

2016

БИОМЕДИЦИНА

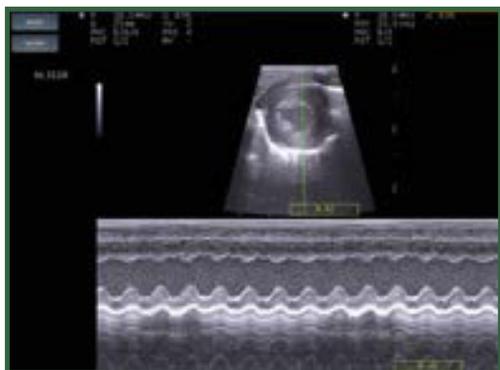
MEDICINE
ISSN 2074-5982

2016

3

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ



Научный журнал «Биомедицина»

ISSN PRINT: 2074-5982

Главный редактор: Н.Н.Каркищенко

Описание:

Научный журнал «Биомедицина» основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН (в настоящее время – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»). Журнал издается на русском и английском языках. В журнале публикуются исследования по новым биомедицинским технологиям, спортивной

медицине, новым регуляторным пептидам, спортивному питанию, лабораторным животным, методам биомедицинских исследований, генетике лабораторных животных, фармакологии и клинической фармакологии, восстановительной и спортивной медицине. Журнал предназначен для ученых, аспирантов, преподавателей и студентов ВУЗов, специалистов, работающих в области биологии, ветеринарии, медицины и биомедицины. В журнале опубликованы статьи авторов из 130 различных организаций (медицинских и биологических ВУЗов, НИИ, центров повышения квалификации специалистов), география организаций включает в себя Москву, Санкт-Петербург, Астрахань, Екатеринбург, Новосибирск, Томск, Ростов-на-Дону, Саратов, Кабардино-Балкарию, Хабаровск, Барнаул, Ярославль, Уфу, Белгород, Донецк, Армению, Нидерланды.

Импакт-фактор: 0,750

Индекс Хирша: 11

Полнотекстовая (бесплатная) версия журнала размещена на сайте Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России: <http://www.scbmt.ru>, а также в РИНЦ: <http://elibrary.ru/titles.asp>

Подписной индекс в общероссийском каталоге «Роспечать. Издания органов НТИ» – 57995

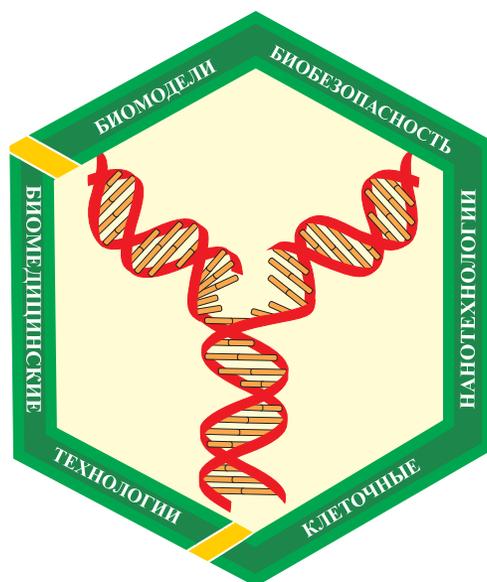
Научный журнал.

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 – март 2016 года)



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор академик **Н.Н. Каркищенко**
Зам. гл. редактора **В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов**
Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

Г.Д. Капанадзе, Светлые горы МО, **С.Л. Люблинский**, Обнинск, Калужская область,
Е.Л. Матвеев, Светлые горы МО, **А.Н. Мурашѐв**, Пущино МО,
С.Ю. Пчелинцев, Любучаны МО, **Г.В. Раменская**, Москва, **А.О. Ревякин**, Светлые горы МО,
В.П. Рябых, Боровск МО, **Х.Х. Семѐнов**, Светлые горы МО, **Д.А. Сычѐв**, Москва,
Ю.В. Фокин, Светлые горы МО, **Д.Б. Чайванов**, Москва, **Е.В. Ших**, Москва

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

К.В. Анохин, Москва, **Е.Е. Ачкасов**, Москва, **В.М. Баранов**, Москва, **А.Т. Быков**, Сочи,
Е.Ю. Бонитенко, Санкт-Петербург, **В. Влах**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск,
А.М. Дыгай, Томск, **А.Л. Зефир**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан,
В.Г. Кукес, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **Ю.С. Макляков**, Ростов-на-Дону,
А.И. Мирошников, Пущино МО, **В.Б. Назаров**, Москва, **С.В. Оковитый**, Санкт-Петербург,
В.Р. Рембовский, Санкт-Петербург, **В.П. Фисенко**, Москва, **Д.Ф. Хритинин**, Москва,
Б.Д. Цыганков, Москва, **В.И. Цысь**, Смоленск

Адрес редакции:

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

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

Отпечатано в типографии «Айсинг»
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18.
Подписано в печать 23.09.2016
Тираж 3 000 экз.

©2016, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семёнов, Е.Л. Матвеевко

Умеренная внутриутробная гипоксия плода как клинически значимая модель для изучения антигипоксической активности лекарственных средств.....4

С.В. Скальский, Т.Ф. Соколова, Д.А. Сычёв

Воздействие блокаторов медленных кальциевых каналов на функциональную активность перитонеальных клеток.....11

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Х.Х. Семёнов, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко

Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки млекопитающих (лабораторных крыс и мышей).....18

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

Т.И. Комбарова, Т.И. Рудницкая, Н.С. Грищенко, Е.А. Ганина, А.А. Котова, В.В. Кузин, В.Д. Потапов

Создание модели стрептококковой раневой инфекции у лабораторных мышей линии *BALB/c* и крыс *Wistar* путем внутрикожной инъекции.....24

С.В. Радько, С.В. Оковитый, А.Н. Куликов, Е.Ю. Чистякова

Модель оценки влияния фармакологических средств на динамику адаптации к физической нагрузке35

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.В. Дерюгина, А.В. Шумилова, Е.С. Филиппенко, Л.В. Бояринова, О.Д. Соловьёва

Экспериментальное исследование влияния Мексикора на показатели перекисного окисления липидов и двигательную функцию при черепно-мозговой травме у крыс.....43

П.А. Руденко, А.Н. Мурашёв

Эффективность использования пробиотиков на модели гнойно-воспалительного процесса у кошек.....49

А.В. Самородов, Ф.Х. Камилов, А.Р. Халимов, Е.Э. Клен, Ф.А. Халиуллин

Влияние новой калиевой соли на основе 3-тиетанилзамещенного триазола на систему гемостаза.....59

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, E.L. Matveyenko
Mild prenatal fetal hypoxia as clinically important model for the study of antihypoxic drugs activity4

S.V. Skalsky, T.F. Sokolova, D.A. Sychev
The impact of calcium channel blocking agents on peritoneal cells in simulation of adhesion formation in the abdominal cavity11

BIOMEDICAL METHODS

Kh.Kh. Semenov, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko
Research of consequences of impact of a sharp hypobaric hypoxia on male and female reproductive cells of mammals (laboratory rats and mice).....18

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

T.I. Kombarova, T.I. Rudnitskaya, N.S. Grishchenko, E.A. Ganina, A.A. Kotova, V.V. Kuzin, V.D. Potapov
Creating a model wound streptococcal infection among laboratory *BALB/c* mice and Wistar rats through intradermal injection24

S.V. Radko, S.V. Okovitiy, A.N. Kulikov, E.Yu. Chistyakova
The model of the impact assessment of pharmacological agents on the dynamics of adaptation to physical load35

NON-CLINICAL RESEARCHES

A.V. Deryugina, A.V. Shumilova, E.S. Filippenko, L.V. Boyarinova, O.D. Solov'eva
Experimental study on the effect of Mexicor indicators of lipid peroxidation and motor function in traumatic brain injury in rats.....43

P.A. Rudenko, A.N. Murashev
Efficiency of probiotic use on the model of pyoinflammatory process in cats.....49

A.V. Samorodov, F.Kh. Kamilov, A.R. Khalimov, E.E. Klen, F.A. Khaliullin
The study of new potassium salt based on 3-thietanil-substituted triazole in respect to hemostasis system..59



Умеренная внутриутробная гипоксия плода как клинически значимая модель для изучения антигипоксической активности лекарственных средств

Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семёнов, Е.Л. Матвеевко

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

Контактная информация: д.м.н. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Разработана клинически значимая модель для изучения антигипоксической активности лекарственных средств. Показано, что кратковременные повторные умеренные гипоксические воздействия (пребывание беременных самок крыс на 9-12 дни беременности в барокамере на высоте 9000 м ежедневно по 30 мин) вызывают отчетливую гипоксию плода, сопровождающуюся достоверным повышением показателя эмбриональной летальности к 20-21 дню беременности. Лекарственные средства с антигипоксической активностью триметазидин, актовегин, пирасетам при внутрижелудочном зондовом введении за 1 ч до начала гипоксического воздействия предупреждают индуцированный гипоксией рост эмбриональной летальности.

Ключевые слова: внутриутробная гипоксия плода, гипобарическая гипоксия, антигипоксанты.

Введение

Несмотря на то, что антигипоксанты как фармакологический класс известны с конца 60-х гг. прошлого века [1], в современной клинической медицине они используются крайне редко. Во многом это связано с отсутствием широко распространенных биомедицинских моделей гипоксических состояний, адекватных клинически значимым патологическим процессам и состояниям. Так, практически не реально перенести в клиническую практику результаты исследования антигипоксантов на критической для жизни гипоксии (как ги-

побарической, так и нормобарической), гиперкапнии, отравлении цианидами и метгемоглобинообразователями, критической кровопотере, а именно эти методы доклинического изучения антигипоксантов являются основными до настоящего времени [3].

Несколько ближе к клинической практике хирургические методы создания региональной или общей циркуляторной гипоксии (лигирование коронарных, позвоночных и мозговых сосудов, магистральных сосудов конечностей, сосудов брыжейки кишечника), но они не стандартизированы как методы из-

учения активности антигипоксантов, а их результаты зависят от вида и качества анестезии, отработанности хирургической техники и навыков оператора, выраженности коллатерального кровотока у животных и широкого круга других причин. Зачастую о степени антигипоксического действия препаратов можно судить лишь по косвенным показателям – в основном биохимическим и физиологическим, что также не вызывает оптимизма у многих исследователей.

Тем не менее, в организме человека и животных есть особая структура, высокочувствительная к гипоксическому воздействию, – эмбрион. Так, в современной гинекологии и педиатрии отмечают, что внутриутробная гипоксия плода разной степени выраженности или ее последствия встречаются в 10-15% случаев всех беременностей. К ассоциированной с внутриутробной гипоксией плода патологии относят различные неврологические расстройства, синдром гиперактивности с дефицитом внимания, отставание в умственном либо физическом развитии, различные психические и речевые патологии. К самым тяжелым последствиям гипоксии мозга плода относят детский церебральный паралич [4, 5].

У лабораторных животных также на стадии раннего органогенеза показана важная роль гипоксии в нарушении жизнеспособности эмбрионов [7].

В обширной литературе по изучению антигипоксической активности лекарственных средств мы не нашли источников, использующих такой подход.

В связи с этим, **целью** настоящего исследования была разработка методики оценки антигипоксической активности лекарственных средств на модели

внутриутробной гипоксии плода, вызываемой гипоксическим воздействием на беременную самку крысы.

Материалы и методы

Исследование выполнялось в два этапа. На первом этапе оценивалась сама модель внутриутробной гипоксии плода при воздействии гипобарической гипоксии на беременных самок крыс. При этом варьировались уровни гипоксического воздействия (барокамерный подъем на высоты 7000 и 9000 м) и кратность гипоксического воздействия (1, 2, 4). На втором этапе работы изучалось влияние лекарственных средств с антигипоксической активностью (триметазидин, актовегин и пираретам) на индуцированную гипоксией эмбриональную летальность у беременных самок.

Т.к. исследование выполнялось на беременных самках, на предварительном этапе стояла задача получить достаточное количество беременных самок с фиксированной продолжительностью беременности. Для этого виргинным самкам, содержащимся в изолированных клетках по одной особи в клетке, на ночь подсаживали самцов в соотношении 1:1, чтобы иметь фиксированную беременность. Для этого утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс отбирали и вели отсчет срока беременности. Учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводили путем вскрытия самок крыс на 20-й день беременности. В эмбриологический анализ не были включены самки, у которых полностью отсутствовали имплантаты. Таким образом, было исследовано 20 интактных (не подвергавшихся в последующем гипоксическому

воздействию) беременных самок крыс – по 10-11 самок на каждую точку гипоксического контроля и по 10 беременных самок на каждый исследуемый фармакологический препарат.

Показатель эмбриональной летальности на стадии органогенеза рассчитывался как отношение числа мертвых эмбрионов к числу мест имплантации (сумме количества живых и мертвых эмбрионов), определяемых при вскрытии самок на 20-й день беременности.

Гипоксическое воздействие создавалось в барокамере, в которой животные «поднимались» на заданную высоту (7000 или 9000 м) со скоростью «подъема» 165 м/с. Площадка пребывания в условиях гипоксического воздействия – 30 мин, после чего плавно возвращались с такой же скоростью к условиям нормоксии. Гипоксическое воздействие создавалось 1 раз в сутки на 9-й, 10-й, 11-й и 12-й дни беременности самок (в ходе первого этапа в отдельных группах исследовалось также влияние одно- и двукратного гипоксического воздействия). Выбор максимальной «высоты» 9000 м был обусловлен тем, что на этой высоте у здоровых крыс даже при пребывании в течение 2 ч не формируется летальная гипоксия (высотный порог для крыс этой линии составляет 11960 ± 460 м) [9].

Исследуемые препараты с антигипоксической активностью вводились внутривенно зондом в дозах, эквивалентных средним терапевтическим для человека (пираретам – 120 мг/кг, триметазидин – 0,5 мг/кг, актовегин – 40 мг/кг) в объеме 0,2 мл за 1 ч до начала барокамерного воздействия [2]. Контрольные животные получали эквивалентное количество физиологического раствора.

Антигипоксическая активность изучаемых препаратов в стандартных условиях оценивалась по критерию высотного порога, для достижения которого крысы «поднимались» в барокамере со скоростью 165 м/с до начальной площадки 9000 м (пороговая величина устойчивости для животных с наличием заболеваний или послеоперационных состояний), «пребывали» на этой «высоте» 5 мин (300 сек) и вновь «поднимались» со скоростью 165 м/с до следующей площадки на 1000 м выше, и так далее до фиксирования у животного агонального дыхания. Высота, на площадке которой было зафиксировано агональное дыхание, и является индивидуальным высотным порогом для данного животного.

Антигипоксическая активность изучаемых препаратов в экспериментальной модели оценивалась по индексу защиты (ИЗ), который показывает, какая часть изменений анализируемого показателя (в данном случае – эмбриональная летальность), возникающих под влиянием гипоксического воздействия, компенсировалась профилактическим введением данного лекарственного средства [8].

$$\text{ИЗ} = 100 * (\text{Хпл}-\text{Хпр}) / (\text{Хпл}-\text{Хф}),$$

где Хпл, Хпр, Хф – значения анализируемого параметра в плацебо-группе (воздействие фактора), при профилактическом введении препарата (препарат + воздействие фактора) и у интактных животных (фоновые данные) соответственно.

Статистическая обработка полученных результатов и оценка их достоверности проводилась по F-критерию методом дисперсионного факторного анализа (прикладной пакет «Анализ

данных» для табличного процессора Microsoft Excel 2010).

Лабораторные животные – виргинные самки крыс линии НУ/SmY (Sm – автор инбредной линии крыс Семёнов Х.Х.), полученные из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. На момент начала исследования масса животных составляла 180-205 г.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, 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), Strasburg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [6]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Результаты и их обсуждение

Исследование показало, что уровень спонтанной эмбриональной летальности у интактных (не подвергавшихся гипоксическому воздействию) самок крыс составляет $5,1 \pm 0,6$ (эмбриона на 100 мест имплантации), при коэффициенте вариации 37%.

Однократное гипоксическое воздействие оказывает существенное влияние на эмбриональную летальность (индуцированная эмбриональная летальность). Так, 30-минутное

«пребывание» беременных самок на 9-е сутки беременности на «высоте» 7000 м приводило к повышению уровня эмбриональной летальности в 2 раза ($10,4 \pm 1,3$ эмбриона на 100 мест имплантации, 204%, $p=0,0016$), а на «высоте» 9000 – почти в 3 раза ($14,7 \pm 2,1$ эмбриона на 100 мест имплантации, 288%, $p=0,0003$). По результатам факторного дисперсионного анализа можно полагать, что фактор уровня гипоксии играет существенную роль в повышении эмбриональной летальности (коэффициент детерминации модели $D=0,45$; $p=0,0003$), а уровень «высоты» 9000 м является достаточным для индукции эмбриональной летальности.

Для оценки влияния кратности гипоксического воздействия дальнейшие исследования проводились на «высоте» 9000 м. Однократное гипоксическое воздействие на 9-й день беременности характеризовалось уровнем индуцированной эмбриональной летальности в $14,7 \pm 2,1$ эмбриона на 100 мест имплантации. Двукратное гипоксическое воздействие (на 9-й и 10-й дни беременности) сопровождалось незначительным повышением уровня индуцированной эмбриональной летальности ($16,7 \pm 2,3$ эмбриона на 100 мест имплантации, 113%, недостоверно). Четырехкратное гипоксическое воздействие оказывало уже более выраженное индуцирующее влияние на уровень эмбриональной летальности ($25,9 \pm 5,0$ эмбриона на 100 мест имплантации, 176%, $p=0,05$). По результатам факторного дисперсионного анализа можно полагать, что фактор кратности гипоксического воздействия играет менее выраженную (по сравнению с уровнем гипоксии) роль в повышении эмбриональной ле-

тальности (коэффициент детерминации модели $D=0,19$; $p=0,05$), и четырехкратное гипоксическое воздействие является достаточным для индукции эмбриональной летальности.

Таким образом, проведенный первый этап исследования позволил отработать следующую модель изучения влияния гипоксического воздействия на индуцируемую эмбриональную летальность у самок крыс: на 9-12 дни беременности самки крыс подвергаются ежедневному гипоксическому воздействию («пробывание» в течение 30 мин на «высоте» 9000 м). Оценка эмбриональной летальности проводится на 20-й день беременности.

Второй этап исследования был посвящен оценке применимости модели внутриутробной гипоксии плода для изучения антигипоксической активности лекарственных средств. Анализируемые препараты (триметазидин, актовегин и пирацетам) оказывают выраженное

антигипоксическое действие, проявляющееся в повышении высотного порога устойчивости животных к гипоксии (рис. 1).

Анализ рис. 1 показывает, что в исследуемых дозах при однократном профилактическом введении за 1 ч до предельно переносимого гипоксического воздействия триметазидин и пирацетам обладают практически совпадающей антигипоксической активностью, а актовегин – несколько более высоким ее уровнем (повышение высотного порога на 3,5%).

В исследуемой экспериментальной модели антигипоксическая активность препаратов оценивалась по снижению индуцированной гипоксией эмбриональной летальностью (рис. 2).

Так, профилактическое введение триметазидина и актовегина проявлялось снижением уровня индуцированной эмбриональной летальности практически до уровня спонтанной

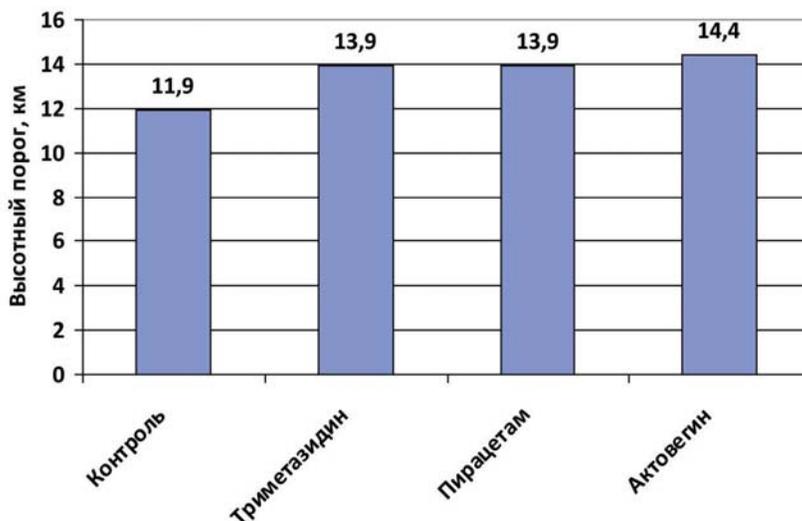


Рис. 1. Антигипоксическая активность исследуемых препаратов в тесте высотного порога.

(с 26,0 до 5,7 эмбрионов на 100 мест имплантации, при спонтанном уровне 5,1). Индекс защиты для этих двух препаратов был равен 97%. Антигипоксическая активность пирацетама в этом тесте была несколько ниже, 88% (снижение индуцированной эмбриональной летальности с 26,0 до 7,7 эмбрионов на 100 мест имплантации), но вполне сопоставимой с уровнем антигипоксической активности триметазида или актовегина. Возможно, их более высокая антигипоксическая активность в модели внутриутробной гипоксии плода может быть связана с более отчетливым влиянием на микроциркуляцию и реологические свойства крови.

Заключение

Таким образом, разработанная модель внутриутробной гипоксии плода (четырёхкратное 30-минутное гипоксическое воздействие с уровнем гипоксии 9000 м на 9-12 дни беременности самок крыс) по показателю индуцированной эмбриональной летальности отражает степень тяжести гипоксического повреждения эмбрионов на стадии раннего органогенеза. Фармакологические средства с доказанным антигипоксическим действием, такие как триметазидин, пирацетам и актовегин, при профилактическом введении за 1 ч до начала гипоксического воздействия практически полностью (индекс

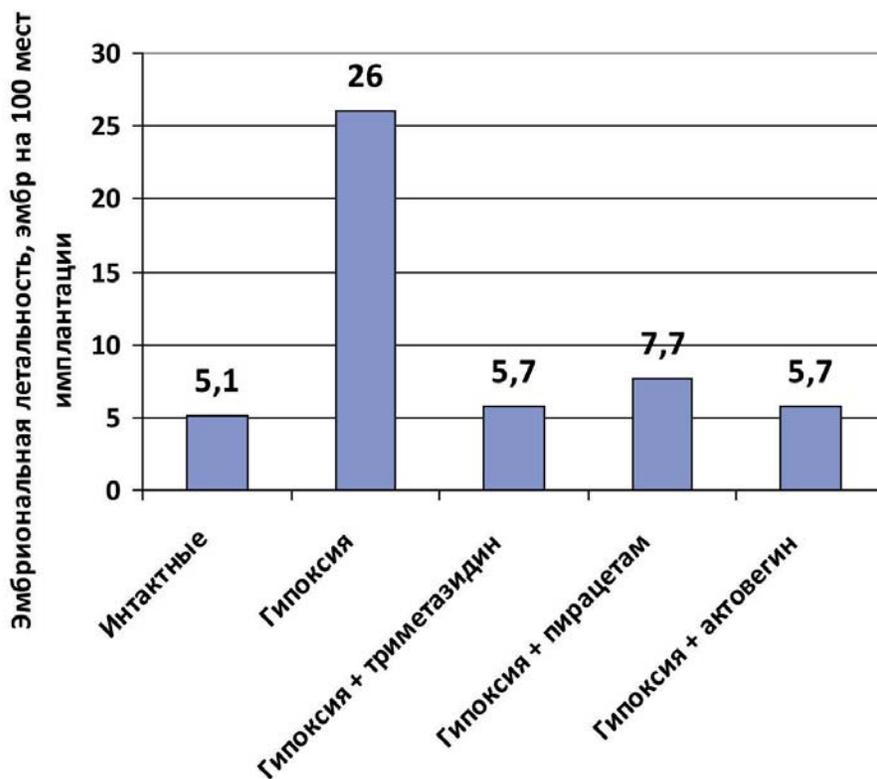


Рис. 2. Влияние антигипоксантов на индуцированную гипоксией эмбриональную летальность у беременных самок крыс.

защиты 88-97%) устраняют влияние гипоксического воздействия на эмбриональную летальность. Следовательно, данная модель может быть использована для доклинического исследования антигипоксической активности лекарственных средств на уровне формирующегося тканевого повреждения, что делает ее перспективной для экстраполяции полученных результатов на клиническую практику.

Список литературы

1. **Виноградов В.М.** Некоторые итоги и перспективы изучения гутимины – одного из первых антигипоксических средств / Фармакология амидиновых соединений. - Кишинев. 1972. С. 106-115.
2. **Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Оковитый С.В.** Очерки спортивной фармакологии. Т. 2. Векторы фармакопротекции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. - М., СПб.: Айсинг. 2014. 448 с.
3. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д. Лукьяновой. - М., 1990. 18 с.
4. **Микашинович З.И. и др.** Метаболические аспекты внутриутробной гипоксии плода при сердечно-сосудистой патологии у беременных. - Ростов-на-Дону. 2008. 158 с.
5. **Полянчикова О.Л.** Клинические и метаболические факторы в патогенезе задержки развития плода и выборе акушерской тактики / автореф. дисс....д.м.н.: М., 2010.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
7. **Семёнов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Матвеевко Е.Л., Капанадзе Г.Д.** Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. Сообщение 1. Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза на жизнеспособность эмбрионов у самок крыс и мышей // Биомедицина. 2012. № 3. С. 73-78.
8. **Шустов Е.Б.** Повышение устойчивости к экстремальным воздействиям при астении / автореф. дисс. ... д.м.н. - СПб: ВМедА. 1996. 38 с.
9. **Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семёнов Х.Х.** Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств // Биомедицина. 2013. № 4. С. 149-157.

Mild prenatal fetal hypoxia as clinically important model for the study of antihypoxic drugs activity

E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, E.L. Matveyenko

Clinically relevant model for the study of antihypoxic activity drugs was developed. It is shown that repeated short-term moderate hypoxic exposure (pregnant female rats on days 9-12 of gestation stay in the chamber at daily 9000 m altitude for 30 min) caused marked fetal hypoxia, accompanied by a significant increase in the higher rate of embryonic lethality to the 20-21 day of pregnancy. Antihypoxic activity drugs (Trimetazidine, Actovegin, Piracetam) introduced intragastric before 1 hour of hypoxia exposure prevent hypoxia-induced increase in embryonic lethality.

Key words: intrauterine fetal hypoxia, hypobaric hypoxia, antihypoxants.

Воздействие блокаторов медленных кальциевых каналов на функциональную активность перитонеальных клеток

С.В. Скальский¹, Т.Ф. Соколова¹, Д.А. Сычёв²

¹ – ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Омск

² – ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» МЗ РФ, Москва

Контактная информация: к.м.н. Скальский Сергей Викторович, sergscalskiy@mail.ru

Исследовали влияние блокаторов медленных кальциевых каналов – производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) на функции фибробластов и макрофагов в культуре клеток, активированных гемоперитонеумом. Установлено, что верапамил и дилтиазем снижают чрезмерную активность фибробластов и клеток микроокружения – мононуклеарных фагоцитов на стадии формирования спаек при гемоперитонеуме путем регуляции митотической активности перитонеальных фибробластов и макрофагальной трансформации моноцитов, ограничения избыточной продукции провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1. Наиболее эффективен верапамил: относительное уменьшение митотической активности фибробластов составляет 1,8 раза, макрофагальной трансформации моноцитов – в 1,3 раза, ограничение избыточной продукции TNF- α , IL-1 – в 1,5 и 2 раза соответственно выше, чем у дилтиазема. У нифедипина данный эффект отсутствует. Полученные результаты являются основанием для расширения представлений о фармакодинамике группы блокаторов медленных кальциевых каналов.

Ключевые слова: верапамил, дилтиазем, нифедипин, фибробласты, макрофаги.

Введение

Известна роль внутриклеточного ионизированного кальция (Ca^{2+}) в регуляции функции основных «строителей» соединительной ткани – фибробластов и клеток их микроокружения, а также хорошо изучена группа лекарственных средств, основной фармакодинамический эффект которых – снижение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме активно функционирующих клеток (блокаторы медленных кальциевых каналов (БМКК), или кальциевые антагонисты) [6, 10]. Литературные данные, свидетельствующие о наличии у БМКК фармакологических эффектов в отношении

функциональной активности фибробластов и макрофагов, неоднозначны и порой противоречивы [9, 11, 12]. С нашей точки зрения, они могут служить основанием для формулировки **цели** настоящего исследования, касающейся оценки влияния высокоспецифичных в отношении медленных кальциевых каналов групп препаратов БМКК: производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) на образование заместительной соединительной ткани путем регуляции функции фибробластов и макрофагов в культуре клеток на модели аутогемоперитонеума.

Материалы и методы

Оценку групп БМКК, которые представлены производными фенилаланина, бензотиазепина, дигидропиридина, в качестве регуляторов избыточного роста соединительной ткани проводили в культуре клеток.

Объектом исследования являлись активированные *in vivo*, при моделировании аутоперитонеума у крыс, фибробласты и макрофаги.

Исследования выполнены на 53 беспородных белых крысах массой 220-230 г, полученных из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). До и в период эксперимента животные контрольной и опытных групп содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой на стандартном рационе, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, Франция, 1986).

Для активирования перитонеальных клеток крысам в брюшную полость вводили аутокровь. На 10-е сутки после введения аутокрови проводилась оценка морфологических характеристик перитонеальных спаяк. Сразу после эвтаназии животного брюшную полость промывали 10 мл среды RPMI-1640 с антибиотиками и 10% раствором гепарина через прокол в каудальной трети белой линии живота. Образцы перитонеальных смывов центрифугировали при 800-1000 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеточных элементов, которые затем трижды отмывали средой RPMI-1640 («Sigma») с добавлением 10% эмбриональной

телячьей сыворотки, 2% глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Количество клеток в среде определяли методом подсчета в камере Горяева и довели концентрацию клеток до 2×10^6 /мл. Также подсчитывали число жизнеспособных клеток при окраске трипановым синим. Полученные суспензии содержали 89-95% живых клеток. Затем суспензию перитонеальных клеток, содержащую активированные фибробласты и клетки микроокружения, в т.ч. и активированные макрофаги, и др. клетки, делили на четыре одинаковых пула, составляющих исследовательские группы, и помещали в чашки Петри диаметром 40 мм с покровными стеклами, покрытыми синтетическим аналогом внеклеточного матрикса поли-D-лизином. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, глутамин, пенициллина и стрептомицина. Клетки первого пула культивировали в данной питательной среде без добавления лекарственных средств (группа 1). В культуры клеток 2-ой – 4-ой опытных групп добавляли раствор верапамила (группа 2), дилтиазема (группа 3) и нифедипина (группа 4) в дозе 0,1 мг/мл. Контролем служили клеточные культуры неактивированных фибробластов (группа 5), полученные от интактных крыс. Клетки инкубировали 24 ч при 37°C и в атмосфере 5% CO₂. По окончании культивирования среду сливали, центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин), в супернатантах определяли количество цитокинов. Покровные стекла промывали в растворе Хенкса, фиксировали, окрашивали по Романовскому-Гимза, подвергали цитологическому анализу

с оценкой пролиферативной активности моноцитов и макрофагов [1]. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов. Оценку митотической активности фибробластов проводили путем определения митотического индекса по формуле: $n/N \times 100\%$, где n – число клеток, вступивших в митоз, N – общее количество клеток. Микроскопию мазков проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа «Zeiss» (Германия) при иммерсионном увеличении $\times 1000$ (окуляр – $\times 10$, объектив – $\times 100$). В супернатантах клеточных культур определяли содержание фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкина- 1β (IL-1). Определение уровня цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем на основе видоспецифических моноклональных антител фирмы «Иммунотех» (Франция) на планшеточном фотометре «Multiscan» (Финляндия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов «Statistica 6.0 for Windows», биостатистика (StatSoft Inc., США) и MS Excel в среде Windows XP. Анализ характера распределения полученных данных осуществляли построением гистограмм с последующей проверкой на нормальность по критерию Шапиро-Уилка. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в тексте в виде $M \pm SE$, где M – среднее выборочное, SE – стандартная ошибка среднего. Для сравнения двух групп данных использовался t -тест (Стьюдента). Корреляционный анализ проводили с применением рангового коэффициен-

та корреляции Спирмена. Гипотезы различия считали статистически значимыми при значении уровня достоверности ниже 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Как показали наши исследования, пролиферативная активность неактивированных перитонеальных фибробластов и мононуклеарных фагоцитов в контрольной группе и активированных клеток без добавления лекарственных средств в культуральную среду (группа 1), а также при инкубации клеток с раствором верапамила (группа 2), дилтиазема (группа 3) и нифедипина (группа 4) была различной. Пролиферативная активность фибробластов группы 1 через сутки культивирования была высокой, митотический индекс превышал показатели контроля в 5,3 раза (табл.). Повышение пролиферативного ответа перитонеальных фибробластов крыс при гемоперитонеуме сочеталось с образованием в брюшной полости экспериментальных животных соединительнотканых спаек ($7,8 \pm 1,6$). Между показателем пролиферации фибробластов и числом спаек выявлено наличие сильной прямой корреляционной связи ($r = 0,9$; $p < 0,001$).

Исследование клеток микроокружения перитонеальных фибробластов (моноцитов и макрофагов) выявило, что моноциты в культуре клеток обладали высокой способностью к трансформации в макрофаги. Культивирование клеток системы мононуклеарных фагоцитов показало, что в течение 24 ч в среднем $60,5 \pm 3,1\%$ из них дифференцировалось в макрофаги, что в 2,5 раза превышало показатели контроля (табл.). Выявлено наличие прямой корреляци-

**Морфофункциональные характеристики перитонеальных фибробластов
и макрофагов крыс с гемоперитонеумом**

Группа	Митотический индекс, %	МТМ, %	TNF- α , пг/мл	IL-1, пг/мл
Контроль	2,3 \pm 0,2	24,1 \pm 5,2	17,1 \pm 1,8	14,9 \pm 2,1
1 (без препарата)	12,3 \pm 0,4*	60,5 \pm 3,1*	321,3 \pm 21,1*	54,4 \pm 4,2*
2 (верапамил)	5,1 \pm 0,1**	36,2 \pm 2,6**	97,4 \pm 6,8**	27,1 \pm 2,6**
3 (дилтиазем)	9,4 \pm 0,3**	47,3 \pm 2,9**	198,1 \pm 10,1**	39,8 \pm 2,3**
4 (нифедипин)	11,5 \pm 0,3	56,1 \pm 3,4	271,2 \pm 14,5	47,4 \pm 3,9

Примечание: * – достоверность различий показателей группы 1 и контроля, ** – достоверность различий показателей группы 1 и групп 2, 3, 4 (p<0,05).

онной связи ($r=0,8$; $p<0,01$) между показателем макрофагальной трансформации моноцитов (МТМ) и числом спаек у крыс с аутогемоперитонеумом. Активированные макрофаги в процессе кооперативных клеточных взаимодействий, через систему цитокинов, оказывают значимое для течения и исхода продуктивного воспаления влияние на фибробласты.

Сравнительный анализ показателей уровня провоспалительных цитокинов в культуральной жидкости активированных (группа 2) и неактивированных (контроль) макрофагов и фибробластов выявил статистически значимое увеличение содержания провоспалительных цитокинов в культурах активированных клеток. Наиболее выраженные отклонения от контроля регистрировались при определении уровня TNF- α , который превышал контрольные значения в 19 раз (табл.). Это согласуется с имеющимися представлениями о биологическом действии данного цитокина [2, 5]. Известно, что TNF- α участвует не только в защитных реакциях, но и в процессах деструкции и репарации,

сопутствующих воспалению. При длительном хроническом воспалении именно TNF- α является одним из медиаторов повреждения тканей. Активация фиброгенеза, выраженная на этапах завершения воспаления в стадии пролиферации и репарации, также может быть связана со способностью TNF- α индуцировать пролиферацию фибробластов и депозицию коллагена. Высокая концентрация TNF- α влечет за собой хроническое воспаление, деструкцию, способствует неблагоприятному течению патологического процесса и является ключевым фактором в развитии спаечной болезни [7].

Наряду с резким усилением выработки TNF- α , который индуцирует биосинтез теми же макрофагами и, в меньшей степени, фибробластами IL-1, у крыс группы 1 наблюдалось изменение уровня IL-1, которое достигало 3,6-кратного увеличения по сравнению с контролем (табл.). Известно, что на этапе пролиферации и завершения процесса воспаления полным восстановлением или замещением дефекта соединительной ткани с последующим образованием рубца, выработка IL-1 макрофагами

угнетается. Однако при избыточном образовании рубцовой ткани выработка IL-1 продолжается. IL-1 индуцирует пролиферацию фибробластов и такие изменения их функционирования, которые способствуют развитию фиброза [4]. Формирование рубцов, связанное с повышенным образованием грануляционной ткани, под влиянием IL-1 усиливается [3]. В нашем исследовании связь изменений содержания цитокинов с выраженностью спайкообразования у экспериментальных животных подтверждена результатами корреляционного анализа. Прямая корреляционная зависимость обнаружена между содержанием TNF- α и числом спаек, IL-1 β и числом спаек с коэффициентами корреляции 0,55 ($p < 0,05$) и 0,87 ($p < 0,01$) соответственно.

Введение верапамила в культуру клеток (группа 2) предотвращало чрезмерную активацию фибробластов и клеток микроокружения моноцитарно-макрофагального ряда (табл.). Митотическая активность фибробластов в результате действия верапамила снизилась на 59%. Сопоставление числа перитонеальных моноцитов, трансформировавшихся в макрофаги в культуре клеток групп 1 и 2, продемонстрировало двукратное снижение их способности к трансформации при введении препарата. Исследование уровней TNF- α и IL-1 в группах сравнения выявило, что введение верапамила предотвращало повышение содержания данных цитокинов, останавливая выработку TNF- α на уровне $97,4 \pm 6,8$ пг/л ($p < 0,01$), ИЛ-1 – $27,1 \pm 2,6$ пг/л ($p < 0,01$), которые были в 2 и 3 раза соответственно ниже, чем в культуре активированных фибробластов и макрофагов без верапамила.

Добавление в культуральную среду дилтиазема (группа 3) – так же, как и в группе с верапамилем – сопровождалось снижением гиперактивности фибробластов и макрофагов, однако фармакологический эффект дилтиазема был менее выражен. Пролиферативный ответ фибробластов и моноцитарных фагоцитов при действии дилтиазема уменьшался лишь на 23,4% и 21,8% соответственно. При контакте клеток с верапамилем эффективность его воздействия на фибробласты и клетки микроокружения была в 2,5-2,7 раза выше. Снижение уровней цитокинов также было менее значимо, чем при действии верапамила. Содержание TNF- α и ИЛ-1 в культуральной жидкости группы 3 было ниже, чем в группе 1, но в два раза превышало аналогичные показатели группы 2. Инкубация клеток с нифедипином сопровождалась отсутствием фармакологического эффекта, исследованные показатели в группах 1 и 4 статистически не различались. Данные различия объясняются разной фармакологической активностью БМКК, производных фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина, в отношении пролиферативной и белок-синтезирующей функций фибробластов и макрофагов, связанной, например, и с тем, что проникающие внутрь клетки-эффектора верапамил и дилтиазем, в отличие от нифедипина, имеют дополнительные рецепторы в мембране митохондрий [8].

Таким образом, сравнивая результаты действия высокоспецифичных в отношении медленных кальциевых каналов групп препаратов БМКК – производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) на функции активированных перитонеальных фибробластов

и макрофагов крыс с аутогемоперитонеумом в культуре клеток, можно считать, что наибольшей фармакологической эффективностью обладал верапамил. Под действием верапамила происходит снижение чрезмерной активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов, фибробластов, что вносит свой вклад в предотвращение избыточного образования соединительной ткани. Использование полученных данных о фармакодинамике классических представителей БМКК может служить основанием для расширения представлений о возможных областях использования этих лекарственных средств, а также о новых точках приложения их эффектов в отношении функционально активных клеток разной локализации и тканевой принадлежности.

Выводы

1. Верапамил и дилтиазем моделирует функциональную активность фибробластов и клеток микроокружения – мононуклеарных фагоцитов, снижая их чрезмерную активность на стадии формирования спаек при гемоперитонеуме путем регуляторного воздействия на митотическую активность перитонеальных фибробластов и макрофагальную трансформацию моноцитов. Нормализующий эффект верапамила на фибробласты составил 1,8 раза, на макрофаги – в 1,3 раза выше, чем у дилтиазема. Нифедипин не оказывал антипролиферативного действия на клетки.

2. Верапамил через блокаду медленных кальциевых каналов обеспечивает ограничение избыточной продукции провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 на этапе пролиферации и

завершения процесса воспаления при гемоперитонеуме. Фармакологический эффект дилтиазема по ограничению избыточной продукции TNF- α , IL-1 был соответственно в 1,5 и 2 раза менее выражен по сравнению с верапамилем. Нифедипин статистически значимо не изменял уровень цитокинов.

3. Полученные данные о выраженном нормализующем действии верапамила в отношении чрезмерной активности фибробластов и макрофагов в культуре перитонеальных клеток крыс с гемоперитонеумом являются патогенетическим обоснованием для дальнейшего исследования верапамила в качестве средства предупреждения спаечного процесса в брюшной полости.

Список литературы

1. Демченко Т.А. Определение феномена макрофагальной трансформации мононуклеарных клеток в культуре лейкоцитов крови для оценки иммунологического состояния организма // Методические рекомендации. - Л.: Ленуприздат. 1980. 14 с.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. - СПб: Фолиант. 2008. 549 с.
3. Пигарева Н.В., Королькова Т.Н., Симбирцев А.С. и др. Уровень цитокинов у пациентов с рубцами после акне // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2011. № 3. С. 3-6.
4. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. - СПб: Фолиант. 2011. 480 с.
5. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал. 2013. № 3. С. 18-41.
6. Харкевич Д.А. Фармакология. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010. 908 с.
7. Филленко Б.П., Земляной В.П., Борсак И.И., Иванов А.С. Спаечная болезнь: профилактика и лечение. - СПб. 2013. 171 с.
8. Boggio R.F., Freitas V.M., Cassiola F.M., Urabayashi M., Machado-Santelli G.M. Effect of a calcium-channel blocker (verapamil) on the

- morphology, cytoskeleton and collagenase activity of human skin fibroblasts // *Burns*. 2011. No. 37 (4). P. 616-25.
9. *Li Y., Ma X., Yu P., et al.* Intra-articular adhesion reduction after knee surgery in rabbits by calcium channel blockers // *Med. Sci. Monit.* 2014. Vol. 20. P. 2466-71.
10. *Luke J.J., Subhendu M., Kjetil A.* Janssen calcium homeostasis and ionic mechanisms in pulmonary fibroblasts // *Am J. of respiratory cell and molecular biology*. 2015. Vol. 53. No. 2. P. 135-148.
11. *Wang Z., Wang Y., Xie P., et al.* Calcium channel blockers in reduction of epidural fibrosis and dural adhesions in laminectomy rats // *Eur J. orthop. surg. traumatol.* 2014. No. 24(1). P. 293-821.
12. *Wang R., Mao Y., Zhang Z., et al.* Role of verapamil in preventing and treating hypertrophic scars and keloids // *Int. Wound J.* 2015; doi: 10.1111/iwj.12455.

The impact of calcium channel blocking agents on peritoneal cells in simulation of adhesion formation in the abdominal cavity

S.V. Skalsky, T.F. Sokolova, D.A. Sychev

It has been studied the impact of CCBA, the derivatives of phenylalkilamin (verapamil), benzothiazepine (diltiazem), dihydropyridine (nifedipine), on the function of fibroblasts and macrophages in cell culture in simulated adhesion formation. It was found that verapamil and diltiazem reduced the excessive activity of fibroblasts and mononuclear phagocytes at the stage of adhesion formation in hemoperitoneum by regulation of mitotic activity of peritoneal fibroblasts and macrophagal monocyte transformation and restriction of excessive production of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1. Verapamil was the most effective drug. Fibroblast mitotic activity was reduced by 1.8 times; and macrophage monocyte transformation was lower by 1.3 times, restricted by the excessive production of TNF- α , IL-1 in 1.5 and 2 times, respectively, that was considerably higher than in diltiazem application. No similar effect in nifedipine prescription. The results obtained are the pathogenetic rationale for further study of verapamil as a drug for prevention of adhesion development and recurrence in the abdominal cavity in clinics.

Key words: verapamil, diltiazem, nifedipine, fibroblasts, macrophages.



Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки млекопитающих (лабораторных крыс и мышей)

Х.Х. Семёнов, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко

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

Контактная информация: к.б.н. Семенов Хызыр Хыйсаевич, drsmx@yandex.ru

Проведено исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самок и самцов крыс и мышей. В эксперименте использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии *HY/SmY* и мыши линии *C57BL/6Y*, выведенные и поддерживаемые в НЦБМТ ФМБА России. Половозрелых самцов и самок крыс и мышей подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии и на 9-18 день постгипоксического периода спаривали (по видам). Для выявления последствий острого гипоксического стресса на половые клетки крыс и мышей проводили учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития, самок вскрывали на 19-20 дни беременности. Установлено, что при общей смертности эмбрионов в постимплантационном периоде, равной 48,11% у самок крыс и 49,71% – у самок мышей, доля смертности, обусловленная влиянием острой гипобарической гипоксии, составила 40,57% и 43,24% соответственно. Потери из числа овулировавших яйцеклеток на доимплантационной стадии развития у крыс равнялись 22%, у мышей – 8%. Таким образом, суммарные потери, вызванные воздействием острой гипобарической гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки, составили у самок крыс 62,57%, у самок мышей – 51,24%.

Ключевые слова: острая гипоксия, репродуктивные клетки, лабораторные крысы и мыши.

Введение

Окружающая нас атмосфера – главный источник существования всего живого на земле. От того, каким воздухом мы дышим, зависит наше самочувствие, предрасположенность к различным заболеваниям и, в конце концов, продолжительность самой жизни. Как известно, атмосфера представляет собой смесь газов, основными из которых являются азот – 78,09% и кислород – 20,95%. Од-

нако в городах, особенно крупных, на их соотношение вносят свои коррективы выхлопные газы машин, работа котельных и т.п. И в результате заметно ощущается разница между «городским» и «загородным» воздухом. О влиянии городского воздуха на развивающийся человеческий плод свидетельствуют исследования, проведенные среди регистрируемых беременностей у европейского населения планеты [1]. При этом

установлено, что 15% эмбрионов погибают на самых ранних стадиях развития (спонтанные аборты), 3% составляют мертворожденные, 2% – неонатальная смертность. Естественно, нет сомнения в том, что здесь сказывается влияние отрицательных факторов экологии в целом. Но вместе с тем известно также, что из всех стрессирующих воздействий, которым может быть подвержен зародыш в период внутриутробного развития, гипоксия является наиболее распространенным и клинически значимым, приводящим к эмбриологическим последствиям и различным патологиям развития.

На основании изложенного, **целью** настоящей работы было установить, вносит ли реальный вклад в эмбриональную смертность кратковременное воздействие острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки млекопитающих (лабораторных крыс и мышей).

Материалы и методы

В эксперименте использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии и мыши линии *C57BL/6Y*. И те, и другие поддерживаются в нашем Центре (НЦБМТ ФМБА России). Для исследования последствий влияния острой гипобарической гипоксии на мужские и женские репродуктивные клетки половозрелые крысы и мыши были подвержены ее воздействию. Сразу после проведения гипоксии к самцам крыс и мышей подсаживали интактных самок (по видам), с которыми они находились в течение недели, что необходимо для «очистки» их от зрелых сперматозоидов, скопившихся в семяприемнике от предыдущих стадий сперматогене-

за. На 9-18 дни постгипоксического периода самок и самцов ссаживали на ночь (в соотношении 1:1 у крыс и 2:1 у мышей), чтобы зафиксировать точный срок беременности. Утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс и влагалищных пробок у самок мышей отбирали и вели отсчет срока беременности. Для учета эмбриональной смертности в утробном периоде развития самок крыс вскрывали на 20-й день, самок мышей – на 19-й день беременности. В эмбриологический анализ не были включены самки обоих видов, у которых полностью отсутствовали имплантаты. Таким образом, было исследовано 40 самок крыс и 50 самок мышей в опыте и, соответственно, 30 и 40 самок в контроле.

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, 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 No. 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [2]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Исследования направлены на изучение последствий влияния острой гипобарической гипок-

сии на мужские и женские репродуктивные клетки лабораторных крыс и мышей.

Воздействие острой гипобарической гипоксии на крыс осуществляли в барокамере, при разрежении атмосферы 145 мм рт. ст., что соответствует высоте 11500 м над уровнем моря. «Подъем на высоту» длится 1 мин. У низкоустойчивых к гипоксии животных время жизни «на высоте» не превышает 60 сек, что, естественно, не может являться значимой мерой воздействия, способной оказать влияние на репродуктивные клетки. Поэтому после подъема крысы на критическую «высоту», и с момента, когда она начинает биться в агонию, во избежание гибели, ее «опускали» до предельной «высоты» 9000-9500 м и продолжали подвергать гипоксии, которая длилась 8-10 мин. Что касается воздействия острой гипобарической гипоксии на мышей, то оно отличалось от крыс только тем, что «высота» подъема для них не превышала 8000 м.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного эмбриологического анализа представлены в табл. и на рис. Эмбриологический анализ позволил установить, что число имплантатов на одну самку крыс в опыте составило в среднем 7,95, в контроле – 10,16; у мышей – 7,12 и 7,72 соответственно. Потери на доимплантационной стадии развития (Р), согласно расчету, произведенному по формуле:

$$P = \left(1 - \frac{\text{число имплантатов на 1 самку в опыте}}{\text{число имплантатов на 1 самку в контроле}}\right) \times 100$$

составили: у крыс – 22%, у мышей – 8%.

В определенной мере эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее [4] при цитологическом исследовании 3,5-дневных эмбрионов на доимплантационную смертность у мышей разных генотипов (101, В6 и СВА), подверженных влиянию мутагена (тио-ТЭФ). Если нормально развивающийся эмбрион на 4-е сутки достигает стадии бластоцисты (~64 бластомеров), то доминантные летали вызывают оста-

Таблица

Последствия влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки крыс и мышей

Показатель	Крысы		Мыши	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Число самок	40	30	50	40
Число мест имплантаций	318	305	356	309
Число эмбрионов на одну самку	7,95±0,35	10,16±0,21	7,12±0,17	7,72±0,19
Коэффициент вариации	29,60	22,30	23,71	21,70
Число живых эмбрионов	162	282	179	289
Среднее число эмбрионов на одну самку	4,05±0,23	9,40±0,18	3,56±0,21	7,22±0,2
Коэффициент вариации	47,15	21,75	49,10	17,45
Мертвых эмбрионов всего	153	23	177	20
% от общего числа	48,11	7,54	49,71	6,47
В т.ч. спонтанная эмбриональная смертность		7,54		6,47
В т.ч. % погибших от гипоксии	40,57		43,24	

новку дробления на стадиях 2-16 бластомеров. Доля эмбрионов, погибших до имплантации (остановившихся на стадиях 2-16 бластомеров), была максимальной у мышей высокочувствительного генотипа 101 (27,8%), несколько меньше – у В6 (21,0%) и минимальной – у СВА (12,5%). Различия между высоко- и низкоустойчивыми генотипами достоверны ($p=0,01$). Таким образом, повышенная смертность эмбрионов крыс на данной стадии развития обусловлена более высокой чувствительностью их генотипа к воздействию острой гипоксии. Вместе с тем смертность эмбрионов после имплантации считается точным критерием оценки частоты индуцированных доминантных леталей, независимо от средств индукции (химические мутагены, радиация, гипоксия и т.п.). В нашем эксперименте полученные данные по уровню постимплантационной эмбриональной смерт-

ности позволили установить высоко достоверную разницу ($p=0,001$) между опытными и контрольными группами у обоих видов лабораторных животных. Так, смертность эмбрионов на постимплантационной стадии развития у самок крыс опытной группы в целом составила 48,11%, у самок контрольной группы (спонтанная эмбриональная смертность) – 7,54%. Аналогичные показатели у мышей были равны 49,71% и 6,47% соответственно. Исходя из этого, реальная смертность эмбрионов после имплантации, обусловленная влиянием острой гипоксии у крыс, составила 40,57%, у мышей – 43,24%. Таким образом, суммарные потери из числа овулировавшихся яйцеклеток под воздействием острой гипобарической гипоксии были равны 62,57% у крыс и 51,24% у мышей.

На представленном рисунке наглядно иллюстрируются последствия влияния, оказанного острой гипобарической



Рис. Последствия влияния острой гипобарической гипоксии на потомство крыс, репродуктивные клетки которых были подвержены её воздействию. Остановка эмбрионов в развитии происходит: а – на 5-6-й день; в – на 8-9-й день; с – на 12-14-й день; d – на 15-17-й день; e – эмбрионы, пережившие гипоксию.

гипоксией на потомство крыс, репродуктивные клетки которых были подвергнуты ее воздействию. Сравнение с ранее полученными [2, 6] нами аналогичными данными, зафиксированными также в результате воздействия острой гипоксии, но раздельно на женские и мужские половые клетки, показывает, что по внешним проявлениям на эмбрионах видимых различий не наблюдается. Единственное отличие между ними в том, что при одновременном воздействии на половые клетки самок и самцов количество эмбрионов, погибших на более ранних стадиях развития (5-6 день), несколько выше, чем при раздельном воздействии. И это вполне объяснимо, поскольку в настоящем эксперименте зародыши подверглись двойному воздействию гипоксии (через материнские и отцовские гаметы). К тому же известно: чем выше доза фактора индукции, тем раньше прекращается дробление. Тио-ТЭФ в дозе 1,25 мг/кг вызвал остановку на стадии 2-16 бластомеров 27% эмбрионов, в дозе 2,5 мг/кг – 48% и в дозе 5мг/кг – 100% [5].

Выводы

Результаты проведенного исследования по изучению последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки лабораторных крыс и мышей убедительно показали ее существенное влияние на жизнеспособность потомства. Так, уровень смертности после имплантации под воздействием острой гипоксии у крыс составил 40,57%, у мышей – 43,24%. Доля потерь на до-

имплантационной стадии у самок крыс составила 22%, у мышей – 8%. Следовательно, суммарные потери из числа овулировавшихся яйцеклеток, обусловленные влиянием острой гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки, составили у крыс 62,57%, у мышей – 51,24%. Эмбриологический анализ показал также, что существенная доля зародышей погибает или непосредственно при имплантации, или спустя 2-3 дня, и представлена децидами.

Список литературы

1. *Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И.* Хромосомные нарушения и перинатальная смертность // В кн.: «Медицинская генетика». - М.: Медицина. 1984. С. 123-124.
2. *Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н.* Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей // Биомедицина. 2015. № 1. С. 60-65.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
4. *Малашенко А.М., Семенов Х.Х.* Роль генотипа самок в проявлении доминантных летальных мутаций, индуцированных тиофосфамидом в сперматиде самцов мышей // Генетика. 1980. Т. XVI. № 11. 2003 с.
5. *Малашенко А.М., Семенов Х.Х., Селезнева Г.П., Суркова Н.И.* Исследование мутагенного эффекта химических соединений на лабораторных мышах // Генетика. 1978. Т. 14. № 1. 52 с.
6. *Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н.* Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. Сообщение 2: Исследование последствий гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей // Биомедицина. 2014. № 2. С. 80-85.

Research of consequences of impact of a sharp hypobaric hypoxia on male and female reproductive cells of mammals (laboratory rats and mice)

Kh.Kh. Semenov, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko

A study of the effects of exposure to sharp hypobaric hypoxia on the reproductive cells of male and female rats and mice was held. In the experiment, low resistant to hypoxia *NY/SmY* lines of rats and mouse line *C57BL/6Y* had used, all of it was bred and maintained in SCBMT of FMBA of Russia. Sexually mature male and female rats and mice were exposed to acute hypobaric hypoxia on 9-18 day period posthypoxic mated (by type). To determine the effects of acute hypoxic stress in the germ cells of rats and mice to account embryonic mortality in the uterine period of development, the female opened by 19-20 days of pregnancy. It was found that the overall mortality in post-implantation embryos period, equal to 48.11% in female rats and 49.71% in female mice, the proportion of deaths due to the influence of acute hypoxia was 40.57% and 43.24%, respectively. Losses among the ovulated eggs in the pre-implantation stage of development in rats were 22%, in mice - 8%. Thus, the total loss caused by exposure to sharp hypobaric hypoxia exposure on male and female reproductive cells, accounted for 62.57% in female rats, in female mice - 51.24%.

Key words: sharp hypoxia, reproductive cells, laboratory rats and mice.



Создание модели стрептококковой раневой инфекции у лабораторных мышей линии *BALB/c* и крыс *Wistar* путем внутрикожной инъекции

Т.И. Комбарова, Т.И. Рудницкая, Н.С. Грищенко, Е.А. Ганина,
А.А. Котова, В.В. Кузин, В.Д. Потапов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Московская область

Контактная информация: Котова Анастасия Андреевна, fraukotova@mail.ru

Целью данной работы явилось создание с последующим исследованием раневой стрептококковой инфекционной модели, вызванной подкожным введением бактерий штамма *Streptococcus pyogenes* Dick-1 мышам линии *BALB/c* и крысам *Wistar*. Установлено, что масса тела и обсемененность органов животных при заражении культурой *S. pyogenes* Dick-1 являются одним из основных показателей физиологического состояния организма животного. Данные гистологического анализа подтверждают, что при внутрикожном заражении стрептококком происходит поражение эпидермиса и дермы с генерализацией патологического процесса в паренхиматозных органах (легких, селезенки, печени, почек). В ходе наблюдений за инфекционным процессом отмечалось значительное снижение обсемененности раневой поверхности у мышей к концу эксперимента, на 21-е сутки высевались единичные колонии. Анализ результатов показал, что распространение инфекции у мышей начинается с поражения легких, с 7-х суток происходит генерализация инфекции с проникновением в другие паренхиматозные органы. Смывы с раневой поверхности у крыс, напротив, показали значительную колонизацию кокками. Локализация очага инфекции происходила в легких, состояние других паренхиматозных органов оставалось в пределах нормы.

Ключевые слова: биомодель, раневая инфекция, внутрикожная инъекция, штамм *S. pyogenes* Dick-1, крысы, мыши.

Введение

Среди 18-ти видов и 8-ми родственных групп бактерий, причисленных к важнейшим патогенам человека, особую роль играют стрептококки [2]. Они впервые были обнаружены в тканях человека при рожистом воспалении и раневых инфекциях в 1984 г. Т. Биль-

ротом [8]. Род *Streptococcus* (семейство *Streptococcaceae*) включает в себя грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазо- и оксидазоотрицательные кокки, являющиеся факультативными анаэробами [7]. К факторам вирулентности микроорганизма относятся капсула из гиалуро-

новой кислоты, окружающая клетку микроорганизма, поверхностные белки (М-белок, F-белок, фактор апалесценции, стрептолизин S, стрептокиназа, С5а-пептидаза) и продукты, секретируемые в окружающую среду (стрептолизин O, гиалуронидаза, НАДаза, пирогенные экзотоксины) [7].

По медицинской значимости стрептококки занимают второе место после стафилококков [9]. Из числа стрептококков, патогенных для человека, с середины 80-х гг. XX столетия во многих странах мира наблюдается рост заболеваемости, обусловленной β -гемолитическими (вызывающими полный гемолиз) стрептококками группы А (БГСА, *S. pyogenes*) [11]. Заболевания, вызываемые стрептококковой флорой, проявляются в виде поражения дыхательных путей, кожных покровов и т.д. Вероятность возникновения гнойных осложнений при инфицировании стрептококками высока у лиц с ожогами, ранениями, беременных, новорожденных, больных после операций. Стрептококковые инфекции опасны склонностью к развитию постинфекционных осложнений со стороны различных органов и систем.

Изучение данной проблемы является актуальным, т.к. четкое понимание течения воспалительного процесса, вызванного стрептококковой инфекцией у животных, даст возможность разрабатывать более эффективные терапевтические препараты, применяемые при лечении данной инфекции у людей.

Целью данной работы явилось создание с последующим исследованием раневой стрептококковой инфекционной модели, вызванной подкожным вве-

дением бактерий штамма *Streptococcus pyogenes* Dick-1 мышам и крысам.

Задача исследования – изучить модели раневой стрептококковой инфекции с генерализацией процессов в паренхиматозных органах, вызванной референс-штаммом *Streptococcus pyogenes* Dick-1 у мышей линии BALB/c и у крыс Wistar, для скрининга основных принципов отбора новых лекарственных средств.

Материалы и методы

Микробиологические методы. В работе использовали штамм *S. pyogenes* Dick-1, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Для культивирования этого штамма применяли неселективные плотные питательные среды, инкубацию проводили при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч. Для получения суточной культуры стрептококка использовали плотную питательную среду, мясо-пептонный агар (МПА) серии 130 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) серии Б-15-01S. Проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры с помощью световой микроскопии, далее отбирали несколько однотипных, четко изолированных колоний, петлей переносили материал с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводили плотность инокулюма до 3 ед. по стандарту мутности Мак-Фарланда, что соответствует содержанию клеток $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл. Для подтверждения концентрации клеток в заражающей дозе делали высеив на плотные питательные среды – МПА с добавлением 10% сыворотки КРС серии Б-15-01S.

Лабораторные животные. Инбредные самки мышей линии *BALB/c* массой 18-20 г в возрасте 8-10 недель и аутбредные самки крыс Wistar массой 250-270 г в возрасте 10-12 недель были получены из питомника лабораторных животных «Андреевка» (филиал ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская обл.). Сертификат серии 1-3,27 № 03863 от 10.09.2015 г. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [6], согласно ветеринарному протоколу № 3-2015, утвержденному комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ. Животные соответствовали категории конвенциональных, их содержали в микроизоляторах (по 5 мышей и по 3 крысы) в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 20-24°C, относительная влажность 35-40%, освещение в помещениях – искусственное, с фиксированным режимом день-ночь). В качестве подстилки использовали древесные опилки нехвойных пород, в качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ 50258-92 производства ООО «Лабораторкорм». Водопроводная вода всем животным давалась в стандартных поилках. Животные потребляли корм и воду *ad libitum*.

Моделирование стрептококковой инфекции в кожно-мышечной ране. На левом боку мышей и крыс за сутки до заражения проводили удаление волосяного покрова машинкой для стрижки (GC545, Италия) на пло-

щади 1,5×1,5 см у мышей и 3×3 см у крыс. Инсулиновым шприцем мышам внутривожно вводили 0,1 мл суспензии клеток суточной культуры штамма *S. pyogenes* Dick-1 в двух дозах: 1,0×10⁸ и 1,0×10⁹ КОЕ/животное. Для создания кожно-мышечной раны у крыс использовали заражающую дозу 4,0×10⁹ КОЕ/животное. Введение осуществляли путем одновременных внутривожных инъекций заражающей суспензией в объеме 0,3 мл в две точки, расположенные на расстоянии 2 мм друг от друга, и подкожной инъекцией в объеме 0,1 мл суспензии клеток суточной культуры штамма *S. pyogenes* Dick-1.

Определение массы тела мышей после заражения. Взвешивание мышей проводили ежедневно в одно и то же время на весах ACCULFB V1-240 (США) с точностью до 0,1 г.

Определение бактериальной нагрузки на раневую поверхность. Проводили бактериологическое исследование смывов с поверхности раны. Для приготовления смыва в пробирку со стерильным ватным тампоном наливали 1 мл стерильного физ. раствора так, чтобы тампон находился над уровнем жидкости. Непосредственно перед взятием смыва увлажняли тампон, производили им концентрический смыв с площади 1 см² раневой поверхности и отмывали тампон в 1 мл физ. раствора, получая исходное разведение. Готовили ряд 10-кратных разведений и высеивали по 0,1 мл на чашки с плотной питательной средой.

Определение бактериальной нагрузки в органах животных. Для определения показателя КОЕ в органах мы-

шей органы-мишени гомогенизировали в стерильных ступках, добавляя 1 мл забуференного физ. раствора на один орган мышей и 5 мл – на один орган крыс, и высевали гомогенат методом 10-кратных разведений в забуференном физ. растворе на плотную питательную среду - № 1 ГРМ с добавлением 10% КРС. Для этого на поверхность среды в чашку Петри наносили 0,1 мл суспензии соответствующего разведения и тщательно растирали шпателем. Засеянные чашки инкубировали в термостате при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч. Подтверждение специфичности выросших колоний осуществляли с помощью окрашивания мазков по Граму с использованием световой микроскопии. Расчет КОЕ проводили методом подсчета колоний в соответствующем разведении. Экспериментальную погрешность определяли для каждого ряда из пяти чашек.

Оценка морфологических изменений в тканях ран и органах животных. После исследования микробной обсемененности ран у животных вырезали кожно-мышечный слой раны и кусочки паренхиматозных органов (легких, печени, селезенки), фиксировали в 10% растворе формалина.

Гистологические методы. Для фиксации органов животных использовали нейтральный 10% формалин. Отобранные для гистологического исследования кусочки органов обезжировали в этаноле и бутаноле увеличивающихся концентраций и заливали парафином. Срезы парафиновых блоков готовили на микротоме Reichert-Jung 820-II (США) и помещали на предметные стекла. Затем срезы де-

парафинировали в ксилоле, проводили в спиртах нисходящей концентрации, промывали водой, окрашивали гематоксилин-эозином и заключали в бальзам. Микроскопирование препаратов проводили на микроскопе Nikon Eclipse 80i (Япония), фотографировали препараты цифровой камерой Nikon DS-U2 (Япония) [4].

Статистические методы. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием общепринятых методов параметрической статистики (критерий Стьюдента) при помощи пакета Microsoft Excel 2007. Числовые данные приведены как среднее значение \pm ошибка среднего ($M \pm m_x$). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На основании литературных данных по отбору модели на генетически разнородных линиях мышей (*DBA/2*, *BALB/c*, *CBA*, *C3H/HeN*, *A/J*) для создания модели стрептококковой инфекции [10] были выбраны мыши линии *BALB/c*.

Изменение массы тела мышей в процессе наблюдения после заражения. Одним из основных показателей физиологического состояния организма животных после заражения является изменение их массы тела [3]. Результаты измерений интактных (без заражения) мышей и инфицированных штаммом *S. pyogenes* Dick-1 разными дозами (10^8 и 10^9 КОЕ/мышь) получены при ежедневном взвешивании животных в течение 21-х суток (рис. 1). Исходную массу определяли перед заражением мышей.

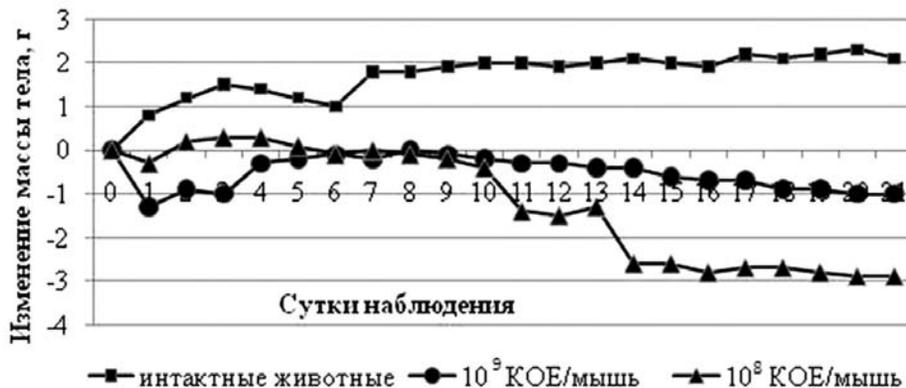


Рис. 1. Динамика изменений массы тела мышей, зараженных штаммом *S. pyogenes* Dick-1 в дозах 10^8 и 10^9 КОЕ/мышь, в качестве контроля использованы интактные (незараженные) мыши.

Как показано на рис. 1, при внутрикожном заражении стрептококком в дозе 10^8 КОЕ/мышь наблюдается снижение массы тела мышей с первых суток (по сравнению с интактными мышами) в результате формирования воспалительного процесса в месте введения инфекции. Со 2-х по 9-е сутки масса тела мышей – на исходном уровне, но меньше, чем у интактных мышей, что указывает на развитие инфекционного процесса. При дозе

заражения 10^9 КОЕ/мышь наблюдается потеря массы больше одного грамма, с восстановлением первоначальных значений к 6-м суткам при сформировавшейся ране, что показано на рис. 2. На 11-е сутки при заражении стрептококком в дозе 10^8 КОЕ/мышь происходит резкое снижение массы тела мышей (к 15-м суткам – до 2,5 г), и до конца наблюдений она не восстанавливается. Это связано с проникновением микроорганизмов в

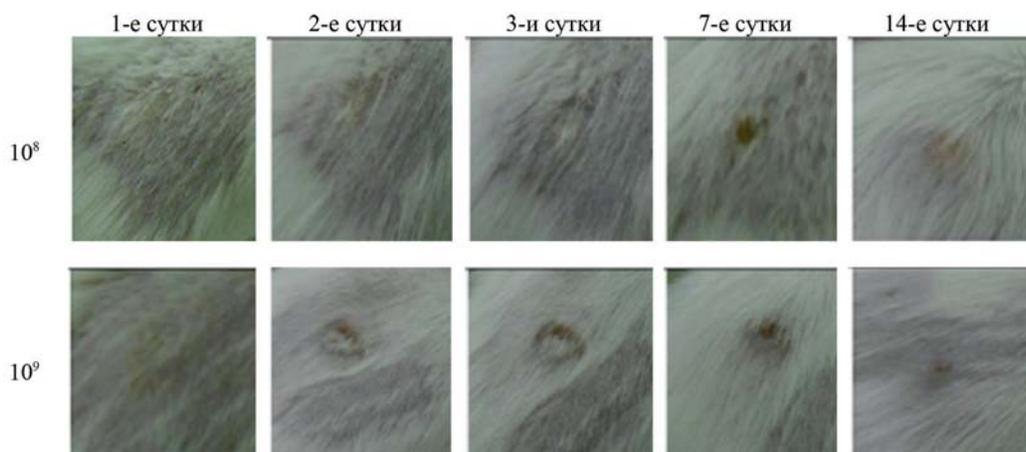


Рис. 2. Развитие раневой поверхности у мышей в течение 14-ти суток после внутрикожного введения бактериальных суспензий *S. pyogenes* Dick-1 в дозах 10^8 и 10^9 КОЕ/мышь, фотографии.

паренхиматозные органы, с выделением токсинов бактериями. Животные угнетены, меньше едят корм и пьют воду – соответственно, изменяется их вес.

Динамика заживления кожно-мышечной раны у мышей. Особое внимание при оценке стрептококковой раневой инфекции было уделено динамике изменений в кожно-мышечной ране при дозах заражения *S. pyogenes* Dick-1 10^8 и 10^9 КОЕ/мышь (рис. 2).

Для развития инфекционного процесса необходимо взаимодействие микроба и макроорганизма [6]. С этих позиций и будем рассматривать процесс колонизации и последующей микробной инвазии раневой поверхности.

Через 24 ч после заражения культурой *S. pyogenes* Dick-1 в дозах 10^8 и 10^9 КОЕ/мышь на месте введения образовалась папула с гиперемией кожного покрова и отеком около 5-6 мм вокруг места введения, а через 48 ч – прогрессирующий гнойно-воспалительный процесс с некротическим участком в месте введения. На 3-е сутки после заражения отмечали углубление некроза (диаметр некротической области составил 2-3 мм), цианоз окружающих тканей в месте введения и образование подкожной капсулы с гнойной инфильтрацией (при дозе заражения 10^9 КОЕ/мышь – менее выражена). К 7-м суткам происхо-

дит отторжение струпа и формирование грануляционной ткани. К 14-м суткам отмечено заживление раны, начало эпителизации пораженного участка и уменьшение внутрикожной капсулы с гнойной инфильтрацией (образование свища).

Микробная обсемененность раневой поверхности у мышей после инфицирования *S. pyogenes* Dick-1. Единственным и наиболее важным признаком инфицирования раны, по мнению Pruiitt В.А. [12], является присутствие микроорганизмов в необожженной ткани, что может сопровождаться воспалительными реакциями. Наблюдается плотный рост микробов в струпе и пространстве под струпом, а также вдоль волосяных фолликулов и потовых желез. Были проведены эксперименты с использованием штаммов *Staphylococcus aureus* 178, *Pseudomonas aeruginosa* 165, в которых показана зависимость величины заражающей дозы и интенсивности гнойно-некротического очага раневой поверхности. Процесс заживления наступает через 10 дней после заражения [5].

Для определения количества бактерий стрептококка методом смывов с раневой поверхности пробы отбирали на 2, 3, 7, 14 и 21-е сутки после заражения мышью (по 5 мышей на точку). Данные обсемененности раневой поверхности приведены в табл. 1.

Таблица 1

Динамика микробной обсемененности раневой поверхности у мышей после инфицирования стрептококками штамма *S. pyogenes* Dick-1

Доза заражения, КОЕ/мышь	Сутки наблюдения / Обсемененность раневой поверхности, КОЕ/мл				
	2	3	7	14	21
10^8	$1,6 \pm 0,3 \times 10^3$	$8,9 \pm 0,3 \times 10^2$	$1,2 \pm 0,7 \times 10^{3*}$	$2,4 \pm 1 \times 10^{2*}$	$4,1 \pm 1,2 \times 10$
10^9	$2,2 \pm 0,5 \times 10^3$	$2,7 \pm 1,1 \times 10^{3*}$	$3 \pm 0,8 \times 10^2$	$7,4 \pm 2,1 \times 10$	$0,5 \pm 0,5 \times 10^*$

Примечание: * – достоверность отличий от контрольной группы без лечения ($p < 0,05$).

Из представленных в табл. 1 данных следует, что при заражении *S. pyogenes* Dick-1 дозой 10^8 КОЕ/мышь мышей линии BALB/c обсемененность раневой поверхности со 2-х суток и по 7-е сохраняется на одном уровне. К 14-м суткам происходит снижение стрептококков на раневой поверхности. Колонизация раневой поверхности сохраняется до 21-х суток при заражении *S. pyogenes* Dick-1 дозой 10^8 КОЕ/мышь со снижением обсемененности до 300-500 КОЕ/мл. При заражении *S. pyogenes* Dick-1 дозой 10^9 КОЕ/мышь снижение концентрации бактерий на раневой поверхности наблюдается с 7-х суток, а к 21-м суткам высеваются единичные колонии.

Определение количества бактерий *S. pyogenes* Dick-1 и длительность их персистенции в паренхиматозных органах мышей. Наличие условно-патогенной микрофлоры в ране ниже определенной концентрации не приводит к клинически выраженному инфекционному процессу, и организм справляется с таким бактериальным загрязнением раны; устанавливается паритет между микрофлорой и защитно-приспособительными

возможностями организма. Активное размножение бактерий на фоне снижения компенсаторных возможностей макроорганизма приводит к развитию клинически выраженной генерализованной инфекции. Такое взаимодействие макро- и микроорганизма всегда проявляется местными и общими симптомами инфекции [1].

Высевы из гомогенатов паренхиматозных органов инфицированных животных показали, что штамм *S. pyogenes* Dick-1 при внутрикожном введении вызывал генерализацию инфекции у зараженных животных (табл. 2).

Для определения обсемененности паренхиматозных органов мышей, зараженных штаммом *S. pyogenes* Dick-1, на 3, 7, 14 и 21-е сутки проводили эвтаназию CO_2 -ингаляцией по 5 мышей из групп с разными дозами заражения. При патологоанатомическом вскрытии мышей отмечали увеличение лимфатического узла, прилежащего к месту введения патогена (левый паховый), а также внутрикожный карман (абсцесс) в месте введения культуры. С 7-х суток наблюдалась паренхиматозная дистрофия селезенки и печени и пневмоторакс легких (спадание).

Таблица 2

Динамика обсемененности паренхиматозных органов мышей, зараженных клетками штамма *S. pyogenes* Dick-1

Доза заражения, КОЕ/мышь	Орган	Сутки наблюдения / Обсемененность органа, КОЕ/орган			
		3	7	14	21
10^8	селезенка	0	$5,9 \pm 0,3 \times 10^2$	$1,6 \pm 0,7 \times 10^3$	$7,2 \pm 1,2 \times 10$
	печень	0	$6,4 \pm 0,2 \times 10^3$	$5,8 \pm 0,25 \times 10^3$	$4,0 \pm 0,27 \times 10^3$
	почки	0	$8,0 \pm 0,5 \times 10^3$	$2,1 \pm 0,3 \times 10^2$	0
	легкие	$1,3 \pm 0,12 \times 10^3$	$2,0 \pm 0,2 \times 10^3$	$1,5 \pm 0,1 \times 10^4$	$7,6 \pm 0,23 \times 10^4$
10^9	селезенка	0	$7,2 \pm 0,3 \times 10^2$	$2,1 \pm 0,3 \times 10^3$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^2$
	печень	0	$1,0 \pm 0,1 \times 10^4$	$1,6 \pm 0,15 \times 10^3$	$5,4 \pm 0,3 \times 10^2$
	почки	0	$7,3 \pm 0,4 \times 10^2$	$3,1 \pm 0,4 \times 10^2$	0
	легкие	$1,1 \pm 0,2 \times 10^3$	$8,2 \pm 0,4 \times 10^3$	$9,5 \pm 0,2 \times 10^4$	$1,5 \pm 0,14 \times 10^5$

Высевы из гомогенатов органов (селезенки, печени, легких) животных, зараженных стрептококком, показали, что уже на 3-и сутки обсемененность только в легких была на уровне $1,0 \times 10^3$ КОЕ/орган. К 7-м суткам инфекция проникала в другие органы (печень, селезенку) и сохранялась в течение всего времени наблюдения (см. табл. 2). Колонизацию стрептококком почек наблюдали с 7-х суток, но к 21-м суткам происходило самоочищение органа. Тогда как в легких за весь период наблюдения идет увеличение количества бактерий.

Морфологическое исследование раневой поверхности и паренхиматозных органов мышей, зараженных штаммом *S. pyogenes* Dick-1. Данные гистологического анализа свидетельствуют о том, что

при внутрикожном заражении стрептококком в раневой области на 7-е сутки наблюдается дефект эпидермиса и дермы, очаг ограничивается грануляционной тканью. При микроскопическом исследовании было выявлено, что гнойное воспаление с инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами распространяется в толщу мышечной ткани, приобретающая характер флегмонозного. В окружающих тканях и инфильтрате обнаружено большое скопление кокков (рис. 3).

В селезенке и печени имела место интенсивная диффузная и очаговая инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами с гибелью отдельных клеток инфильтрата и очаговое скопление кокков (рис. 4А и рис. 4Б).

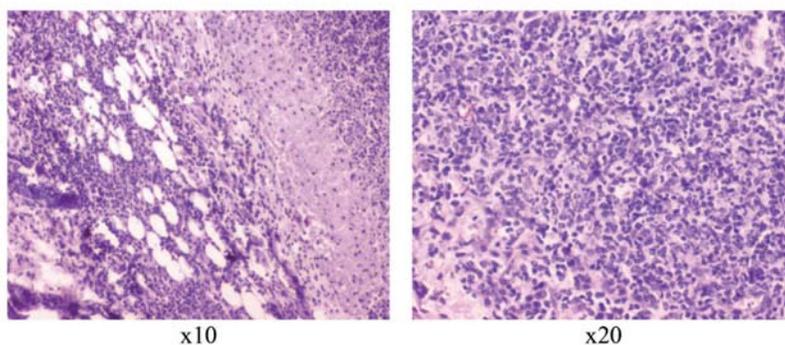


Рис. 3. Гистологический срез участка раневой поверхности мыши, зараженной штаммом *S. pyogenes* Dick-1 в дозе 10^9 КОЕ/мышь.

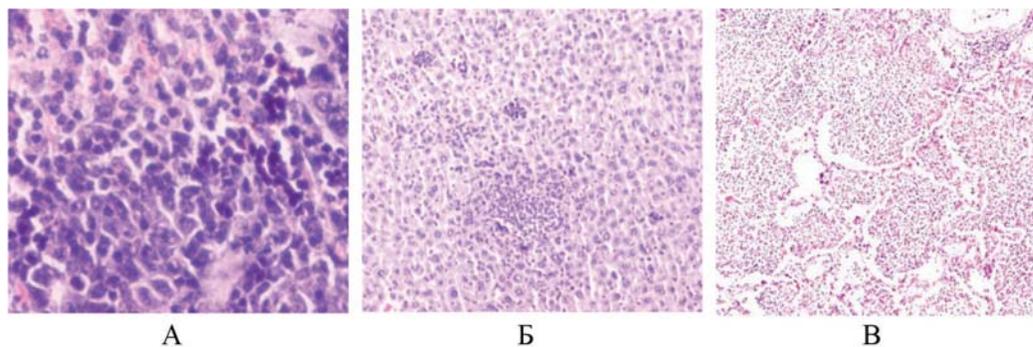


Рис. 4. Гистологический срез паренхиматозных органов мышей с раневой инфекцией, вызванной штаммом *S. pyogenes* Dick-1 в дозе 10^9 КОЕ/мышь: А – селезенка; Б – печень; В – легкие.

В гистологических срезах легких мышей, зараженных стрептококком, видно, что просвет альвеол заполнен экссудатом – сетчатыми массами фибрина и нейтрофильными лейкоцитами. Экссудат неплотно прилегает к стенкам альвеол (местами видны щелевидные просветы), по межальвеолярным ходам распространяется на соседние группы альвеол. В межальвеолярных перегородках отмечаются гиперемия сосудов, стаз, отек стромы и скопление кокков. В просвете части мелких сосудов – тромбы (рис. 4В).

Модель раневой инфекции при внутрикожном введении суспензии клеток штамма *S. pyogenes* Dick-1 аутобредным крысам. При создании модели раневой инфекции при формировании гнойно-некротического процесса в месте внутрикожного введения аутобредным крысам Wistar вводили суспензию клеток штамма *S. pyogenes* Dick-1. Инфицирование проводили дозой $4,0 \times 10^8$ КОЕ/крысу в две точки внутрикожно (0,3 мл) и в одну точку – подкожно (0,1 мл). В течение периода наблюдения поведенческие реакции (двигательная, пищевая активность) всех инфицированных крыс соответствовали норме.

При заражении крыс процесс формирования гнойно-некротического очага протекает так же, как при создании раневой инфекции у мышей.

Через 24 ч после заражения стрептококком на месте введения начинается воспалительный процесс с гиперемией кожного покрова и отеком около 1-2 см вокруг места введения. К 7-м суткам происходит отторжение струпа и формирование грануляционной ткани, по краям дефекта начинается формирование эпидермиса. К 14-м суткам отмечено заживление раны, эпителизация пораженного участка и замещение воспалительного дефекта созревающей грануляционной тканью, уменьшение внутрикожной капсулы с гнойной инфильтрацией (образование свища).

Оценка обсемененности раневой поверхности на 7-е и 14-е сутки выявила, что количество микроорганизмов, смытых с раны, незначительно увеличилось на протяжении наблюдений и составило $3,0 \times 10^3$ – $1,4 \times 10^4$ КОЕ на 7-е сутки и $5,4 \times 10^4$ КОЕ на 14-е сутки. При патологоанатомическом вскрытии трех крыс отмечали, что состояние селезенки и печени было в пределах нормы, а лег-



7-е сутки



14-е сутки

Рис. 5. Изменение состояния раневой поверхности у крыс после внутрикожно-подкожного введения бактериальной суспензии штамма *S. pyogenes* Dick-1 в дозе 4×10^8 КОЕ/животное, фотографии.

кие гиперемированы с очаговыми кровоизлияниями и на 7-е, и на 14-е сутки. При высеве из легких зараженных крыс методом мазков-отпечатков на селективные среды наблюдали рост колоний стрептококка, чего не наблюдалось при высеве из печени и селезенки.

Выводы

1. Масса тела мышей при заражении культурой *S. pyogenes* Dick-1 является одним из основных показателей физиологического состояния организма животного. Экспериментально показано, что на 11-е сутки при заражении стрептококком в дозе 10^8 КОЕ/мышь происходит резкое падение массы тела на 2,5 г. С 15-х суток и до конца наблюдения данный показатель не восстанавливался.

2. При заражении стрептококком в дозах 10^8 и 10^9 КОЕ/мышь формирование кожного дефекта наступало с первых суток. С 14-х суток наблюдалось заживление и начало эпителизации пораженного участка и уменьшение внутрикожной капсулы с гнойной инфильтрацией (образование свища).

3. Обсемененность стрептококком раневой поверхности мышей линии BALB/c значительно снижалась за период наблюдения, и на 21-е сутки высевались единичные колонии.

4. Высевы из гомогенатов легких мышей, зараженных стрептококком, показали, что на 3-и сутки обсемененность легких составляла $1,0 \times 10^3$ КОЕ/орган. С 7-х суток инфекция проникала в другие паренхиматозные органы (печень, селезенку, почки) и сохранялась в течение всего времени наблюдения с уменьшением концентрации бактерий, т.е. 21 сутки.

5. Данные гистологического анализа подтверждают, что при внутрикожном заражении стрептококком происходит поражение эпидермиса и дермы и генерализация патологического процесса в паренхиматозных органах.

6. При создании стрептококковой раневой инфекции у крыс Wistar наблюдали воспалительный процесс в месте введения с поражением эпидермиса и дермы. Смывы с раневой поверхности показали значительную колонизацию кокками. Генерализация инфекции происходит с поражением легких.

7. Штамм *S. pyogenes* Dick-1 позволил смоделировать раневую инфекцию у мышей линии BALB/c и аутбредных крыс Wistar. Четкое понимание развития стрептококковой инфекции на животных-моделях поможет при разработке более эффективных терапевтических методов, применяемых для лечения стрептококковой инфекции у человека.

Список литературы

1. Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Бобровников А.Э., Лагвилава М.Г., Яковлев В.П., Терехова Р.И. Диагностика раневой ожоговой инфекции. Методическая разработка. - М. 2009. С. 1-19.
2. Ильясов Ю.Ю., Лыгина Е.С., Дмитриев А.В. Спектр антибиотикорезистентности клинических изолятов стрептококков групп С и G, патогенных для человека // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013. № 15(3). С. 235-238.
3. Комбарова Т.И., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Борзилов А.И., Коробова О.В., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Мокриевич А.Н. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. № 71(4). С. 54-62.
4. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. - СПб: Спецлит. 2010. 95 с.

5. Пушкина Т.В., Крылова Л.Ю., Шарапова С.А., Чичерина Л.А., Кузина О.С. Экспериментальная оценка химиотерапевтической эффективности и токсичности новой лекарственной формы диоксидина – мази «лидокси-коль» // Химико-фармацевтический журнал. 2008. № 42(7). С. 34-37.
6. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. - Washington, DC: National Academy Press. Copyright 1996. ISBN 0-309-05377-3.
7. Шпынев К.В., Кречикова О.И., Кречиков В.А., Козлов Р.С. *Streptococcus pyogenes* характеристика микроорганизма, выделение, идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2007. № 9(2). С. 104-120.
8. Brock T.D. Milestones in microbiology. ASM Press. 1999. P. 1546-1940.
9. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A. Gram-positive pathogens. ASM Press. Washington, DC. 2000. 849 p.
10. Goldmann O., Gursharan S. Chhatwal & Eva. Role of host genetic factors in susceptibility to group A streptococcal infections // Medina Indian J. Med. Res. 2004. No. 119. P. 141-143.
11. Lindahl G., Stalhammar-Carlemalm M., Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens // Clin. microbial. reviews. 2005. No. 18(1). P. 102-127.
12. Pruitt B.A. Burns and soft tissues // Infection and the surgical patient. Ed. by Polk H.C. - Churchill Livingstone. 1982. Vol. 4. P. 113-131.

Creating a model wound streptococcal infection among laboratory *BALB/c* mice and Wistar rats through intradermal injection

T.I. Kombarova, T.I. Rudnitskaya, N.S. Grishchenko, E.A. Ganina, A.A. Kotova, V.V. Kuzin, V.D. Potapov

The aim of this work was the establishment of a subsequent investigation of streptococcal wound infection model induced by subcutaneous administration of the bacteria strain of *Streptococcus pyogenes* Dick-1 by *BALB/c* mice and Wistar rats. As a result of experiments, it was found that the weight and organ colonization of animals infected with the culture *S. pyogenes* Dick-1 is one of the main indicators of the physiological state of the animal. This histological analysis provides evidence that infection with streptococcus intradermal occurs defeat the epidermis and dermis with generalizations of the pathological process in the parenchyma organs (lungs, spleen, liver, kidneys). During observations of the infectious process there was a significant reduction in contamination of the wound surface among mice by the end of the experiment on day 21 single colonies were inoculated. Analysis of the results showed that the spread of infection among mice begins with lung disease, since the 7th day we can observe generalization of infection with the penetration in other parenchyma organs. The washes from the wound surface in rats, in contrast, showed a significant streptococcal colonization. Locating the source of infection occurred in the lungs, a condition of other parenchyma organs remained within normal limits.

Key words: biological models, wound infection, intradermal injection, strain *S. pyogenes* Dick-1, rats, mice.

Модель оценки влияния фармакологических средств на динамику адаптации к физической нагрузке

С.В. Радько¹, С.В. Оковитый¹, А.Н. Куликов², Е.Ю. Чистякова¹

¹ – Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

² – Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

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

Модифицирована модель плавания в тренировочной установке и произведена оценка некоторых физиологических изменений, развивающихся в ходе тренировочного процесса. В ответ на аэробную тренировочную нагрузку у животных развивалась компенсаторная брадикардия, возрастала общая выносливость. Предлагаемый тренировочный режим (плавание 2 раза в день по 90 мин с перерывом в 1 ч (кроме первых трех дней, где тренировки длились 1 ч в день), 5 дней в неделю на протяжении 4-х недель) позволяет оценить эффективность тренировочного процесса (адаптацию к физическим нагрузкам) у экспериментальных животных и влияние на него фармакологических средств.

Ключевые слова: физическая работоспособность, тренировочный процесс, биомоделирование, лабораторные животные.

Введение

Тренировочный процесс (ТП) является основой подготовки и достижения успеха в любом виде спорта – как для начинающих, так для спортсменов высокого класса. В ходе ТП приобретаются и совершенствуются двигательные умения и навыки, происходит адаптация систем органов к предъявляемым нагрузкам.

По биомеханической структуре движения физические упражнения подразделяются на циклические и ациклические. К циклическим видам спорта относится легкая атлетика, спортивная ходьба, плавание, гребля, велоспорт, лыжные гонки, скоростной бег на коньках. Эти виды спорта характеризуются работой больших групп мышц, что оказывает значительную нагрузку на сердечно-сосудистую систему и систему дыхания. К ациклическим

принадлежат гимнастика, спортивные игры и единоборства, многие другие скоростно-силовые виды спорта.

Разработка модели для оценки влияния фармакологических средств на динамику физиологической адаптации к нагрузке в ходе ТП спорта представляет собой большой интерес. Такая модель должна обеспечивать достоверные изменения физиологических параметров, которые можно подтвердить с помощью инструментальных и биохимических методов.

При разработке модели оценки влияния фармакологических средств на динамику физиологической адаптации к нагрузке за основу была взята методика, описанная в работе [4]. С ее помощью авторы проводили оценку влияния плавательной нагрузки и общей продолжительности тренировочного процесса на структурные изменения

миокарда и активность окислительных ферментов скелетных мышц для установления оптимального количества и продолжительности ежедневных тренировок в плавательной установке экспериментальных животных (мыши линии *CBL*).

Целью данного исследования был поиск и адаптация методики, имитирующей ТП в циклических видах спорта, с последующим подтверждением изменений в физической работоспособности (ФР).

Материалы и методы

Исследования проводились на нелинейных мышах-самцах массой 22-24 г. Животные содержались по 10 особей в клетке в стандартных условиях вивария при температуре воздуха 18-22°C и относительной влажности воздуха 50-65%. В ходе эксперимента обеспечивался свободный доступ к воде, корм для животных выдавался из расчета 5 г/сут на 30 г массы животного. Взвешивания проводились ежедневно перед тренировкой. Всего было поставлено 5 серий экспериментов в различное время года.

Предварительный отбор животных осуществляли с помощью методики челночного плавания, что позволило оценить начальную ФР и сделать выборку максимально однородной перед рандомизацией по экспериментальным группам [2]. Повторное исследование проводили через 4 недели тренировок. Оценивали время, необходимое животному для совершения отдельных заплывов, их количество и время плавания в целом. После предварительной рандомизации животных случайным образом делили на две группы по 10 животных в каждой, одна из которых подвергалась тренировкам (опытная группа), а вторая – нет (контрольная группа).

Тренировки проводили в плавательной установке, представляющей собой 200-литровый бассейн высотой 40 см, шириной 35 см и длиной 80 см, заполняемый водой до половины. Внутри него располагался контур из оргстекла высотой 30 см, шириной 30 см и длиной 75 см, разделенный на 10 отсеков (15x15 см каждый) (рис. 1). Температура воды поддерживалась постоянно на уровне 30-32°C.



Рис. 1. Плавательная установка для животных (общий вид).

Плавательные тренировки проходили 2 раза в день с перерывом в 1 ч, 5 дней в неделю на протяжении 4-х недель в одно и то же время. Продолжительность первых трех тренировок составляла 1 ч один раз в день, для адаптации животных к нагрузке. Длительность одной тренировки – 1,5 ч (табл. 1). Во время тренировки мышцы каждый раз размешались в отсеках установки произвольным образом. Животные получали суточную норму еды после окончания второй тренировки, что позволяло избежать переудавления перед тренировкой, негативно сказывающегося на тренировочном процессе.

В оригинальной методике плавание начиналось с 10-минутных заплывов 2 раза в день с постепенным увеличением до 90 мин. Мы использовали более высокий темп наращивания нагрузки, начиная с одного часа в течение трех дней и в дальнейшем по 90 мин 2 раза в день, рассчитывая на более быстрое формирование компенсаторных изменений сердечно-сосудистой системы у мышей при повышенной нагрузке.

Во избежание утопления в оригинальной методике животным снизу подавался воздух; если животное прекращало плавательные движения из-за образования «воздушной подушки» под шерстью, ему в нос подавалась струя воды. В отличие от оригинальной методики, мы отказались от подачи воздуха в плавательную камеру для предотвращения утопления экспериментальных животных, т.к. использовали аутбредных мышей, у которых шерсть более плотная и густая, чем у мышей линии *CBL*. В этом случае также отпадает необходимость постоянно контролировать плавательную деятельность животных т.к. она фактически непрерывна. Внешение данной модификации повышает воспроизводимость методики, т.к. мыши получают более равномерную и, главное, непрерывную нагрузку без отдыха, не снижающуюся за счет удержания животного на поверхности воды с помощью пузырьков, число и размеры которых могут зависеть от объема шерсти животных.

Таблица 1

Схема тренировочного процесса

Показатель		Количество и время тренировок	
		1-я тренировка	2-я тренировка
Первичный тест	0 день		
	1-3 дни	1 ч	-
1-я неделя	4-5 дни	1,5 ч	1,5 ч
	6-7 дни	Отдых	
2-я неделя	8-12 дни	1,5 ч	1,5 ч
	13-14 дни	Отдых	
3-я неделя	15-19 дни	1,5 ч	1,5 ч
	20-21 дни	Отдых	
4-я неделя	22-26 дни	1,5 ч	1,5 ч
	27-28 дни	Отдых	
Итоговый тест	29-й день		

В качестве методики возможного влияния препарата на адаптируемость сердечно-сосудистой системы к тренирующим нагрузкам используется методика челночного плавания [2]. В опыте использовали бассейн длиной 150 см, высотой 30 см и шириной 15 см, который за 24 ч до начала заполняли наполовину десатурированной водой. В один конец помещали мышь, которая в течение предыдущих трех дней обучалась проплывать бассейн из одного конца в другой, производили измерение времени преодоления отдельных бассейнов и их количество. Отсчет времени осуществляли с момента начала плавательных движений в нужном направлении. Эксперимент прекращали, если животное преодолевало один бассейн более чем за 60 с.

Критериями оценки служило увеличение способности животного более продолжительно сохранять темп плавания (общее время, в течение которого

один бассейн преодолевается менее чем за 1 мин), в связи с чем увеличивается количество пройденных бассейнов.

Для оценки влияния тренировочного процесса на морфофункциональные изменения в миокарде после финального тестирования у животных измеряли массу сердца (Мм) и левого желудочка (Мж), а также их соотношения. Для неинвазивной оценки морфологии и функции левого желудочка применяли ультразвуковой метод. Исследование выполняли с использованием ультразвуковой системы высокого разрешения MyLabTouch SL 3116 (Esaote, Италия). ЭхоКГ проводили в В-режиме (двумерное сканирование) с целью качественной оценки структурно-функциональных изменений сердца и определения оптимального среза для количественных измерений, последние выполняли в М-режиме (одномерное сканирование) по короткой оси левого желудочка на уровне папиллярных мышц (рис. 2).

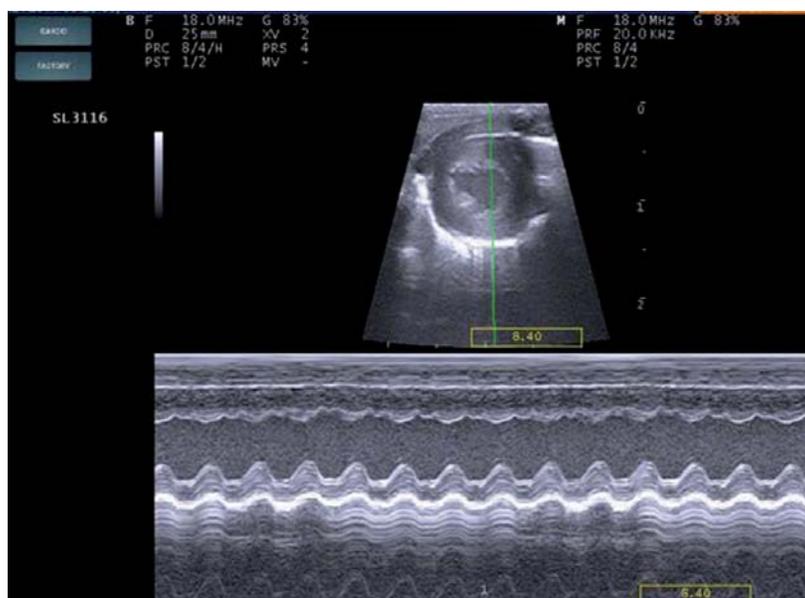


Рис. 2. Эхокардиограмма сердца экспериментального животного в В-режиме.

Оценивали толщину межжелудочковой перегородки в систолу (МЖПс) и диастолу (МЖПд), толщину задней стенки левого желудочка в систолу (ЗСЛЖс) и диастолу (ЗСЛЖд), конечный диастолический (КДР) и систолический (КСР) размеры левого желудочка, фракцию выброса (ФВ) и укорочения (ФУ), частоту сердечных сокращений (ЧСС).

Манипуляции с животными проводили под наркозом, используя внутримышечно смесь золазепама и тилетамина (Золетил, Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 37,5 мг/кг (100 мг/мл) в комбинации с ксилазином (Ксила, Interchemie, Нидерланды) в дозе 10 мг/кг (20 мг/мл).

По окончании эксперимента животных выводили из эксперимента, извлекали сердце и определяли массу миокарда и левого желудочка.

Все эксперименты выполняли в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью t-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия

Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: средняя арифметическая (M) ± стандартное отклонение (SD). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты и их обсуждение

Согласно полученным результатам, тренировочная нагрузка в виде плавания без груза 2 раза в день по 1,5 ч в течение пяти дней в неделю на протяжении четырех недель способствует повышению общей выносливости животных, определяющейся увеличением количества пройденных бассейнов и общего времени плавания (табл. 2). Так, количество пройденных бассейнов в опытной группе увеличилось по сравнению с исходным уровнем в 1,36 раза и было в 1,47 раза больше, чем в контроле. Эталонный актопротектор – этилтиобензимидазола гидрохлорид (25 мг/кг) увеличивал количество пройденных бассейнов в 2,25 раза по сравнению с контролем и в 1,66 раза – по сравнению с опытной группой. Общее время плавания в этой группе также возросло – как по сравнению с начальным показателем (в 1,68 раза), так и по сравнению с контролем (1,35 раза). В группе, получавшей этилтиобензимидазол, общее время плавания возросло в 3,52 раза по сравнению с контролем и в 2,6 раза по сравнению с опытной группой. В контрольной группе оба

Влияние тренировочных нагрузок на показатели теста «челночное плавание»

Показатель	Группа	Исходно	Итог
Количество пройденных бассейнов	Контрольная	73,0±4,50	58,0±12,50
	Опытная	62,57±11,87	85,37±9,40 ^{1,2}
	Этилтиобензимидазол	68,58±23,61	142,5±47,52 ^{3,4,5}
Общее время плавания, мин	Контрольная	33,46±3,10	31,51±6,24
	Опытная	25,40±9,56	42,59±13,53 ¹
	Этилтиобензимидазол	25,42±6,40	111,08±36,40 ^{1,2,6}
Время прохождения 10-ти бассейнов, мин	Контрольная	2,65±0,32	2,32±0,32
	Опытная	1,95±0,25	2,23±0,50
Время прохождения 20-ти бассейнов, мин	Контрольная	6,23±0,43	5,77±0,73
	Опытная	4,25±0,62	5,03±1,27
Время прохождения 30-ти бассейнов, мин	Контрольная	10,63±1,05	10,40±1,53
	Опытная	8,88±2,58	9,67±0,50

Примечание: 1 – достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ($p < 0,01$); 2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,01$); 3 – достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ($p < 0,005$); 4 – достоверные отличия от соответствующего показателя интактной группы ($p < 0,005$); 5 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$); 6 – достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ($p < 0,001$).

этих показателя через 4 недели несколько снизились. Время наступления срыва работоспособности достоверно увеличивалось под влиянием проводимых тренировок, а также под воздействием этилтиобензимидазола.

Скоростные показатели в обеих группах достоверно не различались, подтверждая тот факт, что тест челночного плавания лабораторных животных ориентирован преимущественно на анализ выносливости и значимо не влияет на скоростные характеристики работоспособности. Для их анализа следует использовать кинезогидродинамический метод исследования [1].

Анализ влияния тренировочного процесса на функционально-морфологические изменения в миокарде позволил выявить следующее: показатели геометрии и сократительной функции

миокарда в результате вышеописанных тренировок достоверно не изменились (табл. 3). Однако при этом под влиянием физических нагрузок произошло развитие функциональной брадикардии: ЧСС в опытной группе животных снизилась в 1,42 раза по сравнению с контролем. По данному показателю можно судить о наличии адаптационных изменений у тренированных животных, проявляющихся в компенсаторной брадикардии покоя [3]. Исходно более низкая по сравнению с нормой ЧСС во всех группах мышей, очевидно, обусловлена воздействием наркоза.

Морфологическое исследование сердца подтвердило данные, полученные при эхокардиографическом исследовании: достоверных изменений по массе миокарда и левого желудочка не произошло (табл. 4).

Таблица 3

Влияние тренировочных нагрузок на ЭхоКГ-показатели миокарда

Показатель	Контрольная группа		Опытная группа	
	исходно	итог	исходно	итог
Масса тела, г	22,0±1,82	23,5±2,08	19,5±0,84	22,16±1,48
Толщина межжелудочковой перегородки в систолу, мм	1,01±0,07	1,26±0,06	1,08±0,10	1,14±0,12
Толщина межжелудочковой перегородки в диастолу, мм	0,47±0,03	0,55±0,05	0,56±0,06	0,56±0,05
Толщина задней стенки левого желудочка в систолу, мм	1,05±0,08	1,26±0,63	0,57±0,03	0,56±0,02
Толщина задней стенки левого желудочка в диастолу, мм	0,62±0,04	0,55±0,06	0,88±0,05	0,77±0,18
Конечный диастолический размер левого желудочка, мм	3,96±0,28	4,23±0,14	3,97±0,33	3,81±0,17
Конечный систолический размер левого желудочка, мм	2,43±0,43	2,30±0,14	2,75±0,21	2,38±0,24
Фракция выброса, %	74,21±7,40	85,99±0,86	64,39±2,89	78,61±2,81
Фракция укорочения, %	40,01±7,72	49,48±1,08	30,35±2,01	41,74±2,41
Частота сердечных сокращений, уд/мин	189,73±4,02	191,5±23,79	197,32±38,64	134,28±19,32 ^{1,2}

Примечание: 1 – достоверные отличия от соответствующего исходного показателя (p<0,01);
2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы (p<0,01).

Таблица 4

Влияние тренировочных нагрузок на морфологические параметры миокарда

Группа	Мо, г	Мм, мг	Млж, мг	Мм/Мо	Млж/Мо	Млж/Мм, %
Контрольная	26,73±3,25	133,25±16,0	89,50±11,50	5,01±0,58	3,36±0,35	67,25±3,14
Опытная	23,37±3,31	112,87±10,06	79,37±8,21	4,88±0,44	3,44±0,40	70,84±4,68
Этилтиобен- зимидазол	23,4±3,52	117,0±5,20	82,2±6,24	5,17±0,77	3,61±0,43	70,18±2,33

Примечание: Мо – масса животного, Мм – масса миокарда, Млж – масса левого желудочка.

В то же время в исследованиях, описанных в работе [4], тренировочная модель которых была взята нами за основу, к концу эксперимента было зафиксировано некоторое увеличение массы миокарда и левого желудочка. Учитывая, что масса тела мышей была сопоставима, и тренировочный режим максимально воспроизведен, очевидно, решающим фактором, оказавшим влияние на результат, является использование в наших экспериментах аутбредных животных, а не мышей линии *CBL*, как в вышеуказанной работе [4].

Таким образом, предлагаемый тренировочный режим (плавание 2 раза в день по 90 мин с перерывом в 1 ч (кроме первых трех дней, где тренировки длились 1 ч в день), 5 дней в неделю на протяжении 4-х недель) позволяет оценить эффективность тренировочного процесса (адаптацию к физическим нагрузкам) у экспериментальных животных и влияние на него фармакологических средств.

Выводы

1. Предлагаемый тренировочный режим позволяет имитировать аэробный тренировочный процесс с преимущественным увеличением выносливости и снижением утомляемости экспериментальных животных.

2. Формирование состояния тренированности животных сопровождается развитием компенсаторной брадикардии при отсутствии достоверных изменений массы и геометрии левого желудочка миокарда.

3. Предлагаемая модификация модели может быть использована для оценки влияния различных фармакологических средств на физическую работоспособность и адаптационные изменения, происходящие в процессе тренировок.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Касинская Н.В. Кинезогидродинамическая оценка скоростных характеристик физической работоспособности животных в фармакологических исследованиях // Биомедицина. 2013. № 3. С.6-17.
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. – М., СПб: Айсинг. 2013. 132 с.
3. Савка В.Г., Радько М.М., Воробьев А.А., Марценяк И.В., Бабюк А.В. Спортивная морфология: Уч. пособ. / под ред. Радько М.М. - Черновцы: Книги-XXI. 2005. 196 с.
4. Evangelista F.S, Brum P.C., Krieger J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice // Braz. J. med. biol. res. 2003. Vol. 36. No. 12. P. 1751-1759.

The model of the impact assessment of pharmacological agents on the dynamics of adaptation to physical load

S.V. Radko, S.V. Okovitiy, A.N. Kulikov, E.Yu. Chistyakova

We have modified the model of swimming training and evaluated some physiological changes, developing during the training process. In response to aerobic training load animals have evolved applied compensatory bradycardia, increased overall endurance. The proposed training regimen (swimming twice a day for 90 min with a break of one hour (except the first three days where the workout 1 hour per day), five days a week for 4 weeks) to evaluate the effectiveness of the training process (adaptation to physical exercises) in the experimental animals and the influence of the pharmacological agents.

Key words: physical capacity, training process, biomodeling, laboratory animals.



Экспериментальное исследование влияния Мексикора на показатели перекисного окисления липидов и двигательную функцию при черепно-мозговой травме у крыс

А.В. Дерюгина¹, А.В. Шумилова¹, Е.С. Филиппенко¹, Л.В. Бояринова²,
О.Д. Соловьёва³

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

² – ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, Нижний Новгород

³ – ГБУЗ Нижегородской области «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», Нижний Новгород

Контактная информация: Шумилова Анастасия Владимировна, shumilowanastya@gmail.com

Исследовано действие Мексикора на перекисное окисление липидов (ПОЛ) и моторные функции в условиях посттравматического периода при моделировании черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс. Выявлено, что при ЧМТ наблюдалось значительное повышение содержания продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов, концентрации малонового диальдегида и оснований Шиффа) и снижение двигательных функций животных. Применение Мексикора при ЧМТ приводило к снижению концентрации продуктов ПОЛ и восстановлению двигательной активности по сравнению с контролем. Наиболее выраженные изменения при действии Мексикора регистрировались на 3-7 сутки посттравматического периода. Полученные данные выявили эффективность использования Мексикора при ЧМТ крыс, что выразилось в нормализации показателей ПОЛ и сокращении сроков проявления двигательной дисфункции.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, перекисное окисление липидов, двигательная активность, Мексикор.

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из важнейших проблем здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, травматизм составляет одну из трех основных

причин смертности населения земного шара [5]. В последнее время отмечается неуклонное увеличение удельного веса ЧМТ, которые часто сопровождаются тяжелой инвалидизацией, причем 92% составляют лица трудоспособного возраста [7]. Вследствие травматического повреждения мозга запускаются каскад-

ные необратимые морфофункциональные дистрофические и некротические процессы, которые во многом определяют выраженность моторных и когнитивных нарушений в посттравматическом периоде [2].

Объективно характеризуют тяжесть патологического процесса и физиологического напряжения травмированного мозга свободнорадикальные процессы. Выявлена корреляция изменения количественного содержания продуктов ПОЛ в периферической крови, слюне и спинномозговой жидкости у пациентов с ЧМТ [8]. Активация ПОЛ играет ключевую роль в возникновении и развитии отека головного мозга, повреждения гематоэнцефалического барьера, увеличении степени дезинтегративных преобразований мембранных структур клеток, существенно нарушая их функцию [9].

В настоящее время одно из ведущих мест в лечении травматических повреждений мозга при ЧМТ занимает медикаментозная терапия, направленная на предотвращение гипоксии мозга, улучшение обменных процессов. Однако, учитывая существенный вклад свободнорадикальных реакций, продуктов ПОЛ в повреждение мозга при ЧМТ, обоснованным в коррекции посттравматических нарушений является применение препаратов с антиоксидантной активностью. В то же время в общепринятых схемах интенсивной терапии больных с ЧМТ нет указаний на необходимость контроля свободнорадикального окисления и назначения антиоксидантной терапии.

Сочетанием антигипоксического действия с антиоксидантным обладает синтетический препарат Мексикор, представляющий собой комплексное

соединение антигипоксанта сукцината с антиоксидантом эмоксипином [4]. Однако Мексикор широко используется в качестве метаболического кардиоцитопротектора, и применение его в качестве лекарственного средства при ЧМТ требует проведения объективных исследований.

Целью работы явилось изучение действия Мексикора на динамику процессов перекисного окисления липидов крови и моторные функции в условиях посттравматического периода при моделировании черепно-мозговой травмы у крыс.

Материалы и методы

Исследование проведено на 30 нелинейных крысах-самках массой 180-200 г, по 15 крыс в каждой группе. Содержание и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с нормативами, данными в Руководстве «Guide for care and use of laboratory animals. ILAR publication, 1996, National Academy Press» и Приказом Минздрава России № 199н от 01.04.16 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Животным, фиксированным на планшете, моделировали ЧМТ путем свободного падения груза массой 100 г с высоты 80 см на теменно-затылочную область головы [10]. Опытной группе в течение 12-ти дней после ЧМТ ежедневно внутрибрюшинно два раза в день вводили Мексикор (р-р для внутривенного и внутримышечного введения, ООО «ЭкоФармИнвест», Москва) в концентрации 8 мг/кг в сутки, контрольной группе – физ. раствор в том же объеме. Первое введение препарата осуществля-

ли через 1 ч после нанесения животным ЧМТ. Уровень физиологической нормы определяли у интактных животных.

Забор крови в опытной и контрольной группах производили на 1, 3, 7 и 12-е сутки после альтерации из подъязычной вены. Оценивали интенсивность процессов ПОЛ в плазме крови по накоплению первичных (диеновых и триеновых конъюгатов) и конечных (оснований Шиффа) продуктов липидной перекисидации. Определяли продукты ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах биологического материала спектрофотометрически [3] на спектрофотометрах СФ 2000 (Россия). Результаты оценивали по относительным величинам E232/E220, E278/E220, E400/E220 и выражали в относительных единицах. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли в плазме крови и эритроцитах по реакции с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрически [6]. Используемые в опытах эритроциты трижды отмывали 0,85% раствором хлористого натрия, центрифугируя 10 мин при 1500 об/мин.

Двигательную функцию крыс оценивали в тесте «Метод передвижения по бруску» [11]. В течение двух суток до травмы крыс обучали передвигаться по узкому (шириной 2 см) деревянному бруску. Движение стимулировали ярким светом, источник которого располагался у одного конца бруска, у другого конца была расположена темная камера, в которой животное укрывалось от света. В посттравматическом периоде определяли время, затрачиваемое на передвижение по бруску, и способность балансировать и оставаться на бруске, регистрируя успешное выполнение задачи либо невозможность выполнения

задачи (минимальное количество баллов – 0, максимальное – 10). Дополнительно фиксировали частоту соскальзывания лап при движении по бруску (максимальный показатель составил 4 балла, что соответствовало 4 и более соскальзываний лап, 0 баллов – отсутствие соскальзываний).

Полученные данные были обработаны с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel. Достоверность различий средних определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

По результатам проведенного исследования было выявлено существенное отличие в динамике процессов ПОЛ в опытной и контрольной группах. В контрольной группе животных наблюдалось увеличение диеновых конъюгатов на первые сутки, триеновых конъюгатов были повышены на 1-7 сутки, концентрация МДА увеличивалась на третьи сутки посттравматического периода, основания Шиффа повышались к седьмым суткам наблюдения и оставались повышенными до конца эксперимента. В опытной группе животных, также через сутки после травмы, по сравнению с интактными животными отмечалось незначительное увеличение в плазме диеновых конъюгатов и значимое – триеновых конъюгатов, но при этом величина диеновых конъюгатов с третьих суток после травмы достоверно уменьшалась по сравнению с интактными животными, уровень триеновых конъюгатов на третьи и седьмые сутки посттравматического периода не отличался от значений интактных крыс. Кон-

центрация МДА в плазме крови была снижена относительно показателей до травмы с первых до седьмых суток наблюдения, основания Шиффа на фоне введения Мексикора в течение всего посттравматического периода не превышали значений интактных животных.

Концентрация МДА в эритроцитах крыс, повышенная к первым суткам после ЧМТ, при действии Мексикора существенно снижалась к третьим суткам посттравматического периода, у животных в контрольной группе наблюдалось восстановление содержания данного метаболита до значений интактной группы к седьмым суткам после ЧМТ ($p < 0,05$) (табл. 1).

Содержание ДК в плазме крови интактных животных составило $0,14 \pm 0,01$ отн.ед., ТК – $0,05 \pm 0,01$ отн. ед., ОШ –

$3,58 \pm 0,84$ отн.ед., концентрация МДА в плазме крови – $0,92 \pm 0,05$ нМоль/мл, концентрация МДА в эритроцитах интактных животных – $0,15 \pm 0,03$ нМоль/мл.

Исследование двигательной активности крыс также выявило существенные различия контрольной и опытной групп. Хотя в посттравматический период время, затрачиваемое на передвижение по бруску, и частота соскальзывания лап увеличились относительно значений интактной группы, но на фоне введения Мексикора в исследуемых тестах отмечены значительно меньшие отклонения от значений интактной группы, чем в контрольной группе. Так, уже к первым суткам после ЧМТ у животных при действии Мексикора отмечалось значимое улучшение моторной активности по сравнению с контролем и полное восстановление

Таблица 1
Динамика показателей продуктов ПОЛ сравниваемых серий ($M \pm m$) в посттравматический период

Показатель	Группа	Время после ЧМТ (сутки)			
		1	3	7	12
ДК, отн. ед.	контроль	$0,20 \pm 0,02^*$	$0,13 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$
	опыт	$0,16 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01^{**}$	$0,13 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,01^{**}$
ТК, отн. ед.	контроль	$0,14 \pm 0,03^*$	$0,09 \pm 0,03^*$	$0,17 \pm 0,02^*$	$0,03 \pm 0,02$
	опыт	$0,11 \pm 0,04^{**}$	$0,05 \pm 0,005^*$	$0,09 \pm 0,04^*$	$0,02 \pm 0,01^{**}$
МДА плазмы, нМоль/мл	контроль	$1,07 \pm 0,14$	$1,24 \pm 0,17^*$	$0,87 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,15$
	опыт	$0,79 \pm 0,07^{**}$	$0,75 \pm 0,10^{**}$	$0,75 \pm 0,05^{**}$	$1,08 \pm 0,09$
ОШ, отн. ед.	контроль	$4,11 \pm 0,96$	$3,20 \pm 0,98$	$6,46 \pm 0,92^*$	$5,41 \pm 0,75^*$
	опыт	$4,51 \pm 1,03$	$2,72 \pm 0,44$	$5,00 \pm 1,33$	$3,25 \pm 0,41^*$
МДА эритроцитов, нМоль/мл	контроль	$0,21 \pm 0,02^*$	$0,23 \pm 0,04^*$	$0,20 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,06$
	опыт	$0,23 \pm 0,04^{**}$	$0,09 \pm 0,02^{**}$	$0,17 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,04$

Примечание: * – статистически значимые отличия значений контрольной группы от интактной группы, $p < 0,05$; ** – статистически значимые отличия значений опытной группы от интактной группы, $p < 0,05$; • – статистически значимые отличия опытной группы от контрольной группы.

Таблица 2

Динамика двигательной активности ($M \pm m$) в посттравматический период

Сутки	Оценка передвижения по бруску, баллы		Частота соскальзывания лап, баллы	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Интактные	3,0±0,01		0	
1	7,4±0,9*	4,8±0,8*•	3,0±0,5*	1,6±0,7*•
3	5,8±0,9*	4,2±0,4*	1,4±0,7*	1,0±0,4*
7	4,4±0,5*	3,0±0,3•	1,0±0,5*	0,4±0,2*
12	4,4±0,7	2,8±0,2•	1,2±0,5*	0

Примечание: * – статистически значимые отличия полученных значений от значений до воздействия, $p < 0,05$;

• – статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0,05$.

передвижения по бруску к седьмым суткам посттравматического периода, в отличие от контроля, в котором показатели двигательной активности приближались к интактным значениям к двенадцатым суткам наблюдения (табл. 2).

Полученные результаты выявили эффективность использования Мексикора при ЧМТ крыс. Действие Мексикора при ЧМТ сопровождалось снижением всех показателей ПОЛ – как промежуточных (что особенно важно, оснований Шиффа), так и конечных продуктов, вызывающих повреждение клеточных мембран и способствующих разобщению ферментных систем. Ингибирование процессов липидной перекисидации обусловлено антирадикальной составляющей Мексикора – эмоксипином, активно взаимодействующим с перекисными радикалами липидов. Так, в ходе проведенных экспериментов Мексикор ингибировал развитие окислительного стресса на уровне диеновых конъюгатов и триеновых конъюгатов, прерывая синтез оснований Шиффа. Следует отметить, что содержание в Мексикоре сукцината способствует метаболиче-

ской активности клеток. Янтарная кислота позволяет поддерживать процессы ФАД-зависимого образования АТФ в клетках [1]. Это важно, т.к. сукциноксидазное звено цикла Кребса угнетается при гипоксии и ишемии значительно позднее по сравнению с НАД-зависимыми оксидазами и может достаточно длительно поддерживать энергопродукцию в клетке при условии наличия в митохондриях субстрата окисления в данном звене – сукцината [4]. Оптимизация энергопродукции позволила предотвратить альтерацию нервных клеток и достигнуть в посттравматический период эффективного восстановления двигательных функций.

Заключение

Таким образом, результаты экспериментальных исследований показали, что применение Мексикора при ЧМТ способствует нормализации ПОЛ и восстановлению двигательных нарушений в посттравматический период. Наиболее выражено действие препарата на начальном этапе реабилитационного периода.

Список литературы

1. *Бояринов Г.А., Котлов И.С., Бричкин Ю.Д.* Эффективность цитопротекторов в профилактике реперфузионного синдрома у больных инфарктом миокарда при тромболитической терапии // Поликлиника. 2010. № 6. С. 73-79.
2. *Волохова Г.А., Стоянов А.Н.* Солкосерил-индуцированная нормализация патоморфологических нарушений структур мозга при черепно-мозговой травме в условиях эксперимента // Межд. неврол. журнал. 2008. Т. 3. № 19. С. 49-54.
3. *Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И.* Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопр. медицинской химии. 1989. Т. 35. № 1. С. 127-131.
4. *Егоров И.В.* Современные подходы к антиоксидантной поддержке пациентов с сердечно-сосудистой патологией // Поликлиника. 2008. № 2. С. 25-28.
5. *Захаров Г.А., Волкович О.В., Горохова Г.И., Карамышева А.В.* Влияние прогестерона на морфометрические показатели сосудистого и клеточного компонентов ткани головного мозга у крыс с черепно-мозговой травмой // Вестник ТГУ. 2014. Т. 19. № 2. С. 738-740.
6. *Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Плескова С.Н., Калинин В.А.* Апоптозный характер гемолиза эритроцитов, индуцированный малыми дозами ионизирующей радиации // Биофизика. 2015. Т. 60. № 1. С. 102-108.
7. *Львовская Е.И., Садова В.А., Сумная Д.Б., Держинский Д.Б.* Состояние процессов липидной перекисидации в острый период тяжелой черепно-мозговой травмы // Вестник ЮУрГУ. 2010. Т. 22. № 6. С. 82-84.
8. *Садова В.А., Бельская Г.Н., Львовская Е.И., Сумная Д.Б.* Нарушение процессов липидной перекисидации как аспект нейрохимических особенностей межполушарной асимметрии в остром периоде черепно-мозговой травмы // Невролог. вестник. 2008. Т. XL. № 4. С. 130-133.
9. *Садова В.А., Бельская Г.Н., Львовская Е.И., Сумная Д.Б., Кучин Д.Г., Атманский И.А. и др.* Клинико-биохимическая оценка динамики острого периода черепно-мозговых и сочетанных травм // Клиническая неврология. 2013. Т. 7. № 4. С. 27-31.
10. *Цымбалюк В.И., Кочин О.В.* Экспериментальное моделирование черепно-мозговой травмы // Укр. нейрохирург. журн. 2008. № 2. С. 10-12.
11. *Saatman K.E., Murai H., Bartus R.T., et al.* Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. No. 93. P. 3428-3433.

Experimental study on the effect of Mexicor indicators of lipid peroxidation and motor function in traumatic brain injury in rats

A.V. Deryugina, A.V. Shumilova, E.S. Filippenko, L.V. Boyarinova,
O.D. Solov'eva

The action of Mexicor on lipid peroxidation (LPO) and motor function in the conditions of post-traumatic period in the simulation of traumatic brain injury (TBI) in rats was studied. It was revealed that the head injury was a significant increase in the content of lipid peroxidation products (conjugated diene, triene conjugates concentration of malondialdehyde and Schiff bases) and decreased motor function of animals. Application of Mexicor in head injury led to a decrease in the concentration of lipid peroxidation products and the restoration of motor activity compared with the control. The most pronounced changes during the action of Mexicor registered on 3-7 day of post-traumatic period. The findings revealed the efficiency of Mexicor for rats with TBI, which was reflected in the normalization of lipid peroxidation and reducing the timing of the motor dysfunction.

Key words: traumatic brain injury, lipid peroxidation, motor activity, Mexicor.

Эффективность использования пробиотиков на модели гнойно-воспалительного процесса у кошек

П.А. Руденко, А.Н. Мурашёв

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, Московская область

Контактная информация: к.в.н. Руденко Павел Анатольевич, pavelrudenko76@yandex.ru

В статье приводятся данные о динамике гематологических показателей крови кошек в контроле эффективности лечения гнойных ран пробиотиками. Пробиотико-сорбционные препараты Дилаксил и Сорбелакт при комплексном лечении кошек с гнойными ранами обнаружили свою эффективность. Их применение позитивно влияет на гематологические показатели крови опытных животных, очищение раневой поверхности от гнойного экссудата, сокращает сроки начала эпителизации ран и полного заживления.

Ключевые слова: кошки, комплексное лечение, гнойные раны, пробиотики.

Введение

На протяжении всей истории медицины хирургическая инфекция является одним из основных препятствий для развития и расширения диапазона хирургических вмешательств. К настоящему времени, несмотря на значительные успехи в борьбе с гнойно-воспалительными процессами, инфекция в хирургии остается сложной и актуальной проблемой. Микробное загрязнение при воспалительных процессах обусловлено распространением хирургической инфекции, появлением новых антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов и их ассоциаций, изменением биологических свойств микроорганизмов, осложнением микробиологической характеристики ран, а также высоким уровнем иммунодепрессии, вызванным различными факторами [7, 9]. Следует отметить, что в результате укусов и

царапин кошек могут возникать гнойно-воспалительные процессы мягких тканей с неблагоприятным течением – «синдром кошачьей царапины», остеомиелит, сепсис, которые обусловлены *P. multocida* [5].

В последние годы для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, коррекции дисбактериозов кишечника широко используют пробиотики – бактериальные препараты из живых микробных культур. Их использование обуславливает повышение резистентности организма, благоприятные метаболические изменения, а также антагонистическое действие на вредную для животного микрофлору. Пробиотики не вызывают побочных реакций, не имеют противопоказаний к применению, положительно влияют на микробиоценоз макроорганизма [1, 4, 6, 8, 13-16]. Однако вопросами разработки и использования пробио-

тических препаратов для коррекции микробиоценозов при гнойно-воспалительных процессах мягких тканей у животных (в частности, у кошек) до сих пор не занимались.

Нами найдены сообщения об использовании *per os* пробиотических препаратов в хирургической практике. Так, в работе [3] указывается, что целенаправленное назначение пробиотического препарата Бифилакт в комплексе лечения больных с гнойными ранами, которые длительно не заживают, способствует нормализации показателей клеточного иммунитета, иммунорегуляторного индекса, повышению фагоцитарной активности лейкоцитов, что обуславливает благоприятное течение раневого процесса. Автор работы [2] отмечает, что использование пробиотиков при лечении экзем у собак, обусловленных системными изменениями в желудочно-кишечном тракте, положительно влияет на течение заболевания и предупреждает развитие рецидивов. Зарубежные исследователи [10-12] сообщают, что использование пробиотиков в комплексном лечении сепсиса активизирует иммунный ответ пациентов, значительно уменьшает продолжительность интенсивной терапии. Анализируя литературные данные, мы пришли к выводу, что использование пробиотических препаратов в комплексном лечении гнойно-воспалительных процессов мягких тканей является эволюционно обоснованным подходом и требует дальнейшего изучения с целью определения показаний к широкому применению в хирургической практике.

Проблема борьбы с гнойно-воспалительными процессами у кошек

и их профилактика требует новых и современных подходов к ее решению. Поэтому раскрытие механизмов формирования микробиоценозов при гнойно-воспалительных процессах у кошек и их коррекция с помощью новых пробиотико-сорбционных препаратов является актуальной проблемой, а ее решение позволит увеличить эффективность борьбы с гнойно-воспалительными заболеваниями у этого вида животных.

В связи со сказанным выше, **целью** данной работы явилась оценка эффективности созданных нами пробиотико-сорбционных препаратов Дилаксил и Сорбелакт в комплексном лечении кошек со случайными гнойными ранами.

Материалы и методы

В качестве биомодели гнойно-воспалительных процессов нами были отобраны кошки со случайными гнойными ранами, которые поступали в частные и государственные ветеринарные клиники.

Для оценки эффективности созданных нами пробиотико-сорбционных препаратов животных методом конвертов разделили на четыре группы: опытную A_1 ($n=16$); опытную A_2 ($n=16$), опытную A_3 ($n=21$) и контрольную группу сравнения A_0 ($n=11$).

Первичную хирургическую обработку (ПХО) гнойно-воспалительных очагов проводили животным всех четырех групп. Лечение животных проводили с учетом фазности раневого процесса. Схема лечения кошек со случайными гнойными ранами представлена в табл. 1.

Схема лечения кошек со случайными гнойными ранами (n=64)

Фазы раневого процесса	Группы животных			
	Контрольная группа А ₀	Опытная группа А ₁	Опытная группа А ₂	Опытная группа А ₃
Местно				
I фаза. Самоочистения	Хирургическая обработка раны	Хирургическая обработка раны. Мазь Левомеколь	Хирургическая обработка раны. Аппликация аэросила А-300	Хирургическая обработка раны. Аппликация пробиотико-сорбционного препарата Дилаксил
II фаза. Заполнения грануляциями	–	Мазь Солкосерил (1 раз в сутки)		
III фаза. Эпителизации	–	Мазь Солкосерил (по показаниям, 1 раз в сутки)		
Перорально				
I, II, III фазы	–		Аэросил А-300	Пробиотико-сорбционный препарат Сорбелакт

В контрольную группу вошли животные, владельцы которых отказались от лечения. Кошкам группы А₁ в первую фазу раневого процесса 2 раза в сутки в полость раны вводили марлевый дренаж (пропитанный мазью на гидрофильной основе Левомеколь), а при отсутствии полости – выполняли ее аппликацию. Животным группы А₂ в первую фазу раневого процесса 2 раза в сутки проводили аппликацию аэросила А-300 слоем не более 3 мм. Кошкам группы А₃ в первую фазу раневого процесса 2 раза в сутки на поверхность раны наносили пробиотико-сорбционный препарат Дилаксил, также слоем не более 3 мм. В дальнейшем, по возможности, животным А₁-А₃ опытных групп накладывали повязку. Животным групп А₁-А₃

во вторую и, по показаниям, в третью фазы раневого процесса применяли мазь Солкосерил 1 раз в сутки. Кроме этого, животным опытной группы А₂ на протяжении всего лечения 1 раз в сутки перорально назначали аэросил А-300 в дозе 1 г, а кошкам опытной группы А₃ – пробиотико-сорбционный препарат Сорбелакт в дозе 1 г.

Морфо-биохимические показатели крови определяли общепринятыми методами. Полученные результаты исследований обрабатывали статистически и представляли в виде таблиц.

Результаты и их обсуждение

При анализе анамнестических данных больных кошек установлено, что чаще всего случайные гнойные

раны были локализованы в области головы – 26 (40,6%), шеи – 14 (21,9%), холки – 8 (12,5%) и в области грудных конечностей – 7 (10,9%) случаев от общего количества опытных животных. Гнойные раны у опытных животных регистрировали, в основном, в возрасте 1-5 лет – 39 (60,9%) и 5-10 лет – 23 (35,9%) случаев от общего количества больных кошек. Необходимо отметить, что подавляющее большинство – 47 (73,5%) случаев составляли беспородные кошки. Подавляющее большинство травмированных кошек составляли самцы, а именно 75,0% животных от общего количества опытных животных. Кроме этого, нами отмечена четко выраженная сезонность возникновения гнойных ран у кошек. Так, чаще всего случайные гнойные раны регистрировали в весенние месяцы, а именно в марте – 17 (26,7%), апреле – 14 (21,9%) и мае – 12 (18,7%) случаев от общего количества опытных животных.

При случайных гнойных ранах у кошек мы в основном регистрировали удовлетворительное общее состояние. У некоторых животных наблюдали незначительное снижение аппетита, которое не влияло на их упитанность; у 3 (12%) кошек с гнойными ранами, которые длительно не заживали, отмечали снижение массы тела. У обследованных животных отмечали достоверное ($p < 0,001$) увеличение общей температуры тела (в 1,02 раза) по сравнению с группой контроля ($38,5 \pm 0,06^\circ\text{C}$). Следует отметить, что температура тела у 60,0% животных была субфебрильной, а в 16,0% – фебрильной. На начальных стадиях раневого процесса (фаза самоочище-

ния) наблюдали интенсивное выделение жидкого раневого экссудата.

Края, стенки и окружающие ткани вокруг раны при первичном обследовании были отечными, тестообразной консистенции, гиперемированы в непигментированных участках кожи, умеренно болезненными, с повышенной местной температурой. Вследствие ферментативного расплавления авитализированных тканей в полости ран накапливалась незначительное количество гнойного экссудата беловатого или желтоватого цвета. По мере очищения ран от омертвевших тканей и гнойного экссудата общее состояние животных улучшалось, местно уменьшался отек тканей, на дне раны регистрировали появление островков грануляционной ткани, лучше развитой у кошек группы A_3 .

Для оценки эффективности лечения кошек со случайными гнойными ранами контрольной и опытных групп нами были проведены морфологические исследования крови, результаты которых приведены в табл. 2.

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что по морфологическим показателям крови кошек при лечении гнойных ран более эффективной оказалась схема с использованием пробиотикосорбционных препаратов Дилаксил и Сорбелакт (схема A_3). Так, уже на 3-и сутки лечения в крови животных этой группы происходило достоверное увеличение количества эритроцитов в 1,2 раза (с $5,16 \pm 0,19$ до $6,01 \pm 0,21$ Т/л; $p < 0,05$) и уровня гемоглобина – в 1,1 раза (с $125,63 \pm 2,07$ до $138,54 \pm 2,47$ г/л; $p < 0,01$), при сравнении с исходными данными. Это происходило на фоне высокодостоверного ($p < 0,001$) сниже-

Таблица 2

Морфологические показатели крови в процессе лечения кошек со случайными гнойными ранами

Показатели	Здоровые кошки (n=10)	Схема	n	До лечения	В процессе лечения	
					3-и сутки	7-е сутки
Гемоглобин, г/л	141,30±5,07	A ₀	6	125,83±5,44	126,16±4,38	131,83±5,02**
		A ₁	8	130,12±3,56	134,50±3,45*	143,50±2,79***
		A ₂	8	127,25±2,54	137,87±2,15**	147,50±1,86***
		A ₃	11	125,63±2,07	138,54±2,47**	148,72±1,88***
Эритроциты, Т/л	6,90±0,27	A ₀	6	5,88±0,41	5,65±0,37	5,58±0,28
		A ₁	8	5,35±0,24	5,53±0,23	5,66±0,20
		A ₂	8	5,25±0,17	5,21±0,13	6,00±0,27*
		A ₃	11	5,16±0,19	6,01±0,21*	6,21±0,23**
Лейкоциты, Г/л	8,49±0,56	A ₀	6	10,46±0,35	11,26±1,60	12,41±1,49
		A ₁	8	10,87±0,54	11,07±1,16	10,35±1,07
		A ₂	8	12,17±0,79	10,33±0,64*	9,02±0,95**
		A ₃	11	11,57±0,86	8,56±0,59***	7,48±0,60***
СОЭ, мм/ч	6,30±1,07	A ₀	6	24,33±2,61	25,33±2,70	23,83±2,12
		A ₁	8	16,62±1,87	12,25±1,38**	9,12±0,76***
		A ₂	8	19,25±0,88	12,25±0,55***	8,37±0,37***
		A ₃	11	20,72±0,92	10,54±0,65***	7,09±0,31***
НЭК, усл. ед.	0,44±0,07	A ₀	6	1,96±0,25	2,02±0,25	1,81±0,18
		A ₁	8	1,28±0,15	0,91±0,11**	0,63±0,05***
		A ₂	8	1,51±0,08	0,88±0,04***	0,56±0,03***
		A ₃	11	1,65±0,08	0,76±0,04***	0,47±0,02***

Примечание (здесь и далее): n – количество исследованных животных; *** – p<0,001, ** – p<0,01, * – p<0,05 при сравнении с животными до лечения.

ния количества лейкоцитов в 1,4 раза (с 11,57±0,86 до 8,56±0,59 г/л), а также показателей СОЭ и НЭК – в 2,0 и 2,2 раза соответственно. Необходимо от-

метить, что в крови кошек этой опытной группы на 7-е сутки наблюдения отмечали дальнейшую положительную динамику.

Биохимические показатели крови в процессе лечения кошек со случайными гнойными ранами

Показатели	Здоровые кошки (n=10)	Схема	n	До лечения	В процессе лечения	
					3-и сутки	7-е сутки
АсАТ, ммоль/(ч*л)	0,35±0,04	A ₀	6	0,76±0,04	0,78±0,07	0,73±0,08
		A ₁	8	0,71±0,08	0,60±0,09	0,51±0,06
		A ₂	8	0,72±0,08	0,55±0,08**	0,44±0,07***
		A ₃	11	0,72±0,07	0,57±0,04**	0,31±0,02***
АлАТ, ммоль/(ч*л)	0,59±0,05	A ₀	6	1,01±0,09	0,99±0,07	0,93±0,06
		A ₁	8	0,95±0,06	0,81±0,08	0,65±0,10**
		A ₂	8	0,94±0,04	0,78±0,03**	0,66±0,07**
		A ₃	11	0,98±0,07	0,69±0,08***	0,53±0,06***
Коэффициент де Ритиса	0,59±0,05	A ₀	6	0,77±0,04	0,81±0,11	0,80±0,11
		A ₁	8	0,76±0,09	0,77±0,15	0,93±0,19
		A ₂	8	0,74±0,07	0,71±0,11	0,73±0,14
		A ₃	11	0,73±0,05	0,95±0,15	0,66±0,08
Мочевина, ммоль/л	7,22±0,44	A ₀	6	7,43±0,59	7,96±0,37	7,80±0,62
		A ₁	8	7,65±0,72	8,03±0,98	7,61±0,89
		A ₂	8	7,90±0,61	7,11±0,51	6,07±0,65*
		A ₃	11	8,36±0,48	7,29±0,52**	5,41±0,40***
Креатинин, ммоль/л	0,15±0,01	A ₀	6	0,15±0,01	0,19±0,02	0,16±0,01
		A ₁	8	0,14±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01
		A ₂	8	0,14±0,01	0,12±0,01	0,09±0,01
		A ₃	11	0,13±0,01	0,09±0,01**	0,08±0,01**

Биохимические показатели крови в процессе лечения кошек со случайными гнойными ранами представлены в табл. 3.

Приведенные в табл. 3 данные биохимических исследований свидетельствуют о том, что уже на 3-и сутки наблюдения в крови животных, которых лечили по схеме А₃, отмечали достоверное снижение уровня АсАТ, мочевины

и креатинина в 1,3; 1,1 и 1,4 раза соответственно (p<0,01), а также АлАТ – в 1,4 раза (p<0,001) по сравнению с исходными данными.

Стоит отметить, что в крови кошек, которых лечили по схеме А₃, на 7-е сутки наблюдения регистрировали дальнейшую положительную динамику биохимических изменений.

Динамика интерлейкинов в крови кошек при гнойных ранах в процессе их лечения отражена в табл. 4. Полученные данные говорят о том, что в крови кошек, которых лечили с использованием созданных в ФИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН пробиотико-сорбционных препаратов Дилаксил и Сорбелакт, уже на 3-и сутки лечения достоверно снизились показатели IL-1 α , IL-6 и IL-8 в 1,3; 1,3 и 1,2 раза ($p < 0,01$), а также TNF- α – в 1,5 раза ($p < 0,001$) по сравнению с данными до лечения. На 7-е сутки лечения кошек с гнойными ранами отмечали дальнейшее высокодостоверное снижение уровня провоспалительных маркер-

ров: IL-1 α , IL-6, IL-8 и TNF- α в крови кошек с гнойными ранами, которых лечили по схеме А₃, достоверно ($p < 0,001$) уменьшались в 1,7; 1,6; 1,8 и 2,4 раза соответственно.

Цитологическими исследованиями раневой поверхности установлено, что комплексное лечение кошек со случайными гнойными ранами опытной группы А₃ с использованием пробиотико-сорбционных препаратов Дилаксил и Сорбелакт ускоряет процессы очистки и регенерации тканей, которые выражаются в существенном ускорении макрофагальной реакции и пролиферативных изменениях клеток, а также способствует активному развитию грануляций.

Таблица 4

Динамика провоспалительных цитокинов в крови кошек при случайных гнойных ранах в процессе лечения

Показатели	Клинически здоровые кошки (n=7)	Схема	n	До лечения	В процессе лечения	
					3-и сутки	7-е сутки
IL-1 α , пг/мл	5,12 \pm 0,29	A ₀	5	10,52 \pm 0,75	11,86 \pm 1,45	15,16 \pm 0,75
		A ₁	8	10,75 \pm 0,44	12,80 \pm 0,54*	9,30 \pm 0,37*
		A ₂	8	10,86 \pm 0,51	10,33 \pm 0,49	7,63 \pm 0,26***
		A ₃	10	10,05 \pm 0,46	7,80 \pm 0,44**	5,80 \pm 0,55***
IL-6, пг/мл	18,02 \pm 0,50	A ₀	5	32,82 \pm 2,56	37,20 \pm 2,75	38,46 \pm 2,83
		A ₁	8	34,58 \pm 0,42	36,32 \pm 0,45*	30,81 \pm 0,45***
		A ₂	8	34,53 \pm 0,45	32,66 \pm 0,39*	25,88 \pm 0,74***
		A ₃	10	35,12 \pm 0,63	26,69 \pm 0,76**	20,71 \pm 0,42***
IL-8, пг/мл	8,92 \pm 0,34	A ₀	5	15,62 \pm 0,70	17,28 \pm 0,52	19,18 \pm 0,75**
		A ₁	8	16,55 \pm 0,45	18,69 \pm 0,45**	14,39 \pm 0,58*
		A ₂	8	16,81 \pm 0,43	15,28 \pm 0,36	13,68 \pm 0,33***
		A ₃	10	16,74 \pm 0,69	13,28 \pm 0,65**	9,39 \pm 0,55***
TNF- α , пг/мл	3,82 \pm 0,30	A ₀	5	14,56 \pm 0,69	19,48 \pm 1,08**	23,08 \pm 0,99***
		A ₁	8	14,63 \pm 0,56	16,39 \pm 0,51*	12,78 \pm 0,53*
		A ₂	8	15,61 \pm 0,38	13,96 \pm 0,32*	11,93 \pm 0,37***
		A ₃	10	14,33 \pm 0,84	9,58 \pm 0,51***	5,94 \pm 0,37***

Критерии оценки течения раневого процесса у кошек при их лечении разными схемами

Клиническая характеристика	Контрольная группа A ₀	Опытная группа A ₁	Опытная группа A ₂	Опытная группа A ₃
Исчезновение гиперемии, сут	9,45±0,57	3,75±0,21***	2,75±0,21***	1,90±0,18***
Уменьшение отека, сут	11,45±0,57	4,62±0,34***	3,75±0,33***	2,90±0,18***
Очищение ран и формирование грануляций, сут	13,45±0,57	5,62±0,34***	4,75±0,33***	3,76±0,22***
Начало эпителизации, сут	23,90±0,41	11,62±0,34***	9,93±0,28***	7,76±0,23***
Полное заживление ран, сут	33,27±0,50	20,62±0,34***	17,93±0,28***	14,76±0,22***

Примечание: *** – $p < 0,001$ при сравнении с животными контрольной группы.

Клинические результаты лечения кошек контрольной и опытных групп со случайными гнойными ранами приведены в табл. 5 и на рисунке.

Данные табл. 5 и рис. свидетельствуют о том, что использование пробиотико-сорбционных препаратов при лечении кошек с гнойными ранами существенно ускоряет их заживление.



а



б

Рис. Кот, беспородный, самец, 2 года. Кусано-рваная рана в области шеи (опытная группа A₃): а – вид гнойной раны до проведения ПХО; б – аппликация препарата Дилаксил.

Так, среднее время очищения ран и формирования грануляций у животных группы A_3 оказалось в 3,6 раза меньше, чем у кошек контрольной группы ($p < 0,001$). Это обуславливало скорейшее начало роста по периферии ран эпителиальной каймы, возникающее в 3,1 раза быстрее у кошек опытной группы A_3 по сравнению с животными группы A_0 ($p < 0,001$). Необходимо отметить, что полное заживление ран с образованием рубца наступало в A_1 , A_2 и A_3 группах животных в 1,6, 1,9 и 2,3 раза соответственно быстрее, чем у кошек контрольной группы A_0 ($p < 0,001$).

Заключение

Предложенные нами пробиотико-сорбционные препараты Дилаксил и Сорбелакт при комплексном лечении кошек с гнойными ранами показали свою эффективность. Их применение позитивно влияет на морфо-биохимический и иммунологический профиль крови, на очищение раневой поверхности от гнойного экссудата, сокращает сроки начала эпителизации ран и способствует скорейшему полному их заживлению.

Список литературы

1. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н., Бондаренко В.М. и др. Перспективы создания пробиотических препаратов на основе «чувства кворума» у бактерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. № 3. С. 105-113.
2. Карелин А.В. Опыт применения пробиотиков в лечении кожных экзем у собак // Матеріали 5 міжнародної наук.-практ. конф. з проблем дрібнихтварин. - м. Кам'янець-Подільський. 2006. С. 117-119.
3. Клименко В.Н., Тугушев А.С., Шаповал С.Д. и др. Использование эубиотиков в ле-

чении больных с длительно не заживающей гнойно-воспалительной раной // Клінічнахірургія. 2002. № 36. С. 33-34.

4. Мель Н.П. Влияние антибиотиков на систему мать-плод и здоровье новорожденных: автореф. дисс...канд. мед. наук. – Владивосток. 1990. 20 с.
5. Москаленко В.З., Грона В.Н., Литовка В.К. и др. Лечение ран от укуса животных у детей // Клінічнахірургія. 2004. № 48. С. 73.
6. Новик Г.И., Михалюк А.Н., Самарцев А.А. и др. Получение новых пробиотиков и изучение их влияния на белковый обмен и формирование нормальной микрофлоры у поросят // Биотехнология. 2006. № 6. С. 63-71.
7. Руденко П.А. Современные подходы к борьбе с гнойно-воспалительными процессами у мелких домашних животных // Российский ветеринарный журнал (Мелкие домашние животные). 2016. № 3. С. 26-29.
8. Стегний Б.Т., Гужвинская С.А. Перспективы использования пробиотиков в животноводстве // Ветеринария. 2005. № 11. С. 10-11.
9. Blankush J.M., Leitman I.M., Soleiman A., et al. Association between elevated preoperative glycosylated hemoglobin and postoperative infections after non-emergent surgery // Ann. Med. Surg. - London. 2016. Vol. 9. No. 10. P. 77-82.
10. Kotzampassi K., Giamarellos-Bourboulis E.J., Voudouris A., et al. Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial // World J. Surg. 2006. No. 30(10). P. 848-855.
11. Matsumoto T., Ishikawa H., Tateda K. Oral administration of *Bifidobacterium longum* prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice // J. Appl. microbiol. 2007. No. 10. P. 134-145.
12. Ren Y.F., Wang L.L. Effects of probiotics on intestinal bacterial colonization in premature infants // Zhongguo Dang Dai ErKeZaZhi. 2010. No. 12(3). P. 192-194.
13. Sharma B., Srivastava S., Singh N., et al. Role of probiotics on gut permeability and endotoxemia in patients with acute pancreatitis: a double-blind randomized controlled trial // J. Clin. gastroenterol. 2010. No. 3. P. 243-247.

14. *Voltan S., Castagliuolo I., Elli M., et al.* Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. No. 14(9). P. 138-148.
15. *Wynn S.G.* Probiotics in veterinary practice // *J. Am. vet. med. assoc.* 2009. No. 234(5). P. 606-613.
16. *Yoshikawa K., Kurita N., Higashijima J., et al.* Kampo medicine Dai-kenchu-to prevents bacterial translocation in rats // *Dig. Dis. Sci.* 2008. No. 53(7). P. 824-831.

Efficiency of probiotic use on the model of pyoinflammatory process in cats

P.A. Rudenko, A.N. Murashev

The article presents data on the dynamics of hematological parameters of blood of cats to control the effectiveness of treatment of purulent wounds probiotics. Probiotics-sorption preparations “Dilaksil” and “Sorbelakt” in complex treatment of cats with purulent wounds found to be effective. Their use has a positive effect on hematological parameters of blood of experimental animals, cleaning the wound from purulent exudate, reduces the time of the beginning of the epithelialization of wounds and their complete healing.

Keywords: cats, complex treatment, purulent wounds, probiotics.

Влияние новой калиевой соли на основе 3-тиетанилзамещенного триазола на систему гемостаза

А.В. Самородов, Ф.Х. Камилов, А.Р. Халимов, Е.Э. Клен,
Ф.А. Халиуллин

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Уфа

Контактная информация: Самородов Александр Владимирович, avsamorodov@gmail.com

В данной работе представлены результаты исследования активности новой калиевой соли 2-[3-бром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазолил-5-тио]уксусной кислоты в отношении системы гемостаза. Установлено, что калиевая соль 2-[3-бром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазолил-5-тио]уксусной кислоты проявляет высокую антиагрегационную активность в условиях *in vitro* и *in vivo* и эффективность в качестве средства профилактики генерализованного тромбоза в эксперименте в сравнении с применяемыми в практике лекарственными средствами. Результаты проведенного исследования позволяют считать данное соединение перспективным антитромботическим средством.

Ключевые слова: производные 3-тиетанилзамещенного триазола, система гемостаза, антиромботическая активность.

Введение

Тромбогемморагические заболевания в настоящее время являются наиболее распространенными видами патологии человека, удерживающими первое место среди причин инвалидизации и смертности, а также в значительной степени определяющие качество и среднюю продолжительность жизни населения [6]. Несмотря на широкий выбор лекарственных препаратов, селективных средств коррекции системы гемостаза на сегодняшний день не существует. Результаты предыдущих исследований, проведенных на кафедрах биологической и фармацевтической химии ГБОУ ВПО «Башкирского государственного медицинского университета» Минздрава России, направленных на поиск антиагрегантов среди новых производных

азотсодержащих гетероциклов, демонстрируют высокий потенциал отдельных соединений данного класса производных [7].

Целью данной работы явилось представление первичных результатов исследования новой калиевой соли 2-[3-бром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазолил-5-тио]уксусной кислоты [1] (соединение I) в отношении системы гемостаза.

Материалы и методы

Дизайн исследования.

Вся экспериментальная работа выполнена в соответствии с рекомендациями «Руководства по доклиническому изучению новых фармакологических веществ» [2] и проведена в несколько этапов. На первом этапе в условиях

in vitro, на крови здоровых доноров, оценили влияние соединения I и препаратов сравнения на адгезивно-агрегационную функцию тромбоцитов и коагуляционный компонент гемостаза. Вторым этапом оценили эффективность антитромботического эффекта соединения I и препаратов сравнения на исходно компрометированных тромбоцитах в условиях *in vitro*: методом активированной тромбоэластографии смоделировали гиперактивность системы гемостаза с последующей оценкой эффективности препаратов сравнения и впервые синтезированного соединения I; в условиях *ex vivo* осуществили анализ функциональной активности тромбоцитов при различных тромбо-ишемических процессах для получения тромбоцитов в состоянии гиперагрегации и установили эффективную концентрацию (IC50) впервые синтезированного соединения I и препаратов-антиагрегантов. Завершили исследование изучением эффективности соединения I и препаратов сравнения при экспериментальном тромбозе на мышах.

Экспериментальная часть работы в условиях *in vitro* выполнена на крови доноров-мужчин и пациентов с остро возникшим тромбозом. Моделирование гиперактивности системы гемостаза в условиях *in vitro* методом активированной тромбоэластографии выполнено на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18-24 лет. Исследование было одобрено этическим комитетом ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (№ 2 от 17.10.2012 г.). От всех участников исследования было получено информированное согласие до момента забора крови.

В исследовании, направленном на изучение эффективности потенциальных антиагрегантов в условиях состоявшегося тромбоза, была использована кровь пациентов, находящихся в анестезиолого-реанимационном отделении I Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова (г. Уфа) в период 2012-2014 гг., со следующими заболеваниями: острый коронарный синдром (ОКС) – 22 пациента; тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) – 29 пациентов; тромбоз глубоких вен (ТГВ) / мезентериальный тромбоз (МТ) – 23 пациента. Исходные показатели агрегации тромбоцитов госпитализированных пациентов были получены при заборе венозной крови до начала проведения антитромботической/тромболитической терапии, согласно плану проведения интенсивной терапии. Анализ подвергали только результаты на образцах крови пациентов с установленным позже диагнозом, соответствующим указанным выше нозологиям. При выявлении у пациента тромбоцитов в состоянии гиперагрегации проводили определение зависимости «концентрация-эффект» исследуемого соединения и препаратов сравнения с расчетом IC50 – концентрации, при которой агрегация тромбоцитов снижается на 50%.

Взятие крови и центрифугирование. Забор крови проводили с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Dickinson and Company, США). В качестве стабилизатора венозной крови использовали 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1.

Все тесты проводили на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугировани-

ем цитратной крови при 100g в течение 10 мин, бестромбоцитарной плазмы – при 300g в течение 15 мин. В работе использовалась центрифуга ОПН-3.02 (ОАО ТНК «ДАСТАН», Киргизия).

Агрегация тромбоцитов. Исследование влияния соединения I и препаратов сравнения на агрегацию тромбоцитов в условиях *in vitro* на крови человека осуществляли с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов «Биола 230LA» (ООО НПФ «БИОЛА», Россия) [4]. В качестве индуктора агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл, коллаген – 5 мг/мл, адреналин – 5 мкг/мл и ристомидин – 10 мг/мл производства «Технология-Стандарт» (г. Барнаул, Россия).

Коагуляционный компонент гемостаза. Определение антикоагуляционной активности соединения I и гепарина натрия проводили общепризнанными клоттинговыми тестами на турбидиметрическом гемокоагулометре Solar CGL 2110 (ЗАО «СОЛАР», Беларусь). Изучались показатели активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени (ПВ) и концентрации фибриногена по A. Clauss [2]. Определение антикоагуляционной активности исследуемых веществ проводили в концентрации 10^{-3} г/мл. В работе использовались реактивы фирмы «Технология-Стандарт» (г. Барнаул, Россия).

Тромбоэластография. Тромбоэластографию проводили на аппарате TEG 5000 (Haemoscope Corporation, США). При анализе тромбоэластограмм определяли общую тенденцию коагуляции (R), функциональную активность тромбоцитов и фибриногена (MA, Angle),

активность фибринолиза (CLT) и физико-механические свойства образовавшихся сгустков (G). В качестве активатора ТЭГ использовали 0,2 М раствор CaCl_2 , рекомбинантный тканевой фактор (Innovin[®], Dade Behring, Германия) и тромбин («Технология-Стандарт», Россия).

Экспериментальные исследования в условиях *in vivo* выполнены с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных для экспериментальных животных, правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96, ГОСТР 50258-92) и приказа Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном режиме освещения, температуре воздуха $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности 55-60% в пластиковых клетках с подстилкой из древесных опилок. За 24 ч до начала исследовательской работы прекращали кормление без ограничения доступа к воде.

Моделирование коллаген-адреналинового тромбоза.

Исследовательская работа, направленная на изучение профилактического эффекта соединения I и пентоксифиллина, как аналогового препарата при моделировании генерализованного коллаген-адреналинового тромбоза, выполнена на 60-ти белых беспородных мышьях-самцах половозрелого возраста массой 20-22 г. Моделирование генерализованного тромбоза проводили по методу G.S. Di Minno [5]. Для определения

антиромботического эффекта за 1 ч до моделирования тромбоза контрольной группе мышей внутрибрюшинно вводили физ. раствор, экспериментальным группам – исследуемые вещества в эквивалентных концентрациях и аналогичном объеме. Моделирование генерализованного тромбоза проводили введением индукторов агрегации в хвостовую вену мышей. В качестве триггера тромбоза использовали смесь растворов коллагена и адреналина (0,5 и 0,06 мг/кг соответственно). Длительность наблюдения за животными составляла 14 суток.

Препараты сравнения.

В качестве препаратов сравнения в экспериментах использовали 3,7-диметил-1-(5-оксогексил)ксантин (Пентоксифиллин, ОАО «Дальхимфарм», Россия), 2-ацетилоксибензойную кислоту (Ацетилсалициловая кислота, «Фармацевтическая фабрика Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко., ЛТД», Китай) и гепарин натрия (ОАО «Синтез», Курган, Россия).

Статистическая обработка.

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета Statistica 10.0 (StatSoft Inc, США). Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для описания групп использованы медиана и межквартильный интервал. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса (для независимых наблюдений) и Фридмана (для повторных наблюдений). Выживаемость оценивали от времени инъекции в хвостовую вену взвеси коллагена и адреналина до момента гибели или по истечении 14-ти суток наблюдений. Анализ выживаемости проведен при

помощи метода Каплана-Мейера. Различия выживаемости между группами оценивались при помощи критерия Вилкоксона. Критический уровень значимости (p) для статистических критериев принимали равным 0,05. Величину IC_{50} соединения I и препаратов сравнения рассчитывали с помощью нелинейного фиттинга кривых, описывающих антиагрегационную активность (%) по логарифмическому уравнению с четырьмя параметрами, используя программное обеспечение GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования влияния соединения I и препаратов сравнения на индуктор-индуцированную агрегацию тромбоцитов представлены в табл. 1. Установлено, что соединение I превосходит пентоксифиллин и ацетилсалициловую кислоту как по уровню, так и по спектру антиагрегационной активности - IC_{50} , при которой агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ, снижается на 50%, и для соединения I составляет $1,6 \times 10^{-3}$ М/л, для пентоксифиллина – $2,2 \times 10^{-3}$ М/л.

Следующим этапом установили влияние соединения I и гепарина натрия на коагуляционный компонент системы гемостаза. Соединение I проявляет антикоагуляционную активность исключительно удлинением активированного парциального тромбопластинового времени в среднем на 63,1% относительно контроля, что значительно превышает активность препарата сравнения в аналогичной концентрации (табл. 2). Влияния на другие показатели коагулограммы соединения I и препарата сравнения не отмечалось.

Таблица 1

Показатели антиагрегационной активности пентоксифиллина и соединения I при индуктор-индуцированной агрегации тромбоцитов Me (25-75)

Вещество	Концентрация, М/л	АДФ, 20 мкг/мл	Коллаген, 5 мг/мл	Адреналин, 5 мкг/мл	Ристомин, 10 мг/мл	IC50, М/л
Соединение I	2×10 ⁻³	61,0 (58,7-64,3) p ₁ =0,002 p ₂ =0,0001	100,0 (100,0-100,0) p ₁ <0,00001 p ₂ <0,00001	23,7 (19,6-26,5) p ₁ <0,0001 p ₂ <0,0001	0,0 (0,0-0,0)	1,6×10 ⁻³
	10 ⁻³	26,4 (23,5-27,1) p ₁ =0,0003 p ₂ <<0,001	20,4 (16,7-24,1) p ₁ =0,001 p ₂ =0,0007	12,1 (9,8-14,5) p ₁ =0,002 p ₂ =0,003	0,0 (0,0-0,0)	
	5 10 ⁻⁴	13,6 (10,4-15,4)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	
Пентоксифиллин	4×10 ⁻³	63,7 (58,9-9,2) p ₁ =0,003 p ₂ =0,001	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	2,2×10 ⁻³
	2×10 ⁻³	48,4 (42,7-56,5) p ₁ <0,00005	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	
	10 ⁻³	12,7 (10,5-15,6) p ₁ <0,006	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	
	5×10 ⁻⁴	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	
Аспирин	2×10 ⁻³	13,7 (10,8-16,4)	11,6 (9,5-14,7)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	4,2×10 ⁻³
	10 ⁻³	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	

Примечание: представлены медиана и межквартильный интервал, IC50 рассчитан для АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, н/д – нет данных n=7; p₁ – уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контролем; p₂ – уровень статистической значимости различий признаков группы препарата сравнения и соединения I.

Таблица 2

Влияние соединения I и препарата сравнения на коагуляционные свойства плазмы

Соединение	n	АПТВ, % к контролю	ПВ, % к контролю	Фибриноген, % к контролю
Соединение I	7	63,1 (56,5-64,3)*	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Гепарин	7	54,7 (51,3-57,4)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)

Примечание: представлены медиана и межквартильный интервал, n=7; АПТВ – активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время; * – уровень статистической значимости различий признаков группы гепарина натрия и соединения I (p=0,003).

Результаты регистрации тромбоэластограмм образцов цитратной крови (ЦК), активированных тканевым фактором (ТФ) и тромбином (ТР) (табл. 3), демонстрируют снижение показателя R, характеризующего время образования первых нитей фибрина (представляет собой энзиматическую часть коагуляции). Время R сокращается в среднем на 24% ($p \leq 0,001$) при внесении тканевого фактора и на 43,5% ($p \leq 0,0001$) – тромбина. Показатель Angle, характеризующий скорость роста фибриновой сети и её структурообразование, статистически значимо увеличивается под влиянием

активаторов свертывания. Данный показатель удлиняется в среднем на 15,1% ($p \leq 0,001$) при действии тканевого фактора и на 23,5% – тромбина ($p \leq 0,001$). Показатель MA, характеризующий функциональное состояние фибриногена и активность тромбоцитов, при действии тромбина и тканевого фактора удлиняется в среднем на 22,7% относительно контроля. Наиболее значимым в нашем исследовании является показатель прочности сгустка – G. Данный показатель в условиях активации свертывания тканевым фактором и тромбином статистически значимо увеличивается

Таблица 3

Динамика показателей тромбоэластограмм в присутствии изучаемых веществ в зависимости от активатора, Me (25-75)

Показатель		ЦК, n=7	ЦК+ТФ, n=7	ЦК+ТР, n=7
Контроль	R, min	12,8(10,3-15,6)	9,7(7,4-10,6)	7,2(5,1-8,7)
	Angle, deg	44,7(39,8-49,4)	51,4(49,1-53,8) ^β	56,3(53,6-59,8) ^β
	MA, mm	57,3(54,2-61,2)	69,4(65,2-71,8) ^β	68,4(66,1-70,2) ^β
	G, dyn/cm ²	5,7(4,5-8,1)	17,5(13,6-20,7) ^β	18,6(16,4-19,2) ^{α †}
	CLT, min	38,7(35,4-42,4)	44,6(42,3-47,8) ^α	45,6(43,2-47,4)
Пентоксифиллин	R, min	14,6(13,2-15,8)	9,5(8,4-10,4)	8,4(7,2-9,4)
	Angle, deg	33,7(29,6-35,2) [*]	43,7(41,9-45,6) ^{**}	47,8(44,8-48,2) ^{**}
	MA, mm	41,8(39,8-45,6) [*]	53,7(51,2-55,6) ^{**}	61,7(59,2-62,8) ^{**}
	G, dyn/cm ²	4,1(3,6-4,4) ^{**}	11,5(10,6-13,5) [*]	13,9(12,5-14,7) [*]
	CLT, min	36,2(31,2-38,7)	42,1(39,6-44,2)	43,1(39,7-44,7)
Аспирин	R, min	13,6(11,2-14,4)	9,1(8,5-11,3)	9,3(8,1-10,7)
	Angle, deg	33,7(29,6-35,2) ^{**}	46,4(41,2-48,5) [*]	41,2(37,9-44,7) [*]
	MA, mm	36,3(31,2-39,5) [*]	44,7(41,2-48,5) ^{**}	39,5(37,5-43,1) [*]
	G, dyn/cm ²	3,7(3,1-4,6) [*]	8,4(7,2-9,4) ^{**}	7,9(7,6-8,2) ^{**}
	CLT, min	38,4(36,7-39,4)	39,6(37,4-40,2)	36,2(34,1-39,8)
Соединение I	R, min	13,1(12,3-15,4)	8,2(7,6-9,4)	7,4(5,9-7,0)
	Angle, deg	22,4(20,4-23,1) ^{**}	35,8(35,4-37,7) ^{**}	38,5(34,6-40,7) ^{**}
	MA, mm	23,5(22,4-25,3) ^{**}	25,9(24,9-29,3) ^{**}	31,4(29,1-34,1) ^{**}
	G, dyn/cm ²	2,7(2,0-3,1) ^{**}	6,9(5,3-7,5) ^{**}	7,4(6,8-8,5) ^{**}
	CLT, min	37,1(34,9-36,5)	34,9(32,6-36,4)	36,2(35,1-39,6)

Примечание: α – $p < 0,05$; β – $p < 0,001$ – ЦК+ТФ или ЦК+ТР в сравнении с ЦК;

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$ – в сравнении с контролем; † – $p < 0,05$ – ЦК+ТФ в сравнении с СВ+ТР.

в 2,5 раза. Результаты, полученные на данном этапе, полностью соотносятся с данными литературы и объясняются особой ролью избытка тромбина и тканевого фактора в развитии тромбоза [3].

Препараты сравнения оказывают различное влияние на показатели активированных тромбоэластограмм. Действие ацетилсалициловой кислоты и пентоксифиллина характеризуется значимым снижением показателя максимальной амплитуды (МА). Однако их антиагрегационная активность эффективнее реализуется при активации свертывания тканевым фактором в сравнении с тромбином. Ацетилсалициловая кислота в данных условиях эксперимента эффективнее пентоксифиллина устраняет гиперкоагуляцию, вызванную избытком тромбина и тканевого фактора. В присутствии антиагрегантов показатели, ответственные за коагуляционный компонент гемостаза (R и Angle), изменений не претерпевают. Соединение I проявляет антиагрегационную активность, аналогичную препаратам сравнения: эффективность больше на ТФ-активированной тромбоэластограмме. При

этом показатели МА тромбоэластограммы статистически значимо снижаются в сравнении с контрольными значениями и препаратами сравнения. Показатель прочности сгустка (G) в присутствии соединения I практически снижается до значений тромбоэластограмм, регистрируемых без активации тромбином и тканевым фактором. Таким образом, впервые синтезированное соединение I демонстрирует потенциально высокую антитромботическую активность на модели гиперкоагуляции системы гемостаза.

Следующим этапом оценили эффективность новой калиевой соли на основе тиетансодержащего триазола, как потенциального антиагреганта, на крови пациентов с состоявшимся тромбозом, в условиях *ex vivo*, и сравнили с данными, полученными на интактных тромбоцитах здоровых добровольцев (табл. 1). Результаты исследования эффективности препаратов сравнения и соединения I на исходно компрометированных тромбоцитах представлены в табл. 4. Аналоговый препарат – пентоксифиллин в условиях *in vitro* способен эффек-

Таблица 4
Показатели антиагрегационной активности изученных веществ на крови пациентов с тромбозом, Me (25-75)

Концентрация, М/л		40×10 ⁻⁴	20×10 ⁻⁴	10×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	IC50, М/л
Антиагрегационная активность, %	Пентоксифиллин	42,8* (41,1-44,8)	25,8* (21,5-26,5)	6,9** (4,6-8,1)	0,0 (0,0-0,0)	4,4×10 ⁻³
	Аспирин	51,8** (55,7-61,3)	30,4* (27,8-33,4)	17,9* (16,2-21,4)	0,0 (0,0-0,0)	3,9×10 ⁻³
	Соединение I	54,6* (47,2-59,6)	27,6* (23,1-32,5)	12,1* (7,7-16,2)	0,0 (0,0-0,0)	3,4×10 ⁻³

Примечание: представлена АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов;

* – p<0,05, ** – p<0,001 – уровень статистической значимости различий в сравнении с концентрацией 40×10⁻⁴ М/л; α – p<0,05; β – p<0,001 – уровень статистической значимости различий в группах интактных (табл. 1) и тромбоцитов в состоянии гиперагрегации.

тивно корректировать гиперактивность тромбоцитов. Концентрация, при которой АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов снижается на 50%, составляет $4,4 \times 10^{-3}$ М/л. Сопоставление показателей зависимости «концентрация-эффект» для интактных тромбоцитов (табл. 1) и тромбоцитов в состоянии гиперактивности демонстрирует двукратное увеличение дозы для достижения аналогичного эффекта. IC50 пентоксифиллина в группе контроля составила $2,2 \times 10^{-3}$ М/л. Ацетилсалициловая кислота, аналогично пентоксифиллину, в условиях *in vitro* способна корректировать гиперактивность тромбоцитов. При этом расчетное IC50 ацетилсалициловой кислоты составляет $4,2 \times 10^{-3}$ М/л для контрольной группы и $3,9 \times 10^{-3}$ М/л – в условиях гиперактивности тромбоцитов. Таким образом, эффективность аспирина в условиях *in vitro* при исходно компрометированных тромбоцитах возрастает.

Впервые синтезированное соединение I в условиях *in vitro* проявляет антиагрегационную активность, превосходящую показатели препаратов сравнения. При этом наблюдается эффект, подобный пентоксифиллину: IC50 для интактных тромбоцитов превышает практически в 2 раза аналогичный показатель для тромбоцитов в состоянии гиперактивности. IC50 для соединения

I на тромбоцитах в состоянии гиперактивности составляет $3,4 \times 10^{-3}$ М/л.

Дальнейшая работа выполнена в условиях *in vivo*. Результаты исследования антитромботического эффекта соединения I и пентоксифиллина при генерализованном коллаген-адреналиновым тромбозе представлены в табл. 5. В группе контроля инъекция взвеси адреналина и коллагена приводит к гибели всех животных в течение трех суток. При этом более 50% мышей погибло в течение первого часа эксперимента. Легкие, извлеченные после гибели животных, были темно-красного цвета, по всей площади наблюдались множественные тромбы. Пентоксифиллин статистически значимо ($p < 0,01$) снижает падеж мышей по сравнению с контролем. Выживаемость в группе пентоксифиллина на 14-е сутки наблюдения составила 58,3%. Основной падеж пришелся на первые сутки после введения индукторов тромбоза. Макроскопическая оценка извлеченных легких демонстрирует значительное снижение зоны тромбоэмболического поражения. В экспериментальной группе животных, получивших соединение I, гибель статистически значимо меньше в сравнении с контролем ($p_1 < 0,01$) и препаратом сравнения ($p < 0,001$). На 14-е сутки эксперимента показатель выживаемости при внутрибрюшинном введении соединения I составил 75,1%. Основная

Таблица 5
Показатели выживаемости при моделировании системного коллаген-адреналинового тромбоза, $M \pm SD$

Соединение	Контроль	Пентоксифиллин	Соединение I	p2
Время жизни, ч	2,0±1,8	165,8±157,6*	206,9±135,2*	<0,001

Примечание: * – уровень статистической значимости различий признаков в контрольной и опытной группах ($p_1 < 0,01$); p₂ – уровень статистической значимости различий признаков в группах, получавших пентоксифиллин и соединение I, при $\chi^2=33,1$.

гибель животных пришлось на первые сутки наблюдения. Легкие животных, которым вводили соединение I, имели нормальную окраску с минимальными точечными потемнениями. Выживаемость животных в группе, получавших соединение I, значительно превышает таковую в контрольной группе и на 25% – в группе у животных, получавших пентоксифиллин.

Заключение

Таким образом, калиевая соль 2-[3-бром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазолил-5-тио]уксусной кислоты демонстрирует высокую антиагрегационную активность в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также эффективность в качестве средства профилактики генерализованного тромбоза в эксперименте, что позволяет считать данное соединение перспективным антитромботическим средством.

Список литературы

1. Клен Е.Э., Халиуллин Ф.А., Спасов А.А., Макарова Н.Н., Багаутдинова Л.Ф., Науменко Л.В. Синтез и гемореологические свойства

- новых производных 1,2,4-триазола // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42. № 9. С. 15-17.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. - М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
3. *Badimon J.J., Lettino M., Toschi V.* Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: Effects of TFPI on plaque thrombogenicity under flow condition // *Circulation*. 1999. No. 14. P. 1780-1787.
4. *Born G.V.* Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature*. 1962. Vol. 194. P. 927-929.
5. *DiMinno G.S.* Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol / G.S. DiMinno // *J. Pharmacol. exp. ther.* 1983. Vol. 225. P. 57-60.
6. *Patrono C., Andreotti F., Arnesen H.* Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis // *European Heart J.* 2011. Vol. 32. P. 2922-2932.
7. *Samorodov A., Kamilov F., Timirkhanova G., Samorodova A., Khaliullin F., Murataev D.* Antithrombotic activity of new 1-ethylxanthine cyclohexylammonium salt // *FASEB J.* 2014. No. 28. P. 1054-5.

The study of new potassium salt based on 3-thietanil-substituted triazole in respect to hemostasis system

A.V. Samorodov, F.Kh. Kamilov, A.R. Khalimov, E.E. Klen, F.A. Khaliullin

The paper shows preliminary preclinical findings of new potassium salt of 2-[3-bromine-1-(thietanil-3)-1,2,4-triazolil-5-thio]acetic acid in regards to hemostasis system. The research has determined that potassium salt of 2-[3-bromine-1-(thietanil-3)-1,2,4-triazolil-5-thio]acetic acid shows high antiaggregational activity under condition *in vitro* and *in vivo*, it is more efficient as means to experimentally prevent generalized thrombosis in comparison with the practically applied therapeutic agents. The findings allow to consider this compound a promising antithrombotic drug.

Key words: 3-thietanil-substituted triazole derivatives, hemostasis, antithrombotic activity.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного и экспериментального характера, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвященные биологическому, математическому и комплексному моделированию, а новым медицинским технологиям. Особое внимание уделяется вопросам генетической, микробиологической, экологической стандартизации лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых видов стандартизации лабораторных животных, представляющих собой специализированные линии лабораторных животных и альтернативных биологических объектов, имеющих ценность для биомедицинских исследований, моделирующих патологические состояния человека, клеточных культур, органов и тканей. Рассматриваются материалы, посвященные вопросам экстремальных воздействий на организм, включая неблагоприятные факторы спорта высших достижений. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных.

Рубрикация журнала

1. Новые биомедицинские технологии.
2. Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.
3. Новые регуляторные пептиды.
4. Спортивное питание.
5. Релевантное и альтернативное биомоделирование.
6. Лабораторные животные.
7. Методы биомедицинских исследований.
8. Генетика лабораторных животных.
9. Доклинические исследования новых медицинских технологий.
10. Клинические исследования новых медицинских технологий.
11. Информационные материалы и нормативные документы.

Общие требования к оформлению

Статью следует представлять в двух экземплярах с электронной версией текста, набранным в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12 на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Латинские названия видов должны быть выделены *курсивом*.

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, контактная информация, 4) учреждения, в которых была проведена работа, почтовый адрес с индексом. На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов).

Объем представляемой статьи не должен превышать 16 машинописных страниц, включая таблицы и рисунки. Таблицы и рисунки расставляются авторами по тексту. Рисунки в электронной форме прилагаются отдельными файлами.

Результаты исследований должны быть статистически обработаны. Достоверность полученных результатов должна быть оценена с применением корректных статистических критериев.

В конце статьи приводится список цитированной литературы (не более 30 источников) и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи.

В конце статьи приводятся наименование статьи, фамилии авторов, реферат и ключевые слова на английском языке.

К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу и на отдельном листе – фамилию, имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

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

Все рукописи направляются на внешнее рецензирование.

За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается. После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

Рукописи направлять по адресу:

143442 Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые Горы, вл. 1. ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, редакция журнала «Биомедицина».

Электронный адрес для переписки с редакцией:

sinayva@yandex.ru или scbmt@yandex.ru

Телефон редакции: 8 (495) 561-52-64.

Подробные требования к оформлению статей и электронную версию журнала можно посмотреть на сайте www.scbmt.ru.

Лабораторкорм

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

Реализуем:

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



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

Доставка в любой регион России

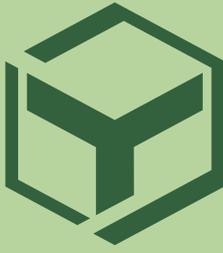
Наш адрес: Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 9 (Виварий)
ООО "Лабораторкорм"

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

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

www.laboratorkorm.ru, e-mail: info@laboratorkorm.ru

на правах рекламы



БИОМЕДИЦИНА

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

Филиал «Андреевка» образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году.

Постановлением Совета Министров СССР основной задачей Филиала является получение и выращивание лабораторных животных. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируруемыми по генетическим, физиологическим, морфологическим показате-

лям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С Филиалом сотрудничает более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАМН, РАН, Минздравсоцразвития, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

Филиал «Андреевка» предлагает следующих животных:

I. Морские свинки: альбиносы и пестрые.

II. Генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крыс; мыши SHK-самки подвержены раку молочных желез (частота заболевания выше 50%).

III. Линейные мыши и крысы:

– мыши линии DBA – имеют светло-коричневый окрас шерсти, используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях, для изучения нарушений вестибулярного и слухового аппаратов;

– мыши линии BALB/C – белого окраса, альбиносы, используются во всех медико-биологических исследованиях. Высокая частота опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком;

– мыши линии C57BL/6 – черного окраса. Используются в изучении скелетных аномалий, дефектов развития головы и

глаз. Стандартная линия для поддержания мутаций. Чувствительны к действию канцерогенов, стафилококков, сальмонелл;

– мыши линии CBA – серого окраса, используются в радиологии, медико-биологических геронтологических исследованиях, для изучения спонтанных опухолей печени;

– крысы Wistar – белого окраса, альбиносы. Используются для онкологических исследований, для изучения поведенческих реакций.

IV. Межлинейные гибриды мышей:

– F1 CBA x C57BL/6 – шерсть серого окраса;

– F1 C57BL/6 x DBA – шерсть черного окраса. Гибриды F1 используются для онкологических и радиационных исследований.



141551, М.О., Солнечногорский р-н, п/о Андреевка, д. 49

Тел.: 8(495)536-09-18; 8(495)536-37-58

Факс: 8(495)536-28-33

E-mail: andreevka-kv@rambler.ru

