябины, отличающегося более низкой себестоимостью, возможностью самостоятельного приготовления на основе свежих или замороженных ягод, использованием доступной соли – медного купороса, вступающей в донорно-акцепторную связь с оксониевым кислородом антоцианов черноплодной рябины. Впервые для идентификации микроорганизмов был использован растительный краситель.

Список литературы

1. Болотов В.М., Комарова Е.В., Филатова Е.С., Хрипушин В.В. Цветометрические характеристики композиционных каротиноидно-антоциановых экстрактов растительного сырья // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 127-134.
2. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С., Фёдорова З.Ф. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии (для мед. ин-тов) / Под ред. Л.Б. Борисова. – М.: Медицина. – 1979. – 286 с.
3. Дейнека Л.А., Шапошиников А.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н. Антоцианы: природные антиоксиданты и не только // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2006. – Т. 2. – № 4. – С. 92-100.
4. Ишунина Т.А. Гистологические красители на основе экстрактов ягод винограда и чёрной смородины // Морфологические ведомости. – 2015. – № 4. – С. 65-68.
5. Ишунина Т.А., Боева С.Г. Разработка технологии приготовления и применения гистологических красителей на основе экстрактов бузины чёрной, бархатцев распротёртых и донника лекарственного // Химия растительного сырья. – 2017. – № 2. – С. 163-169.
6. Ишунина Т.А., Моспанова А.А., Архипова А.Г. Применение экстрактов цветков ге-

- оргины, розы и пиона для гистологического окрашивания // Химия растительного сырья. – 2017. – № 3. – С. 221-226.
7. **Ишунина Т.А., Солоненко О.В.** Гистологический краситель на основе антоцианов ягод черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) // Морфологические ведомости. – 2014. – № 4. – С. 58-61.
 8. **Кубеgekova Н.Г., Росляков А.А., Рыстаева Р.А., Белоусов В.Д.** Способ диагностики бактериальных микроорганизмов в патологическом материале из органов рыб, птиц, животных // Патент Республики Казахстан № 25877. – 2012.
 9. **Мавзютов А.Р., Туйгунов М.М., Габидуллин З.Г., Гашимова Д.Т., Булгаков А.К., Абдрахманов А.М., Хомякова Т.Р., Хасанова С.Г.** Способ дифференцирования грамположительных и грамотрицательных бактерий рода *Trichomonas* // Патент РФ № 2179580. – 2002.
 10. **Один А.П.** Преимущества использования этилового спирта как экстрагента для получения красных антоциановых красителей из растительного сырья // Известия вузов. Пищевая технология. – 2004. – № 4. – С. 46-48.
 11. **Писарев Д.И., Новиков О.О., Селютин О.А., Писарева Н.А.** Биологическая активность полифенолов растительного происхождения: перспектива использования антоцианов в медицинской практике // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 10. – № 18/2. – С. 17-24.
 12. **Полина С.А., Хмарская Н.Е., Ефремов А.А.** Сравнительный анализ условий экстракционного извлечения антоцианов *Aronia melanocarpa* Сибирского региона // Журнал Сибирского Федерального Университета. Химия. – 2015. – Т. 8. – № 2. – С. 222-231.
 13. **Oszmianski J., Sapis J.** Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry) // J. Food Sci. – 1988. – V. 53. – No. 4. – Pp. 1241-42.
 2. **Borisov L.B., Koz'min-Sokolov B.N., Frejdlin I.S., Fyodorova Z.F.** Rukovodstvo k laboratornym zanyatiyam po mikrobiologii (dlya med. in-tov) [Guide to laboratory studies in microbiology (for medical institutes)]. Ed. by L.B. Borisov. Moscow: Meditsina. 1979. 286 p. (In Russian).
 3. **Dejneka L.A., Shaposhnikov A.A., Dejneka V.I., Sorokopudov V.N.** Antotsiany: prirodnye antioksidanty i ne tol'ko [Anthocyanins: natural antioxidants and not only]. Nauchnye vedomosti BelGU. Ser. Meditsina. Farmatsiya [Scientific statements of Belgorod State University. Series Medicine, Pharmacy]. 2006. V. 2. No. 4. Pp. 92-100. (In Russian).
 4. **Ishunina T.A.** Gistologicheskie krasiteli na osnove ehkstraktov yagod vinograda i chyornoj smorodiny [Histological dyes based on extracts of grapes and black currant berries]. Morfologicheskie vedomosti [Morphological statements]. 2015. No. 4. Pp. 65-68. (In Russian).
 5. **Ishunina T.A., Boeva S.G.** Razrabotka tekhnologii prigotovleniya i primeneniya gistologicheskikh krasitelej na osnove ehkstraktov buziny chyornoj, barkhattsev rasprostyortykh i donnika lekarstvennogo [Development of technology for the preparation and use of histological dyes based on extracts of black elderberry, marigold spread and clover medicinal]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of plant materials]. 2017. No. 2. Pp. 163-169. (In Russian).
 6. **Ishunina T.A., Mospanova A.A., Arkhipova A.G.** Primenenie ehkstraktov tsvetkov georginy, rozy i piona dlya gistologicheskogo okrashivaniya [Use of dahlia, rose and peony flower extracts for histological staining]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of plant materials]. 2017. No. 3. Pp. 221-226. (In Russian).
 7. **Ishunina T.A., Solonenko O.V.** Gistologicheskij krasitel' na osnove antotsianov yagod chernoplodnoj ryabiny (*Aronia melanocarpa*) [Histological dye based on anthocyanin berries of Aronia rowan (*Aronia melanocarpa*)]. Morfologicheskie vedomosti [Morphological statements]. 2014. No. 4. Pp. 58-61. (In Russian).
 8. **Kubegekova N.G., Roslyakov A.A., Rystaeva R.A., Belousov V.D.** Sposob diagnostiki bakterial'nykh mikroorganizmov v patologicheskom materiale iz organov ryb, ptits, zhivotnykh [Method for the diagnosis of bacterial microorganisms in the pathological material from the organs of fish, birds, animals].

References

1. **Bolotov V.M., Komarova E.V., Filatova E.S., Khripushin V.V.** Tsvetometricheskie kharakteristiki kompozitsionnykh karotinoidno-antotsianovykh ehkstraktov rastitel'nogo syr'ya [Colorimetric characteristics of composite carotenoid-anthocyanin extracts of plant materials]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of plant materials]. 2016. No. 1. Pp. 127-134. (In Russian).

- Patent of Kazakhstan Republic № 25877. 2012. (In Russian).
9. *Mavzyutov A.R., Tujgunov M.M., Gabidullin Z.G., Gashimova D.T., Bulgakov A.K., Abdrakhmanov A.M., Khomyakova T.R., Khasanova S.G.* Sposob differentsirovaniya grampolozhitel'nykh i gramotritsatel'nykh bakterij roda *Trichomonas* [The method of differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria of the genus *Trichomonas*]. Patent of RF № 2179580. 2002. (In Russian).
 10. *Odin A.P.* Preimushhestva ispol'zovaniya etilovogo spirta kak ehkstragenta dlya polucheniya krasnykh antotsianovykh krasitelej iz rastitel'nogo syr'ya [The advantages of using ethyl alcohol as an extractant for the production of red anthocyanin dyes from plant materials]. *Izvestiya vuzov. Pishhevaya tekhnologiya* [News of universities. Food technology]. 2004. No. 4. Pp. 46-48. (In Russian).
 11. *Pisarev D.I., Novikov O.O., Selyutin O.A., Pisareva N.A.* Biologicheskaya aktivnost' polifenolov rastitel'nogo proiskhozhdeniya: perspektiva ispol'zovaniya antotsianov v meditsinskoj praktike [Biological activity of plant polyphenols: the prospect of using anthocyanins in medical practice]. *Nauchnye vedomosti BelGU. Ser. Meditsina. Farmatsiya* [Scientific statements of Belgorod State University. Series Medicine, Pharmacy]. 2012. V. 10. No. 18/2. Pp. 17-24. (In Russian).
 12. *Polina S.A., Khmarskaya N.E., Efremov A.A.* Sravnitel'nyj analiz uslovij ehkstraktsionnogo izvlecheniya antotsianov *Aronia melanocarpa* Sibirskogo regiona // *Zhurnal Sibirskogo Federal'nogo Universiteta* [Comparative analysis of the extraction conditions of anthocyanin extraction of *Aronia melanocarpa* in the Siberian region]. *Khimiya* [Chemistry]. 2015. V. 8. No. 2. Pp. 222-231. (In Russian).
 13. *Oszmianski J., Sapis J.* Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry). *J. Food Sci.* 1988. V. 53. No. 4. Pp. 1241-42.

The method of staining and differentiation of microorganisms using the plant-based dye

T.A. Ishunina, A.V. Shevchenko, P.V. Kalutskii, O.A. Medvedev

The new method of identification of microorganisms in simple and complex schemes of staining, including differentiation of gram-positive, gram-negative and acid-resistant bacteria using the dye with basic properties based on the ethanol extract of chokeberry, is proposed. The structure of the coloring pigment of the new dye – cyanidine – has the positively charged oxygen that forms donor-acceptor bonds with the copper atom of the copper sulphate. As a result of this interaction, basophilic structures of cells and microorganisms are stained. It should be noted that the chemical structure of cyanidine and of the main microbiological dyes cresil violet and methylene blue have pronounced similarity that confirms the possibility of using a new vegetable dye in microbiological studies.

Key words: differentiation of microorganisms, gram-positive and gram-negative bacteria, cyanidin, chokeberry.



ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная оценка риска геморрагических осложнений после парентерального введения прямых антикоагулянтных препаратов – дабигатрана этексилата и ривароксабана**В.А. Пугач, М.А. Тюнин, Е.А. Тарасов, А.С. Гоголевский, Е.И. Строкина***ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны России, Санкт-Петербург**Контактная информация: к.б.н. Пугач Виктория Александровна, glandula_pinealis@mail.ru; к.м.н. Тюнин Михаил Александрович, tyunin84@mail.ru*

Исследована эффективность и безопасность дабигатрана этексилата и ривароксабана при их подкожном введении крысам. В качестве препарата сравнения использовали гепарин натрия. Выявлено, что через 2 ч после введения гепарина натрия (250; 500; 1000 ед./кг), дабигатрана этексилата (4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 мг/кг) и ривароксабана (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 мг/кг) наступает выраженный антикоагулянтный эффект. Гепарин натрия (в дозе 1000 ед./кг) и ривароксабан (в дозе 10,0 мг/кг) вызывают значительную пролонгацию времени хвостового кровотечения и критическое увеличение показателей коагуляционного гемостаза. При определении широты терапевтического действия исследуемых препаратов установлено, что дабигатрана этексилат имеет большую терапевтическую широту, чем гепарин натрия и ривароксабан. Результаты исследования могут служить обоснованием возможности разработки инъекционной лекарственной формы дабигатрана этексилата и могут быть использованы для совершенствования терапии критических состояний с высоким риском развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания в условиях чрезвычайных ситуаций и вооруженных конфликтов.

Ключевые слова: дабигатрана этексилат, ривароксабан, геморрагические осложнения.

Введение

В настоящее время антикоагулянтная терапия с применением препаратов гепарина (нефракционированный гепарин – НФГ, низкомолекулярные гепарины – НМГ) является ведущим способом коррекции нарушений системы гемостаза при различных неотложных состояниях, сопровождающихся дисрегуляцией агрегатного состояния крови. Вместе с тем, в некоторых случаях (в частности,

при политравме, термической и ингаляционной травме) для проведения лечебных мероприятий в рамках скорой и первичной медико-санитарной помощи методическими документами рекомендовано назначение только НФГ [3, 4].

Известно, что одним из наиболее тяжелых осложнений политравм различной этиологии (минно-взрывная, комбинированная, сочетанная, ингаляционная) является синдром диссемини-

рованного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), патогенез которого характеризуется дефицитом антитромбина III. В таких случаях ДВС-синдром отличается быстрым развитием (от нескольких десятков минут до суток) и высокой летальностью (до 50%) [1, 11]. Установлено, что применение гепаринотерапии при таких состояниях по причине сниженного уровня антитромбина III впоследствии может вызвать состояние гиперкоагуляции и стать причиной тромбозов. Кроме того, на фоне ДВС-синдрома нередко возникает гепарин-индуцированная тромбоцитопения, определяющая высокий риск развития парадоксальных тромбозов [7, 10].

В связи с тем, что использование НФГ и НМГ недостаточно эффективно при ДВС-синдроме, представляется актуальным поиск альтернативных гепаринотерапии способов фармакологической коррекции нарушений системы гемостаза при тяжелых травмах различной этиологии, когда требуется быстрое применение антикоагулянтов в инъекционной форме.

В последние годы активно изучаются возможности применения новых оральных антикоагулянтов – дабигатрана этексилата (прямой ингибитор IIa) и ривароксабана (прямой ингибитор Xa) в терапии и профилактике тромбозов различной этиологии. Ряд исследований демонстрирует возможность перорального применения дабигатрана этексилата и ривароксабана в терапии некоторых форм ДВС-синдрома [9, 13, 14]. Кроме того, известно, что предварительное пероральное введение ривароксабана крысам оказывало протективный эффект и нивелировало проявления гиперкоагуляции в модели эндотоксин-индуцированного ДВС-синдрома [12].

Поскольку ингибирование IIa и Xa является основополагающим механизмом в купировании развития ДВС-синдрома [8], использование селективных препаратов, обеспечивающих высокоспецифическое и независимое от уровня антитромбина III блокирование активации факторов свертывания, раскрывает перспективы для совершенствования методов терапии нарушений гемостаза при критических состояниях.

С учетом указанных обстоятельств, **целью** нашего исследования стало изучение эффективности и безопасности дабигатрана этексилата и ривароксабана при инъекционном введении.

Материалы и методы

В качестве исследуемых антикоагулянтов использовали дабигатрана этексилат («MedChemExpress», США) в дозах 1,0; 2,5; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 мг/кг; ривароксабан («MedChemExpress», США) в дозах 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 мг/кг; гепарин натрия («Синтез АКОМП», Россия) в дозах 100; 250; 500; 1000 ед./кг.

Исследование выполнено на 170-ти взрослых самцах крыс популяции линий Wistar массой тела 250-300 г, по 10 животных в каждой группе. Животные содержались в условиях вивария с соблюдением основных зоогигиенических требований: температурный режим: 20-24°C, 12-часовой световой день, свободный доступ к корму и воде. Экспериментальная работа проводилась в соответствии с требованиями приказа Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Антикоагулянты вводили в виде суспензий, приготовленных на физ. р-ре. В качестве контроля использовали животных после инъекции физ. р-ра. Применяли подкожный путь введения. Время кровотечения исследовали через 1 ч после инъекций р-ров. Животных наркотизировали внутривенной инъекцией пентобарбитала (60 мг/кг), после чего проводили резекцию кончика хвоста (2 мм) с последующим погружением его во флакон с физ. р-ром, подогретым до 37°C [2]. Время кровотечения фиксировали до полной его остановки (но не более 1 ч).

Через 2 ч после инъекций отбирали пробы крови, стабилизировали ее цитратом натрия, а затем центрифугировали при температуре 20°C (15 мин при 3000 об./мин). Далее отбирали плазму крови и определяли показатели коагуляционного гемостаза: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и протромбиновое время (ПВ). Исследования проводили при помощи реагентов НПО «Ренам» (Россия) на коагулометре «Техномедика АПГ2-02П».

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 10.0. Определяли средние значения и их стандартные ошибки, для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ по post-hoc t-критерию по методу Тьюки, за достоверные принимали значения, при которых $p < 0,05$. С целью выявления зависимости между показателями времени кровотечения и показателями коагуляционного гемостаза применяли ранговый коэффициент корреляции Пирсона. Степень связи между показателями оценивали, считая значения ко-

эффициента: 0,3 и менее – показатели слабой корреляции; значения от 0,4 до 0,7 – показатели умеренной корреляции; 0,7 и более – показатели высокой корреляции. Методом пробит-анализа по Финни вычисляли эффективные и токсические дозы антикоагулянтов.

Результаты исследований

Длительность кровотечения

Подкожное введение гепарина натрия (250 ед./кг) вызывало пролонгацию времени кровотечения в 3,8 раз, а в дозе 500 ед./кг – в 6,1 раза. Увеличение дозы этого антикоагулянта до 1000 ед./кг приводило к продлению хвостового кровотечения свыше одного часа. Введение дабигатрана этексилата (1,0 и 2,5 мг/кг) и ривароксабана (1,0 мг/кг) не оказывало влияния на продолжительность кровотечения в сравнении с контрольными животными. Повышение дозы дабигатрана этексилата до 4,0; 5,0; 7,5; 10,0 и 15,0 мг/кг повышало длительность кровотечения в 4,0; 4,1; 8,1; 8,6 и 9,4 раза соответственно. Инъекция ривароксабана вызывала увеличение времени кровотечения в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг в 6,9 раз, а в дозе 7,5 мг/кг – в 10 раз. Повышение дозы ривароксабана до 10,0 мг/кг способствовало пролонгации данного показателя свыше одного часа.

Показатели коагуляционного гемостаза

1) **АЧТВ.** Инъекция гепарина натрия (250 ед./кг) не изменяла АЧТВ, а в дозе 500 ед./кг – увеличивала этот параметр в 1,9 раза. Повышение дозы гепарина натрия до 1000 ед./кг пролонгировало АЧТВ более чем в 4 раза. Применение дабигатрана этексилата в дозах 1,0 и 2,5 мг/кг не оказывало влияния на показатели АЧТВ, а повышение дозы до 4,0;

5,0; 7,5; 10,0 и 15,0 мг/кг приводило к увеличению этого параметра в 1,4; 1,6; 2,3; 2,9 и 3,1 раза соответственно. Ривароксабан в дозе 5,0 мг/кг пролонгировал АЧТВ в 1,3 раза, в дозе 7,5 мг/кг – в 1,6 раза, а в дозе 10,0 мг/кг – в 1,8 раз. Инъекции ривароксабана в меньших дозировках (1,0 и 2,5 мг/кг) не оказывали влияния на показатели АЧТВ.

2) **ПВ.** Введение гепарина натрия в максимальной дозе (1000 ед./кг) приводило к изменению показателей ПВ, т.е. способствовало его пролонгации в 1,7 раза. Дабигатрана этексилат в дозе 5,0 мг/кг увеличивал ПВ в 1,4 раза, в дозах 7,5 и 10,0 мг/кг – в 2,5 раза, в дозе 15,0 мг/кг – в 2,9 раза. Инъекция рива-

роксабана в дозе 2,5 мг/кг пролонгировала ПВ в 1,5 раза, в дозе 5,0 мг/кг – в 2 раза, в дозе 7,5 мг/кг – 2,9 раза, а в дозе 10,0 мг/кг – в 3,5 раза. Применение дабигатрана этексилата и ривароксабана в меньших дозировках не оказывало влияния на показатели ПВ (табл. 1).

Исследование взаимосвязи между показателями длительности кровотечения и коагуляционного гемостаза после введения дабигатрана этексилата и ривароксабана

Выявлена высокая степень корреляции между показателями длительности кровотечения и показателями коагуляционного гемостаза после инъекции дабигатрана этексилата: АЧТВ ($r=0,7$),

Таблица 1
Продолжительность времени кровотечения и показатели коагуляционного гемостаза после введения антикоагулянтов

Вводимое вещество		Длительность кровотечения, мин	АЧТВ, с	ПВ, с
Физ. р-р		5,32±0,43	23,68±1,18	20,31±0,68
Гепарин натрия (ед./кг)	100	7,81±1,03	26,20±1,52	19,30±0,57
	250	20,11±1,44*	32,15±2,01*	21,02±0,88
	500	32,41±4,96*	44,35±2,54*	20,80±0,74
	1000	более 1 ч	более 100 с	37,36±0,79*
Дабигатрана этексилат (мг/кг)	1,0	6,68±1,56	27,18±1,10	23,08±0,94
	2,5	8,24±2,01	26,94±1,42	22,82±1,02
	4,0	21,13±1,04*	32,19±2,10*	24,33±1,94
	5,0	22,02±5,06*	38,07±2,81*	29,78±1,48*
	7,5	43,02±3,82*	55,17±5,38*	55,15±5,17*
	10,0	45,57±2,58*	67,92±5,01*	51,75±6,11*
	15,0	50,26±3,55*	74,28±6,20*	58,40±5,87*
Ривароксабан (мг/кг)	1,0	3,98±0,52	20,58±1,05	23,45±0,31
	2,5	36,89±3,29*	22,55±1,68	31,05±2,05*
	5,0	36,72±1,82*	30,20±1,96*	40,16±1,83*
	7,5	55,42±3,57*	37,82±2,22*	58,48±6,03*
	10,0	более 1 ч	44,18±2,46*	70,30±3,51*

Примечание: * – $p<0,05$ в сравнении с животными после введения физ. р-ра.

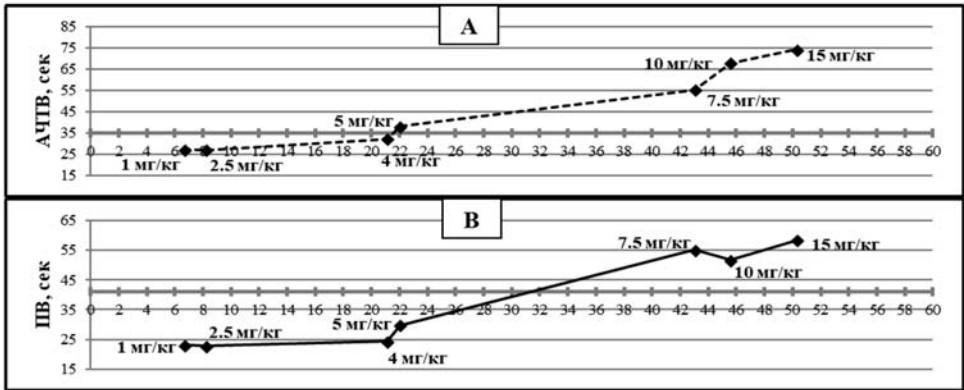


Рис. 1. Зависимость показателей времени кровотечения от АЧТВ (А) и ПВ (В) после введения дабигатрана этексилата (по оси абсцисс – длительность кровотечения, мин; по оси ординат – показатели клоттинговых тестов, сек).

ПВ ($r=0,74$). Зависимость между этими показателями отражена на рис. 1. Отмеченное по оси ординат увеличение АЧТВ более 35 с и ПВ более 41 с свидетельствует о наступлении ожидаемого антикоагулянтного эффекта. Представленные иллюстрации свидетельствуют о том, что тест АЧТВ является более чувствительным для выявления ожидаемого антикоагулянтного эффекта после инъекции дабигатрана этексилата. В соответствии с показателями АЧТВ ожидаемый гипокоагуляционный эф-

фект наступает при увеличении времени хвостового кровотечения у крыс свыше 20 мин. Показатели ПВ свидетельствует, что ожидаемый эффект наступил только при пролонгировании времени кровотечения более 32 мин.

Выявлена высокая степень корреляции между показателями длительности кровотечения и показателями коагуляционного гемостаза после введения ривароксабана: АЧТВ ($r=0,85$), ПВ ($r=0,87$). Зависимость между этими показателями отражена на рис. 2. Для выявления

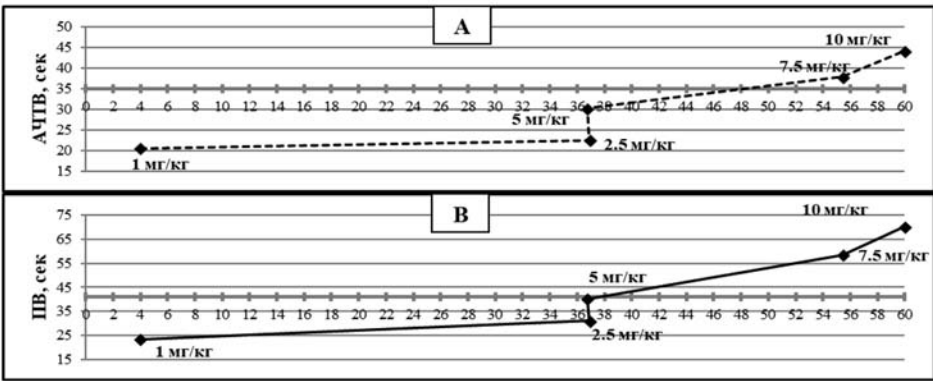


Рис. 2. Зависимость показателей времени кровотечения от АЧТВ (А) и ПВ (В) после введения ривароксабана (по оси абсцисс – длительность кровотечения, мин; по оси ординат – показатели клоттинговых тестов, сек).

ожидаемого антикоагулянтного эффекта после инъекции ривароксабана тест ПВ является более чувствительным, чем АЧТВ. В соответствии с показателями ПВ ожидаемый гипокоагуляционный эффект наступает при пролонгировании времени хвостового кровотечения у крыс свыше 36 мин. Напротив, показатели АЧТВ свидетельствуют, что ожидаемый эффект наступил только при увеличении времени кровотечения более 45 мин.

Вычисление эффективных и токсических доз дабигатрана этексилата и ривароксабана

Методом пробит-анализа по Финни определены эффективная терапевтическая (ЭД50) и токсическая (ТД50) дозы антикоагулянтов на основании показателей АЧТВ и ПВ. Критерии расчета ЭД50 антикоагулянтов: увеличение АЧТВ в 1,5 раза, а ПВ – в 2 раза. Критерии для расчета ТД50: АЧТВ – более 80 с, увели-

чение ПВ более чем в 3 раза [4]. ЭД50 и ТД50 гепарина натрия определяли по показателям АЧТВ, поскольку этот тест является специфическим при мониторинге эффективности гепаринотерапии.

В соответствии с результатами предыдущего исследования для дабигатрана этексилата ЭД50 и ТД50 рассчитывали по показателям АЧТВ, а для ривароксабана – по показателям ПВ.

Полученные методом пробит-анализа результаты позволили выявить дозы антикоагулянтов, вызывающие значимые изменения показателей коагуляционного гемостаза ($p < 0,05$). Определенные нами ЭД50 дабигатрана этексилата и ривароксабана приводят к ожидаемому антикоагулянтному эффекту. ТД50 препаратов способствуют развитию значительной гипокоагуляции и могут быть значимыми для прогнозирования риска развития геморрагических осложнений (табл. 2).

Таблица 2

Эффективные и токсические дозы гепарина натрия, дабигатрана этексилата и ривароксабана при их парентеральном введении (n=10)

Препарат	Доза	Кол-во животных с ожидаемым эффектом	Кол-во животных с токсическим эффектом	ЭД50	ТД50	ЭД16	ТД16	ШТД
Гепарин натрия (ЕД/кг)	100	0	0	328,48 ±78,44	644,38 ±98,58	80,42	423,94	5,27
	250	4	0					
	500	9	2					
	1000	10	10					
Дабигатран этексилат (мг/кг)	1,0	0	0	4,67 ±0,81	13,97 ±1,73	1,05	7,26	6,91
	2,5	0	0					
	4,0	4	0					
	5,0	8	0					
	7,5	9	3					
	10,0	9	3					
Ривароксабан (мг/кг)	15,0	10	5	4,66 ±0,55	8,06 ±0,89	2,52	5,24	2,08
	1,0	0	0					
	2,5	1	0					
	5,0	7	0					
	7,5	9	4					
	10,0	10	8					

Определение терапевтической широты фармакологических веществ (ШТД) производили по следующей формуле: $ШТД = ТД_{16} / ЕД_{16}$. Выявлено, что дабигатрана этексилат обладает большей терапевтической широтой ($7,26/1,05=6,91$), чем гепарин натрия ($423,94/80,42=5,27$) и ривароксабан ($5,24/2,52=2,08$).

Обсуждение результатов

Парентеральное применение таких антикоагулянтов, как дабигатрана этексилат и ривароксабан взамен НФГ и НМГ, при критических состояниях может быть перспективным ввиду наличия у препаратов гепарина ряда недостатков: гепарин-индуцированная тромбоцитопения, снижение уровня антитромбина III, гепаринорезистентность с последующими тромбозами. Следовательно, актуальным представляется исследование препаратов, обладающих таргетным и легкоуправляемым антикоагулянтным эффектом, чем, по данным литературы, и характеризуются высокоселективные ингибиторы IIa (дабигатрана этексилат) и Ха (ривароксабан) факторов свертывания крови [5, 7, 10].

В настоящей работе исследована эффективность и безопасность дабигатрана этексилата и ривароксабана при их подкожном введении крысам. В качестве препарата сравнения использовали гепарин натрия. Показано, что в первые 2 ч после введения гепарина натрия (250, 500, 1000 ед./кг), дабигатрана этексилата (4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 мг/кг) и ривароксабана (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 мг/кг) происходит выраженное снижение свертываемости крови. В результате статистического анализа выявлена высокая степень корреляции между показателями

коагуляционного гемостаза и длительности кровотечения, что свидетельствует о тесной связи между дозозависимым увеличением времени кровотечения и изменением показателей клоттинговых тестов. Кроме того, изучение зависимости исследуемых показателей позволило нам предположить, что для выявления ожидаемого антикоагулянтного эффекта, а также прогнозирования риска развития геморрагических осложнений после парентерального введения дабигатрана этексилата показательным является мониторинг свертываемости плазмы крови в тесте АЧТВ, а ривароксабана – в тесте ПВ. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, в которых показано увеличение АЧТВ и ПВ в ответ на пероральный прием дабигатрана этексилата и ривароксабана, причем в своих рекомендациях авторы подчеркивают наибольшую чувствительность АЧТВ для дабигатрана этексилата и ПВ для ривароксабана [5, 6].

При определении широты терапевтического действия исследуемых препаратов выявлено, что дабигатрана этексилат имеет большую терапевтическую широту, чем гепарин натрия и ривароксабан.

Таким образом, установлено, что дабигатрана этексилат обладает более управляемым терапевтическим эффектом при подкожном введении по сравнению с гепарином натрия и ривароксабаном. Полученные результаты могут служить обоснованием возможности разработки инъекционной лекарственной формы дабигатрана этексилата и могут быть использованы для совершенствования терапии критических состояний с высоким риском развития ДВС-синдрома в условиях чрезвычайных ситуаций и вооруженных конфликтов.

Выводы

1. Определены эффективные дозы (ЭД50) дабигатрана этексилата ($4,67 \pm 0,81$ мг/кг) и ривароксабана ($4,66 \pm 0,55$ мг/кг) при их подкожном введении.

2. С целью прогнозирования риска развития геморрагических последствий на фоне приема антикоагулянтных препаратов определены токсические дозы (ТД50) для дабигатрана этексилата ($13,97 \pm 1,73$ мг/кг) и ривароксабана ($8,06 \pm 0,89$ мг/кг) при их подкожном введении.

3. Дабигатрана этексилат превосходит по широте терапевтического действия гепарин натрия и ривароксабан, что может свидетельствовать о большей управляемости терапевтического эффекта.

4. Результаты исследования могут служить обоснованием возможности разработки инъекционной лекарственной формы дабигатрана этексилата для подкожного введения как наиболее безопасного среди исследованных препаратов.

Список литературы

1. Кубышкин А.В., Пылаева Н.Ю., Фомочкина И.И., Писарев А.А. Травма, гемостаз и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания: патогенетические механизмы нарушений гемокоагуляции // Клиническая патофизиология. – 2016. – Т. 22. – № 4. – С. 104-117.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. / Под общ. ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.
3. Саввин Ю.Н., Кудрявцев Б.П. Клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи пострадавшим с политравмой в чрезвычайных ситуациях. – М., 2015. – 66 с.
4. Шабанов В.Э., Саввин Ю.Н., Алексеев А.А. и др. Клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи пострадавшим с термической травмой в чрезвычайных ситуациях. – М., 2015. – 37 с.
5. Adcock D.M., Gosselin R. Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review // Thromb Res. – 2015. – V. 136, No. 1. – Pp. 7-12.

6. Baglin T., Keeling D., Kitchen S. Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology // British J. of Haematology. – 2012. – V. 159, No. 4. – Pp. 427-429.
7. East J.M., Cserti-Gazdewich C.M., Granton J.T. Heparin-induced thrombocytopenia in the critically ill patient // Chest. – 2017. – S. 0012-3692(17). – Pp. 33223-3.
8. Kadohira Y., Yamada S., Matsuura E., et al. Aortic aneurysm-associated disseminated intravascular coagulation that responded well to a switch from warfarin to rivaroxaban // Intern Med. – 2017. – V. 56, No. 21. – Pp. 2913-17.
9. Kawano H., Hata T., Uda A., Maemura K. Use of rivaroxaban for the effective management of disseminated intravascular coagulation associated with abdominal aortic aneurysm // Intern Med. – 2015. – V. 54. – Pp. 2625-28.
10. Linkins L.A., Dans A.L., Moores L.K., et al. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines // Chest. – 2012. – V. 141. – Pp. 495-530.
11. Maegele M., Schochl H., Cohen M.J. An update on the coagulopathy of trauma // Shock. – 2014. – V. 41. – Pp. 21-25.
12. Perzborn E., Hirth-Dietrich C., Fischer E., et al. Rivaroxaban has protective effects in a model of disseminated intravascular coagulation (DIC) in rats // Blood. – 2007. – V. 110. – P. 935.
13. Randrianarisoa E., Kopp H.G., Balletshofer B.M., et al. Management of disseminated intravascular coagulopathy with direct factor Xa inhibitor rivaroxaban in Klippel-Trenaunay syndrome // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2013. – V. 24, No. 7. – Pp. 766-770.
14. Yasumoto A., Ishiura R., Narushima M., Yatomi Y. Successful treatment with dabigatran for consumptive coagulopathy associated with extensive vascular malformations // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2017. – V. 28, No. 8. – Pp. 670-674.

References

1. Kubyshekin A.V., Pylyayeva N.Yu., Fomochkina I.I., Pisarev A.A. Travma, gemostaz i sindrom disseminirovannogo vnutrisosudistogo svertyvaniya: patogeneticheskie mekhanizmy narushenij gemokoagulyacii [Trauma, hemostasis and disseminated intravascular coagulation syndrome: pathogenic mechanisms of coagulation disorders]. Klinicheskaya patofiziologiya [Clinical pathophysiology]. 2016. V. 22. No. 4. Pp. 104-117. (In Russian).

2. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ch. 1 [Guidelines for preclinical research of drugs. Part I]. Ed. by Mironov A.N. Moscow: Grif i K. 2012. 944 p. (In Russian).
3. *Savvin Yu.N., Kudryavcev B.P.* Klinicheskie rekomendacii po okazaniyu medicinskoj pomoshchi postradavshim s politravmoj v chrezvychajnykh situatsiyah [The clinical guidelines for medical care delivery in polytrauma in emergency]. Moscow. 2015. 66 p. (In Russian).
4. *Shabanov V.Eh., Savvin Yu.N., Alekseev A.A., et al.* Klinicheskie rekomendacii po okazaniyu medicinskoj pomoshchi postradavshim s termicheskoy travmoj v chrezvychajnykh situatsiyah [The clinical guidelines for medical care delivery in thermal trauma in emergency]. Moscow. 2015. 37 p. (In Russian).
5. *Adcock D.M., Gosselin R.* Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. *Thromb Res.* 2015. V. 136, No. 1. Pp. 7-12.
6. *Baglin T., Keeling D., Kitchen S.* Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *British J. of Haematology.* 2012. V. 159, No. 4. Pp. 427-429.
7. *East J.M., Cseri-Gazdewich C.M., Granton J.T.* Heparin-induced thrombocytopenia in the critically ill patient. *Chest.* 2017. S. 0012-3692(17). Pp. 33223-3.
8. *Kadohira Y., Yamada S., Matsuura E., et al.* Aortic aneurysm-associated disseminated intravascular coagulation that responded well to a switch from warfarin to rivaroxaban. *Intern Med.* 2017. V. 56, No. 21. Pp. 2913-17.
9. *Kawano H., Hata T., Uda A., Maemura K.* Use of rivaroxaban for the effective management of disseminated intravascular coagulation associated with abdominal aortic aneurysm. *Intern Med.* 2015. V. 54. Pp. 2625-28.
10. *Linkins L.A., Dans A.L., Moores L.K., et al.* Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012. V. 141. Pp. 495-530.
11. *Maegele M., Schochl H., Cohen M.J.* An update on the coagulopathy of trauma. *Shock.* 2014. V. 41. Pp. 21-25.
12. *Perzborn E., Hirth-Dietrich C., Fischer E., et al.* Rivaroxaban has protective effects in a model of disseminated intravascular coagulation (DIC) in rats. *Blood.* 2007. V. 110. P. 935.
13. *Randrianarisoa E., Kopp H.G., Balletshofer B.M., et al.* Management of disseminated intravascular coagulopathy with direct factor Xa inhibitor rivaroxaban in Klippel-Trenaunay syndrome. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2013. V. 24, No. 7. Pp. 766-770.
14. *Yasumoto A., Ishiura R., Narushima M., Yatomi Y.* Successful treatment with dabigatran for consumptive coagulopathy associated with extensive vascular malformations. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2017. V. 28, No. 8. Pp. 670-674.

Experimental assessment of the risk of hemorrhagic complications following parenteral administration of direct anticoagulants: dabigatran etexilate and rivaroxaban

V.A. Pugach, M.A. Tyunin, E.A. Tarasov, A.S. Gogolevskiy, E.I. Strokina

We investigated the efficacy and safety of dabigatran etexilate and rivaroxaban after subcutaneous administration to rats. Heparin sodium was used as a reference drug. It was revealed that 2 hours following heparin sodium administration (250; 500; 1000 U/kg), dabigatran etexilate (4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 mg/kg) and rivaroxaban (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/kg) have pronounced anticoagulant effect. Heparin sodium (1000 U/kg) and rivaroxaban (10,0 mg/kg) caused a significant prolongation of rat tail bleeding time and a critical increase in parameters of blood coagulation. Dabigatran etexilate was shown to be of higher therapeutical possibility than heparin sodium and rivaroxaban. Our results can justify the development of injectable dosage form of dabigatran etexilate. It may be important to improve the treatment of critical states with high risk of disseminated intravascular coagulation in emergency and military conflicts.

Key words: dabigatran etexilate, rivaroxaban, hemorrhagic complications.



Иммуногенные липопептиды

А.Н. Белявцев^{1,2}, Л.И. Николаева¹, Н.С. Шастина², В.В. Куприянов³

¹ – ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

² – ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва

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

Контактная информация: Белявцев Александр Николаевич, belyavcev@mirea.ru

Липопротейны и липопептиды представляют собой амфифильные соединения. Липопептиды и их синтетические аналоги обладают биологической активностью *in vivo*: иммуномодулирующей, противоопухолевой, противовирусной, фунгицидной, бактерицидной и адъювантной. Синтетические липопептиды (как аналоги бактериальных) обладают адъювантными свойствами, могут вызывать продукцию цитокинов Th1- и Th2-профиля, усиливать функциональную активность CD8+ Т-клеток памяти и CD4+ Т-клеточную пролиферацию, что послужило причиной их использования при конструировании вакцинных препаратов.

Ключевые слова: свойства и получение липопептидов, адъювантные возможности.

Развитие методов анализа антигенных детерминант и конструирование синтетических пептидных антигенов делает возможным использование их в разработках вакцинных препаратов [5]. Возможно, в дальнейшем вакцинацию можно будет проводить искусственно сконструированными антигенами в комбинации с различными носителями и адъювантами для усиления иммунного ответа. При помощи синтетических пептидов можно вызвать образование мощного В- и Т-клеточного ответа на такие эпитопы, которые обычно при иммунизации цельными вирионами или их нативными антигенами оказываются малоэффективными [6, 8].

Поиск методов борьбы с бактериальными инфекциями стимулировал исследования по изучению строения различных бактерий. В результате был идентифицирован ряд биологически активных соединений и, в частности, бактериальные липопротейны и липопептиды. Бактерии синтезируют разнообразные липопротейны, роль которых в их репродукции еще не полностью изучена. Некоторые липопротейны являются естественными антибиотиками, основной механизм действия которых связан с нарушением функции бактериальных мембран [1, 21]. Установлено, что липопептиды и их синтетические аналоги обладают различной

биологической активностью *in vivo*: иммуномодулирующей, противоопухолевой, противовирусной, фунгицидной, бактерицидной и адъювантной [12, 22, 24, 29].

Липопротеины и липопептиды представляют собой амфифильные соединения, состоящие из более или менее гидрофильной полипептидной части, ковалентно связанной с липофильным фрагментом, содержащим алифатические углеводородные цепи. Поэтому липопротеины и липопептиды могут внедряться в липидный бислой клеточной мембраны и посредством пермеабиллизации локального участка мембраны способствовать проникновению внутрь клетки антигенных пептидов [14]. Липопептиды используются в качестве компонентов синтетических вакцинных препаратов [4, 11, 13, 33, 34].

Иммуногенные липопептиды можно получать разными способами: выделять из бактерий, получать полным химическим синтезом, синтезировать липидные компоненты и соединять их с аналогами фрагментов пептидных антигенов, получать в виде липомодифицированных рекомбинантных белков. Например, рекомбинантные белки, синтезируемые в *Escherichia coli* (*E. coli*), при наличии в своей структуре «липобокса» (последовательность аминокислот, инициирующая присоединение липидного остатка к цистеину) липидируются в процессе экспрессии [4, 10].

Синтез природного антигена, даже с короткой пептидной цепью и липидным фрагментом, многостадийен. Обычно используемые липопептидные конструкции состоят из линейных или разветвленных пептидов, содержащих детерминанты для CD4⁺ и CD8⁺

Т-клеток и/или для В-клеток, которые связываются с липидным фрагментом [32].

Липофильное производное цистеина можно получить из цистина с защищенными функциональными группами путем расщепления дисульфидной связи и дальнейшего присоединения глицеринового остатка к SH-группе цистеина, по которому далее вводятся пальмитиновые остатки [8].

Синтетический липопептид, по одной из схем синтеза, получают путем присоединения липидной части к пептидному фрагменту антигена при помощи пептидной связи, в образовании которой участвуют карбоксильная группа цистеина и аминогруппа N-концевого аминокислотного остатка пептида [31].

При синтезе Pam2Cys два пальмитиновых остатка связываются по гидроксильным группам аллилового эфира N-флуоренилметилоксикарбонил-S-[2,3-дигидрокси-(2R)-пропил]-(R)-цистеина [23], при синтезе Pam3Cys – третий пальмитиновый остаток замещает аминогруппу цистеина после снятия защитной 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группы.

Вместо цистеина в подобных соединениях можно эффективно использовать также аспарагиновую или янтарную кислоты. Насыщенные, неразветвленные остатки жирных кислот липопептидов могут быть представлены, помимо пальмитиновой кислоты, другими – например, капроновой, пеларгоновой, каприновой, ундекановой, лауриновой, тридекановой, миристиновой, пентадекановой, маргариновой, стеариновой, нонадекановой, арахидиновой и бегеновой кислотами.

Синтез пептидных фрагментов из 7-30 аминокислотных остатков удобнее проводить методом твердофазного синтеза с использованием 9-флуоренилметилоксикарбонильной защитной группы (Fmoc-стратегии). Очистку часто проводят методом гель-фильтрации на сефадексах в уксусной кислоте или более современными видами жидкостной хроматографии – быстрой (FPLC) или высокоэффективной хроматографией под давлением (HPLC).

На рисунке представлены варианты схем строения многовалентных липопептидных антигенных конструкций, использованных при создании кандидатной вакцины против вируса гриппа A/Puerto Rico 8/34 на основе эпитопов гемагглютинина [28].

Один из способов получения липопептидов заключается в культивировании бактерий-продуцентов с последующей ферментацией. Изменяя состав питательной среды, можно направленно регулировать процесс синтеза отдельных липопептидов.

Некоторые липопептиды обладают способностью активировать макрофаги и моноциты. Например, в *Mycoplasma fermentans* экспрессируется немитогенный мембранно-связанный гидрофобный липопептид-2 (MALP-2), активирующий макрофаги и имеющий структуру S-(2,3-бис-ацилоксипропил)

цистеин-GNNDENISFKEK [18]. Возможно, липопептиды, внедряясь в липидный бислой плазматической мембраны клетки, изменяют функции мембранных белков.

Синтетические липопептиды, аналоги N-терминальной части липопро-теина, выделенного из *E. coli*, являются сильными активаторами макрофагов и В-лимфоцитов [20].

Липопептидами также является новая группа антибиотиков, полученных из стрептомицетов, которые проявляют бактерицидную активность, имеют высокую активность в отношении грамположительных бактерий, включая полирезистентные стафилококки и энтерококки, по химическому строению они представляют собой циклические липопептиды [1]. Действие данных липопептидов направлено на формирование канала в клеточной стенке путем необратимого соединения гидрофобной части молекулы липопептида с клеточной мембраной грамположительных бактерий [3].

Пептидный компонент циклических липопептидов может быть устойчив к протеолизу в силу жесткости пептидного цикла и наличия в нем как необычных аминокислот, так и стереоизомеров аминокислот в D-конфигурации. Одним из представителей липопептидных антибиотиков является даптомицин [2].



Рис. Варианты схем строения многовалентных пептидных антигенов с липидной составляющей, представленные в легкой модификации [28]. Обозначение: серым отмечены В-клеточные эпитопы, черным – Т-хелперные эпитопы, К – остаток лизина.

Липопептиды как адъюванты стали активно применяться в конце прошлого столетия [26]. После открытия во второй половине XX века Toll-подобных рецепторов (TLR) и их лигандов стал проявляться механизм действия липопептидов как адъювантов [17]. Некоторые липопептиды бактерий распознаются TLR2 и TLR4, а также TLR1 и TLR6, что зависит от степени ацилирования N-концевого цистеина [25, 30]. Таким образом, липопептиды бактерий могут быть лигандами TLR, вызывать активацию антигенпрезентирующих клеток и влиять на интенсивность Т-клеточного ответа [27]. Существенную роль в активации TLR липопептидами выполняют ди- или триацильные производные S-цистеина на N-конце липопептида, которые являются паттернами патогенности [9, 25].

Синтетические липопептиды (аналоги бактериальных) также обладают адъювантными свойствами, могут вызывать продукцию цитокинов Th1- и Th2-профиля [16, 19], усиливать функциональную активность CD8⁺ Т-клеток памяти и CD4⁺ Т-клеточную пролиферацию [15].

Для оценки протективного потенциала разрабатываемых липопептидных конструкций необходимо развивать легко воспроизводимые стандартизованные методы количественного определения антиген-специфических Т-клеток и изучения их функционального профиля, сформировавшегося после иммунизации [7, 11, 13].

Заключение

Бактериальные липопротеины и липопептиды обладают широким спектром биологических эффектов, среди

которых наиболее значимыми для разработки вакцинных препаратов являются адъювантные свойства. Синтетические липопептиды (аналоги бактериальных) обладают адъювантными свойствами, могут вызывать продукцию цитокинов Th1- и Th2-профиля, усиливать функциональную активность CD8⁺ Т-клеток памяти и стимулировать дифференциацию и пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. Использование липидируемых пептидов в структуре рекомбинантных белков, содержащих последовательности антигенных эпитопов патогенных агентов, позволяет создавать самоадъювантные вакцины, формирующие специфический иммунный ответ.

Список литературы

1. Антибиотики и противоинфекционный иммунитет // Под ред. Юшука Н.Д., Балмасовой И.Л. – М.: Практическая медицина. – 2012. – 232 с.
2. Дехнич А.В., Данилов А.И. Даптомицин // Клиническая микробиология, антимикробиология и химиотерапия. – 2010. – Т. 12. – № 4. – С. 295-313.
3. Зверев В.В., Бойченко М.Н. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. – М: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – Т. 2. – 447 с.
4. Куприянов В.В., Николаева Л.И., Зыкова А.А., Махновский П.И., Котляров Р.Ю., Равин Н.А. Иммунологические свойства рекомбинантных мозаичных белков на основе антигенов NS4A и NS4B вируса гепатита С // Вопросы вирусологии. – 2018. – № 3. – С. 32-45.
5. Мойса А.А., Колесанова Е.Ф. Синтетические пептидные вакцины // Биомед. химия. – 2011. – Т. 57(1). – С. 14-30.
6. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2011. – 608 с.
7. Ройт А., Брестовф Дж., Мейл Д. Вакцинация // В кн.: Иммунология. – М.: Мир. – 2000. – С. 361-374.
8. Andreansky S.S., Stambas J., Thomas P.J., Xie W., Webby R.J., Doherty P.C. Consequences of immunodominant epitope deletion for minor

- influenza virus-specific CD8+ T-cell responses // J. Virology. – 2005. – V. 79(7). – Pp. 4329-39.
9. **BenMohamed L., Gras-Masse H., Tartar A., Daubersies P., Brahimi K., Bossus M., Thomas A., Druilhe P.** Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees // Eur. J. Immunol. – 1997. – V. 27(5). – Pp. 1242-1253.
10. **Chen H.-W., Liu S.-J., Liu H.H., Kwok Y., Lin C.L., Lin L.H., Chen M.Y., Tsai J.P., Chang L.S., Chiu F.F., Leng C.H., Chen H.W.** A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design // Vaccine. – 2009. – V. 27. – Pp. 1400-09.
11. **Chiang C.Y., Pan C.H., Chen M.Y., Hsieh C.H., Tsai J.P., Liu H.H., Liu S.J., Chong P., Leng C.H., Chen H.W.** Immunogenicity of a novel tetravalent vaccine formulation with four recombinant lipidated dengue envelope protein domain IIIs in mice // Sci. Rep. – 2016. – V. 6. – P. 30648. doi: 10.1038/srep30648.
12. **Chong H., Xue J., Xiong S., Cong Z., Ding X., Zhu Y., Liu Z., Chen T., Feng Y., He L., Guo Y., Wei Q., Zhou Y., Qin C., He Y.** A lipopeptide HIV-1/2 fusion inhibitor with highly potent *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* antiviral activity // J. Virol. – 2017. – V. 91(11). – pii: e00288-17. doi: 10.1128/JVI.00288-17.
13. **Chong P., Huang J.H., Leng C.H., Liu S.J., Chen H.W.** Recombinant lipoproteins as novel vaccines with intrinsic adjuvant // Adv. protein chem. struct. biol. – 2015. – V. 99. – Pp. 55-74. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.03.003.
14. **Gentil G.P., Ho N.I., Chiodo F., Meeuwenoord N., Ossendorp F., Overkleef H.S., van der Marel G.A., Filippov D.V.** Synthesis and evaluation of fluorescent Pam3Cys peptide conjugates // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2016. – V. 26(15). – Pp. 3641-45. doi: 10.1016/j.bmcl.
15. **Ghielmetti M., Zwicker M., Ghielmetti T., Simon M.M., Villiger P.M., Padovan E.** Synthetic bacterial lipopeptide analogs facilitate naive CD4+ T cell differentiation and enhance antigen-specific HLA-II-restricted responses // Eur. J. Immunol. – 2005. – V. 35(8). – Pp. 2434-42.
16. **Infante-Duarte C., Kamradt T.** Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice // Infect. Immun. – 1997. – V. 65(10). – Pp. 4094-99.
17. **Kaufmann A., Mührladt P.F., Gerns D., Sprenger H.** Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by Mycoplasma fermentans-derived lipoprotein MALP-2 // Infect. Immun. – 1999. – V. 67(12). – Pp. 6303-08.
18. **Kiura K., Kataoka H., Yasuda M., Inoue N., Shibata K.-I.** The diacylated lipopeptide FSL-1 induces TLR2-mediated Th2 responses // FEMS Immunol. & Medical Microbiol. – 2006. – V. 48(1). – Pp. 44-55.
19. **Lex A., Wiesmüller K.H., Jung G., Bessler W.G.** A synthetic analogue of *Escherichia coli* lipoprotein, tripalmitoyl pentapeptide, constitutes a potent immune adjuvant // J. Immunol. – 1986. – V. 137(8). – Pp. 2676-81.
20. **Maget-Dana R., Ptak M., Peypoux F., Michel G.** Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic // Biochim. Biophys. Acta. – 1985. – V. 815(3). – Pp. 405-409.
21. **Meena K.R., Kanwar S.S.** Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics // Biomed. Res. Int. – 2015. – V. 2015. – article ID 473050. – 9 p. doi: 10.1155/2015/473050.
22. **Metzger J.W., Wiesmüller K.-H., Jung G.** Synthesis of N-Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis // Int. J. Pep. Protein. Res. – 1991. – V. 38. – Pp. 545-554.
23. **Mührladt P.F., Kieß M., Meyer H., Süßmuth R., Jung G.** Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from mycoplasma fermentans acting at picomolar concentration // J. Exp. Med. – 1997. – V. 185. – Pp. 1951-58.
24. **Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – Pp. 13766-71.
25. **Reitermann A., Metzger J., Wiesmüller K.H., Jung G., Bessler W.G.** Lipopeptide derivatives of bacterial lipoprotein constitute potent immune adjuvants combined with or covalently coupled to antigen or hapten // Biol. Chem. Hoppe Seyler. – 1989. – V. 370(4). – Pp. 343-52.
26. **Revets H., Pynaert G., Grooten J., De Baetselier P.** Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses // J. Immunol. – 2005. – V. 174(2). – Pp. 1097-1103.

27. *Samayoa L., Diaz-Mitoma F., Azizi A.* Characterization of a branched lipopeptide candidate vaccine against influenza A/Puerto Rico 8/34 which is recognized by human B and T-cell immune responses // *Virlogy J.* – 2011. – V. 8. – Pp. 309-329.
28. *Stein U., Bergmann S., Scheffer G.L., Scheper R.J., Royer H.D., Schlag P.M., Walther W.* YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene // *Oncogene.* – 2005. – V. 24. – Pp. 3606-18.
29. *van Bergenhenegouwen J., Kraneveld A.D., Rutten L., Garssen J., Vos A.P., Hartog A.* Lipoproteins attenuate TLR2 and TLR4 activation by bacteria and bacterial ligands with differences in affinity and kinetics // *BMC Immunol.* – 2016. – V. 17(1). – Pp. 42-52.
30. *Wilkinson B.L., Malins L.R., Chun C.K., Payne R.J.* Synthesis of MUC1-lipopeptide chimeras // *Chem. Commun. (Camb.).* – 2010. – V. 46(34). – Pp. 6249-51.
31. *Zeng W., Chua B.Y., Grollo L., Jackson D.* Structural requirement for the agonist activity of the TLR2 ligand Pam2Cys // *Amino Acids.* – 2010. – V. 39(2). – Pp. 471-80.
32. *Zeng W., Ghosh S., Lau Y.F., Brown L.E., Jackson D.C.* Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuvanting immunocontraceptive vaccines // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169. – Pp. 4905-12.
33. *Zeng W., Horrocks K.J., Robevska G., Wong C.Y., Azzopardi K., Tauschek M., Robins-Browne R.M., Jackson D.C.* A modular approach to assembly of totally synthetic self-adjuvanting lipopeptide-based vaccines allows conformational epitope building // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – Pp.12944-51.
4. *Kupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Zyкова A.A., Mahnovskij P.I., Kotlyarov R.Yu., Ravin N.A.* Immunologicheskie svoystva rekombinantnykh mozaichnykh belkov na osnove antigenov NS4A i NS4V virusa gepatita C [Immunological properties of recombinant mosaic proteins based on NS4A and NS4B antigens of the hepatitis C virus]. *Voprosy virusologii* [Questions of Virology]. 2018. No. 3. Pp. 32-45. (In Russian).
5. *Mojsa A.A., Kolesanova E.F.* Sinteticheskie peptidnye vakciny [Synthetic peptide vaccines]. *Biomed. himiya* [Biomedical Chemistry]. 2011. T. 57(1). Pp. 14-30. (In Russian).
6. *Petrov R.V., Haitov R.M.* Immunogeny i vakciny novogo pokoleniya [Immunogens and vaccines of new generation]. Moscow: GEHOTAR-Media. 2011. 608 p. (In Russian).
7. *Roit A., Brostoff J., Meil D.* Vakcinaciya [Vaccination]. V kn.: *Immunologiya* [In the book: Immunology]. Moscow: Mir. 2000. Pp. 361-374. (In Russian).
8. *Andreansky S.S., Stambas J., Thomas P.J., Xie W., Webby R.J., Doherty P.C.* Consequences of immunodominant epitope deletion for minor influenza virus-specific CD8+ T-cell responses. *J. Virology.* 2005. V. 79(7). Pp. 4329-39.
9. *BenMohamed L., Gras-Masse H., Tartar A., Daubersies P., Brahimi K., Bossus M., Thomas A., Druilhe P.* Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. *Eur. J. Immunol.* 1997. V. 27(5). Pp. 1242-1253.
10. *Chen H.-W., Liu S.-J., Liu H.H., Kwok Y., Lin C.L., Lin L.H., Chen M.Y., Tsai J.P., Chang L.S., Chiu F.F., Leng C.H., Chen H.W.* A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. *Vaccine.* 2009. V. 27. Pp. 1400-09.
11. *Chiang C.Y., Pan C.H., Chen M.Y., Hsieh C.H., Tsai J.P., Liu H.H., Liu S.J., Chong P., Leng C.H., Chen H.W.* Immunogenicity of a novel tetravalent vaccine formulation with four recombinant lipidated dengue envelope protein domain IIIs in mice. *Sci Rep.* 2016. V. 6. P. 30648. doi: 10.1038/srep30648.
12. *Chong H., Xue J., Xiong S., Cong Z., Ding X., Zhu Y., Liu Z., Chen T., Feng Y., He L., Guo Y.* [Medical microbiology, virology and immunology]. Moscow: GEHOTAR-Media. 2010. V. 2. 447 p. (In Russian).

References

1. Antibiotiki i protivoinfekcionnyj immunitet [Antibiotics and anti-infectious immunity]. Ed. by Yushchuk N.D., Balmasova I.L. Moscow: Prakticheskaya medicina. 2012. 232 p. (In Russian).
2. *Dekhnich A.V., Danilov A.I.* Daptomicin [Daptomicin]. *Klinicheskaya mikrobiologiya, antimikrobiologiya i himioterapiya* [Clinical microbiology, antimicrobiology and chemotherapy]. 2010. V. 12. No. 4. Pp. 295-313. (In Russian).
3. *Zverev V.V., Bojchenko M.N.* Medicinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya

- Wei Q., Zhou Y., Qin C., He Y.* A lipopeptide HIV-1/2 fusion inhibitor with highly potent *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* antiviral activity. *J. Virol.* 2017. V. 91(11). pii: e00288-17. doi: 10.1128/JVI.00288-17.
13. *Chong P., Huang J.H., Leng C.H., Liu S.J., Chen H.W.* Recombinant lipoproteins as novel vaccines with intrinsic adjuvant. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2015. V. 99. Pp. 55-74. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.03.003.
14. *Gentile G.P., Ho N.I., Chiodo F., Meeuwenoord N., Ossendorp F., Overkleef H.S., van der Marel G.A., Filippov D.V.* Synthesis and evaluation of fluorescent Pam3Cys peptide conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016. V. 26(15). Pp. 3641-45. doi: 10.1016/j.bmcl.
15. *Ghielmetti M., Zwicker M., Ghielmetti T., Simon M.M., Villiger P.M., Padovan E.* Synthetic bacterial lipopeptide analogs facilitate naive CD4+ T cell differentiation and enhance antigen-specific HLA-II-restricted responses. *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35(8). Pp. 2434-42.
16. *Infante-Duarte C., Kamradt T.* Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice. *Infect. Immun.* 1997. V. 65(10). Pp. 4094-99.
17. *Kaufmann A., Muhlrad P.F., Gemsa D., Sprenger H.* Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by *Mycoplasma fermentans*-derived lipoprotein MALP-2. *Infect. Immun.* 1999. V. 67(12). Pp. 6303-08.
18. *Kiura K., Kataoka H., Yasuda M., Inoue N., Shibata K.-I.* The diacylated lipopeptide FSL-1 induces TLR2-mediated Th2 responses. *FEMS Immunol. & Medical. Microbiol.* 2006. V. 48(1). Pp. 44-55.
19. *Lex A., Wiesmüller K.H., Jung G., Bessler W.G.* A synthetic analogue of *Escherichia coli* lipoprotein, tripalmitoyl pentapeptide, constitutes a potent immune adjuvant. *J. Immunol.* 1986. V. 137(8). Pp. 2676-81.
20. *Maget-Dana R., Ptak M., Peypoux F., Michel G.* Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 815(3). Pp. 405-409.
21. *Meena K.R., Kanwar S.S.* Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. article ID 473050. 9 p. doi: 10.1155/2015/473050.
22. *Metzger J.W., Wiesmüller K.-H., Jung G.* Synthesis of N-Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis. *Int. J. Pep. Protein. Res.* 1991. V. 38. Pp. 545-554.
23. *Mühlrad P.F., Kieß M., Meyer H., Süßmuth R., Jung G.* Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. Pp. 1951-58.
24. *Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. Pp. 13766-71.
25. *Reitermann A., Metzger J., Wiesmüller K.H., Jung G., Bessler W.G.* Lipopeptide derivatives of bacterial lipoprotein constitute potent immune adjuvants combined with or covalently coupled to antigen or hapten. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 1989. V. 370(4). Pp. 343-352.
26. *Revets H., Pynaert G., Grooten J., De Baetselier P.* Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J. Immunol.* 2005. V. 174(2). Pp. 1097-1103.
27. *Samayoa L., Diaz-Mitoma F., Azizi A.* Characterization of a branched lipopeptide candidate vaccine against influenza A/Puerto Rico 8/34 which is recognized by human B and T-cell immune responses. *Virlogy J.* 2011. V. 8. Pp. 309-329.
28. *Stein U., Bergmann S., Scheffer G.L., Scheper R.J., Royer H.D., Schlag P.M., Walther W.* YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. *Oncogene.* 2005. V. 24. Pp. 3606-18.
29. *van Bergenhenegouwen J., Kraneveld A.D., Rutten L., Garssen J., Vos A.P., Hartog A.* Lipoproteins attenuate TLR2 and TLR4 activation by bacteria and bacterial ligands with differences in affinity and kinetics. *BMC Immunol.* 2016. V. 17(1). Pp. 42-52.
30. *Wilkinson B.L., Malins L.R., Chun C.K., Payne R.J.* Synthesis of MUC1-lipopeptide chimeras. *Chem. Commun. (Camb.).* 2010. V. 46(34). Pp. 6249-51.
31. *Zeng W., Chua B.Y., Grollo L., Jackson D.* Structural requirement for the agonist activity of

- the TLR2 ligand Pam2Cys. Amino Acids. 2010. V. 39(2). Pp. 471-80.
32. Zeng W., Ghosh S., Lau Y.F., Brown L.E., Jackson D.C. Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuvanting immunocontraceptive vaccines. J. Immunol. 2002. V. 169. Pp. 4905-12.
33. Zeng W., Horrocks K.J., Robevska G., Wong C.Y., Azzopardi K., Tauschek M., Robins-Browne R.M., Jackson D.C. A modular approach to assembly of totally synthetic self-adjuvanting lipopeptide-based vaccines allows conformational epitope building. J. Biol. Chem. 2011. V. 286. Pp. 12944-51.

Immunogenic lipopeptides

A.N. Belyavtsev, L.I. Nikolaeva, N.S. Shastina, V.V. Koupriyanov

Lipoproteins and lipopeptides are amphiphilic compounds. Lipopeptides and their synthetic analogs possess biological activities *in vivo*, so as immunomodulating, antitumor, antiviral, fungicidal, bactericidal and adjuvant activities. Synthetic lipopeptides (as bacterial analogs) have adjuvant properties, they can cause the production of Th1- and Th2-cytokines, enhance the functional activity of CD8+ T-memory cells and CD4+ T-cell proliferation, which has led to using lipopeptides in the design of vaccine preparations.

Key words: properties and production of lipopeptides, adjuvant ability.

1 октября 2018 года ушел из жизни профессор, доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточной и генной инженерии ВНИИФБиП с.-х. животных, ведущий научный сотрудник ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, член редсовета научного журнала «Биомедицина»

РЯБЫХ ВЛАДИМИР ПАВЛОВИЧ



Владимир Павлович Рябых родился 2 января 1942 года в с. Ил-Рождественское Первомайского района Тамбовской области. В 1964 году он окончил Мичуринский пединститут по специальности биология и основы сельского хозяйства. В 1970 году поступил в аспирантуру ВНИИФБиП с.-х. животных в лабораторию оплодотворения и в 1975 году защитил кандидатскую диссертацию. В 1977 году получил первого в СССР теленка-трансплантата.

В.П. Рябых стоял у истоков развития биотехнологии в России и за рубежом. В 2002 году он защитил докторскую диссертацию на тему: «Физиолого-эмбриологические аспекты биоинженерных технологий получения животных с заданными признаками». Основное направление исследований последующего периода – разработка высокоэффективных биоинженерных технологий получения животных с заданными признаками на основе достижений клеточной и генетической инженерии: были получены трансгенные кролики и мыши с заданными качествами. Последние несколько лет Владимир Павлович принимал активнейшее участие в получении трансгенных гуманизированных мышей-биомodelей для фармакологических и токсикологических исследований, проводимых в НЦБМТ ФМБА России, считая это направление одним из самых актуальных в области генно-инженерной биотехнологии.

Владимиром Павловичем было подготовлено более 10 кандидатов наук, опубликовано более 150 научных работ, получены авторские свидетельства и патенты на изобретения, его разработки много раз экспонировались на ВДНХ и были удостоены золотых и серебряных медалей. За многолетнюю плодотворную работу он был награжден почётной грамотой Президиума РАСХН.

Скорбим в связи с кончиной Владимира Павловича Рябых и выражаем глубокие соболезнования родным и близким. Память о нём навсегда сохранится в наших сердцах.

Лабораторкорм

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
полнораационные,
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



ЛАБОРАТОРИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

В лаборатории биоаналитических исследований (зав. лаб. – Дуля Максим Сергеевич) выполняются поисковые исследования сложных многокомпонентных объектов (ткани и биосреды животных, растительное сырьё, низкомолекулярные агенты) на современном высокоточном оборудовании, что обеспечивает получение глубокого понимания качественного и количественного состава изучаемых материалов, позволяет внедрять эффективные методы контроля в технологических процессах получения биологически активных веществ.

Задачи лаборатории:

- ✓ Профилирование мажорного и минорного белкового состава методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения, пептидное картирование (1290 QTOF 6545XT – источники ионизации ESI Dual Jet Stream, APCI, nano ESI);
- ✓ Скрининг и идентификация многокомпонентного состава сложных природных матриц методом ГХ-МС (Хроматэк Кристалл 5000, EI-ионизация, химионизация);
- ✓ Количественное определение активных веществ различной природы, определение фармакокинетических и статистических параметров методами ВЭЖХ-МС и ГХ-МС;
- ✓ Биоинформатический анализ;
- ✓ Разработка и валидация методов ВЭЖХ с разным типом детектирования для количественного и качественного анализа лекарственных препаратов (1260 LC с высокочувствительными флуориметрическим и диодно-матричным детекторами поглощения; автоматизация ввода проб с охлаждением и непрерывным анализом до 6144 образцов);
- ✓ Определение макромолекул (моноклональные антитела, ферменты и др. биологические препараты) иммунохимическими методами (ИФА), а также мультиплексный анализ ИФА на магнитных частицах Luminex MagPix (анализ цитокинов, хемокинов);
- ✓ Препаративное выделение активных веществ методом хроматографии на различных сорбентах со сбором фракций и последующей лиофилизацией (NGC Discovery, Bio-Rad);
- ✓ Целевая пробоподготовка с применением твердофазной экстракции (SPE, MEPS), тангенциальной фильтрации, гомогенизации, центрифугирования.

Коллектив лаборатории имеет более чем пятилетний опыт биоаналитических исследований широкого спектра, результаты которых регулярно публикуются в ведущих научных рецензируемых изданиях, руководствуется теоретико-методологическими основами в соответствии со стандартами GCP/GLP и другими нормативными документами, непрерывно совершенствует профессиональные навыки для поддержания их на высоком уровне.

Использование комплексного методического подхода позволяет НЦБМТ ФМБА России успешно разрабатывать и производить оригинальные фармакологические препараты и фармнутриенты.

