

Захарова Ольга Анатольевна

**Изменение электрофоретической подвижности  
эритроцитов при действии стресс-факторов и коррекции  
состояния организма биологически активными  
веществами**

03.03.01 - физиология

Автореферат  
диссертации на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук

Нижний Новгород  
2012

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

**Научный руководитель:**

заслуженный деятель науки РФ,  
доктор биологических наук, профессор  
**Крылов Василий Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, доцент  
**Романова Елена Борисовна**

доктор медицинских наук, профессор  
**Перетягин Сергей Петрович**

**Ведущая организация:** государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Нижегородская государственная медицинская академия»

Защита состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2012 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, д.23, корп.1, биологический факультет. Факс: (831) 465-82-92

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_2012г., размещен на сайте ВАК РФ

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук, доцент

С.В.Копылова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Среди актуальных проблем современной физиологии и медицины возрастающее внимание уделяется проблеме стресса. Такой интерес обусловлен все возрастающими антропогенными факторами, которые, так или иначе, воздействуют на организм человека и животных, провоцируя развитие стресса. В зависимости от силы и длительности стрессового фактора организм либо приспосабливается к новым условиям, либо погибает. На начальных этапах стресса происходит активация приспособительных процессов, а при дальнейшем прогрессировании альтерационного процесса возможно истощение адаптационных резервов. При этом чрезмерная по интенсивности и длительности стресс-реакция из звена адаптации превращается в звено патогенеза. В то же время адекватная реакция организма способствует стабилизации состояния и предупреждает нарастание недостаточности функций. В связи с этим крайне важной представляется оптимизация адаптационного процесса при действии стресс-факторов.

Показано, что применение веществ-адаптогенов способствует тренировке механизмов адаптации (Pannosian, Wikim, 2006). Кроме того, адаптогены оказывают антигипоксическое и цитопротективное действие (Арбузов и др., 2006; Sandberg, Dencher, 1994). Адаптогенным действием могут обладать различные природные соединения. Широкое применение в медицине на сегодняшний день получили продукты пчеловодства (Крылов и др., 2007; Сулим, 2009), в частности маточное молочко, которое способствует повышению резистентности организма и обладает выраженной антиоксидантной активностью (Крылов, Сокольский, 2000; Вахонина и др., 2004). В терапевтических целях применяются препараты антигипоксического действия, такие как убихинон-10 (Крылов, Лукьянова, 2002), который обладает выраженным кардио- и радиозащитными свойствами (Корягин, Крылова, 2002) и янтарная кислота, обладающая антиоксидантными свойствами (Лукьянова, 2004). При лечении хронической цереброваскулярной недостаточности используются препараты кавинтон, цитофлавин, дельтаран, геримакс, обладающие нейропротективным и вазоактивным действиями (Остроумова, Ватутина, 2003).

Однако природные вещества-адаптогены в практике предупреждения и лечения заболеваний, связанных с действием стресс-факторов, на сегодняшний день не находят широкого применения для коррекции нарушенных функций. Это, видимо, связано с их относительно «мягким» и неочевидным действием и отсутствием экспериментального обоснования воздействовать на адаптационный процесс при действии стресс-факторов.

Среди методов, позволяющих привести такие доказательства, сегодня привлекает внимание измерение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) крови организма в условиях действия стресс-факторов и экспериментальной терапии веществами-адаптогенами. Электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) является одним из жизненно важных параметров гомеостаза человека (Рязанцева, Новицкий, 2004). Регистрация перемещения клеток крови в электрическом поле позволяет оценить не только их электрокинетический потенциал и, следовательно, морфофункциональное состояние мембраны, но и состояние гомеостаза организма в целом (Крылов, Густов, Дерюгина, 1998). Анализ литературных данных свидетельствует об однообразной реакции электрокинетического потенциала эритроцитов, их электрофоретической подвижности (ЭФПЭ) - снижении при самых разных заболеваниях: у пациентов, страдающих гепатитом, при инфекционных и опухолевых процессах, у больных хронической и подростковой гипопластической анемией, при физических нагрузках и психическом напряжении (Гильмутдинов, 1994; Матюшичев, Шамратова, Гуцаева, 1995; Матюшичев и др., 1996, 1997). На этом основании развивается положение о том, что изменение электрокинетического потенциала эритроцитов при различных экстремальных воздействиях является отражением общей неспецифической реакции организма и связан с развитием стресс-реакции и вовлечением стресс-реализующих систем на действие раздражителей (Крылов, Дерюгина, 1998, 2005). Данное положение доказано авторами в опытах на животных: изменение ЭФПЭ у крыс при стрессовых воздействиях носит однотипный двухфазный характер – первоначальное снижение с последующим повышением и восстановлением по мере отмены стресса (Крылов и др., 1998). При этом понижение ЭФПЭ авторы связывают с активацией симпатoadреналовой системы, а повышение с активацией гипофизарно-надпочечниковой системы. В связи с тем, что в основе многих патологических процессов и чрезвычайных раздражителей лежит развитие стресса разной выраженности (Гаркави и др., 1977), можно предположить, что изменение ЭФПЭ является ранним критерием стресс - реакции. Поэтому измерение и анализ ЭФПЭ могут служить убедительным маркером идущего в организме патологического процесса. Учитывая, что ЭФПЭ позволяет исследовать развитие не только стресс-реакции в организме, но и патологического процесса, отражая состояние гомеостаза организма в целом, можно полагать, что исследование электрокинетических свойств эритроцитов может быть эффективным критерием выраженности адаптационных реакций организма при проведении терапии (Крылов, Дерюгина, 2000). Таким образом, измерение ЭФПЭ может быть использовано для анализа степени вовлечения адаптационных резервов организма при проведении терапевтических мероприятий веществами-адаптогенами. Вышеизложенное послужило обоснованием цели исследования.

**Цель работы:** изучение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) крови человека и животных в норме, при альтерации и коррекции нарушенных функций организма веществами-адаптогенами.

Для достижения данной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Исследовать действие убихинона-10 и янтарной кислоты на ЭФПЭ крови крыс при моделировании адреналиновой токсемии и гипобарической гипоксии.
2. Исследовать действие пирацетама, кавинтона, цитофлавина и дельтарана на ЭФПЭ крови крыс на моделях локальной и тотальной ишемии головного мозга.
3. Исследовать изменения ЭФПЭ крови больных дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) разной степени тяжести в ходе терапевтических мероприятий.

### **Научная новизна**

В работе впервые проведено исследование ЭФПЭ крови человека и животных при проведении терапевтических и профилактических мероприятий природными веществами-адаптогенами в условиях нарушенных функций. Установлено, что предварительное введение убихинона-10, маточного молочка и янтарной кислоты препятствует снижению ЭФПЭ при гипоксических состояниях организма, вызванных адреналиновой токсемией и гипобарической гипоксией. Показано восстановление ЭФПЭ в ходе проведения стресс-модулирующей терапии при развитии ишемических повреждений головного мозга крыс. Выявлена однотипность изменения ЭФПЭ крови больных ДЭ и крови крыс при применении стресс-модулирующей терапии. Показана зависимость ЭФПЭ крови больных от тяжести заболевания и выбора препаратов-адаптогенов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Работа выполнена в соответствии с плановыми НИР кафедры. Часть работы выполнена в рамках реализации программы ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы («Исследование типовых изменений мембран клеток крови при нарушении функций организма разного патогенеза», Государственный контракт № П604).

Полученные результаты позволили установить закономерности изменения ЭФПЭ при формировании целостной реакции организма в ответ на стресс различного генеза и при профилактике и терапии альтераций веществами-адаптогенами. Анализ изменений ЭФП эритроцитов позволил обосновать эффективность применения эффективных и безопасных адаптогенов в профилактике и терапии гипоксии, при нарушениях мозгового кровообращения, и включения в реабилитационный комплекс при лечении больных дисциркуляторной энцефалопатией. Выявленная

направленность изменений ЭФПЭ при идущем в организме патологическом процессе и фармакологическом воздействии позволяет рекомендовать методику измерения электрофоретической подвижности эритроцитов при исследовании крови с целью ранней диагностики развития патологии и проводимой терапии.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Моделирование гипобарической гипоксии и адреналиновой токсемии вызывает однофазное изменение ЭФПЭ крови крыс: снижение с последующим восстановлением.
2. Предварительное введение маточного молочка, убихинона-10 и янтарной кислоты препятствуют снижению ЭФПЭ при гипобарической гипоксии и адреналиновой токсемии.
3. Моделирование тотальной и локальной ишемии головного мозга вызывает двухфазное изменение ЭФПЭ: первоначальное снижение (1 фаза) с последующим повышением (2 фаза).
4. Изменение ЭФПЭ крови больных дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) зависит от тяжести заболевания. Направленность изменения ЭФПЭ в ходе терапии сочетается с развитием общих адаптационных процессов в организме.

#### **Апробация работы**

Апробация работы проведена на расширенном заседании кафедры физиологии и биохимии человека и животных ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Основные положения доложены на XV, XVI Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов- 2008, 2009» (Москва, 2008, 2009); 13- й и 14- й Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2008, 2009); Всероссийской научно- практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной науки и образования» (Башкирия, 2010); XIV-ая Пущинская Международная школа-конференция молодых ученых. (Пущино, 2010); XXI съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга 2010); Международной конференции Пчеловодство XXI в. «Пчеловодство, апитерапия и качество жизни» (Москва, 2010); III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010», (Нижний Новгород, 2010).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 2 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

#### **Структура и объем диссертации**

Материалы диссертации изложены на \_\_\_ страницах машинописного текста, иллюстрированы \_\_\_ таблицами и \_\_\_ рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего \_\_\_ источников, из которых \_\_\_ на русском и \_\_\_ на иностранных языках.

### **Личный вклад соискателя**

В исследованиях, которые положены в основу диссертационной работы, соискатель планировал и принимал участие в проведении экспериментальных исследований, в оценке результатов и формулировке выводов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Исследование проведено на белых нелинейных крысах массой 200 - 220 г. Содержание животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (Бургасов, 1973). Всего было использовано 265 животных. В исследованиях на животных было проведено 3 серии экспериментов.

В 1-й серии моделировали адреналиновую токсемию (Андреев, 1973). Моделирование осуществляли путем внутримышечного введения по 0,5 мл 0,1 % раствора адреналина- гидрохлорида. Предварительно животным в течение 7 дней вводили внутривенно при помощи зонда препарат янтарной кислоты (0,5 г/кг) - 1 группа; убихинон-10 (10 мг/кг), растворенный в растительном масле - 2 группа; янтарная кислота+ убихинон-10 - 3 группа; 4 группа - контроль (скармливали растворитель - растительное масло 0,5 мл); интактные животные- 5 группа.

Во 2-й серии моделировали острую гипобарическую гипоксию. Моделирование осуществляли в вакуумной проточной барокамере при внешней температуре 20-22 °С (Петров, 1959). Крыс помещали в условия, соответствующие «подъему» на высоту 11000 м в течение 5 мин (Методические рекомендации, 1991). При этом исследовали действие убихинона-10 и маточного молочка при профилактическом применении, в течение 10 дней до гипоксического воздействия. Скармливали 100 мг/кг маточного молочка - 1 группа; 2 группа - скармливали убихинон (15 мг/кг), растворенный в растительном масле; 3 группа - скармливали маточное молочко (100 мг/кг) и убихинон (15 мг/кг); 4 группа - контроль (крысы получали растворитель - растительное масло 0,5 мл); 5 группа - интактные животные.

Кровь для анализа в экспериментах 1 и 2 серий брали из подъязычной вены через 15 мин, 1 сутки и 1 неделю после исследуемых видов воздействия.

В 3 серии у крыс моделировали локальную и тотальную ишемию головного мозга. Тотальную ишемию головного мозга моделировали путем одномоментной двусторонней окклюзии обеих сонных артерий (Rosemary, 1997). Локальную ишемию головного мозга вызывали путем клипирования средней мозговой артерии (Gill et al., 1991). Работу проводили под наркозом (нембутал, внутривенное введение 35 мг/кг). После операции рану обрабатывали пенициллином, кожу ушивали, шов обрабатывали 2% раствором йода. Через 10 дней после создания искусственной ишемии головного мозга животным вводили внутривенно пирацетам - 200 мг/кг и кавинтон - 0,7 мг/кг (1 группа), пирацетам, кавинтон и цитофлавин в дозе

1,6 мг/кг (2 группа), интраназально вводили препарат дельтаран в дозе 150 мкг/кг и внутривенно препараты пирацетам и кавинтон (3 группа). Животным контрольной группы терапевтических мероприятий не производили (4 группа); интактные животные (5 группа). Забор крови осуществлялся из подъязычной вены через 10 и 60 суток после моделирования гипоксии.

В клинических исследованиях на базе Нижегородской областной клинической больницы им. Н.А. Семашко (лечащий врач, д.м.н. Е.А. Антипенко) был проведен анализ крови 60 больных 35-55 лет, с диагнозом дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭ) разной степени тяжести (1, 2, 3 стадии заболевания). Больные были разделены на 4 группы. Все пациенты в течение 10 дней получали базовую терапию (пирацетам и кавинтон) – 1-я группа; 2-я группа получала дополнительно цитофлавин; 3-я группа – дельтаран (интраназально); Геримакс-энерджи – 4-я группа (по 1 таб./сутки в течение 20 дней). Кровь забирали из локтевой вены натощак, до и после проведенного курса лечения. В качестве контрольной группы исследовалась кровь 15 доноров.

Методы исследования включали измерение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) методом микроэлектрофореза (Харамоненко, Ракитянская, 1974). Принцип метода заключался в том, что в специально сконструированных планшетах измеряли под микроскопом скорость перемещения клетки в электрическом поле. Установка для определения ЭФПЭ состояла из горизонтальной микрокамеры, микроскопа, источника постоянного тока. Использовали электроды системы Ag/AgCl. Для измерения подвижности 0,1% суспензию эритроцитов помещали в трис-HCl буфер (pH 7,4) и фиксировали перемещение клеток при силе тока 8 мА. В каждом опыте фиксировали время перемещения 6 клеток в двух направлениях, при этом знак заряда изменялся на электродах полярным переключателем. Величину электрофоретической подвижности эритроцитов определяли по формуле:  $U=S/TH$ , где  $S$  – расстояние, на которое перемещается эритроцит;  $T$  – время перемещения эритроцита на расстояние  $S$ ;  $H$  – градиент потенциала. Величина градиента потенциала определяется по формуле:  $H=Y/gX$ , где  $Y$  – сила тока;  $g$  – поперечное сечение микрокамеры;  $X$  – удельная электропроводность среды. Концентрацию МДА определяли фотометрическим методом (Владимиров, Арчаков, 1972). Определение лейкоцитов в окрашенных по Романовскому – Гимзе мазках крови (Меньшиков и др., 1987) с учетом рекомендаций Гаркави (1998).

Полученные данные были обработаны с помощью пакетов прикладных программ BIOSTAT и Microsoft Excel. Значимость различий средних между группами определяли параметрическим методом по  $t$  – критерию Стьюдента с учетом поправки Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$  (Гланц, 1999).



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование ЭФПЭ крыс при моделировании альтераций функций организма животных.

Результаты проведенных исследований показали, что моделирование гипобарической гипоксии и адреналиновой токсемии у животных вызывало однотипное изменение динамики ЭФПЭ: снижение с последующим восстановлением данного показателя (рис.1). Снижение ЭФПЭ регистрировалось через 1-15 мин после моделирования альтерации и продолжалось 1-2 суток, с последующим восстановлением ЭФПЭ к 1-й неделе исследования (рис.1).

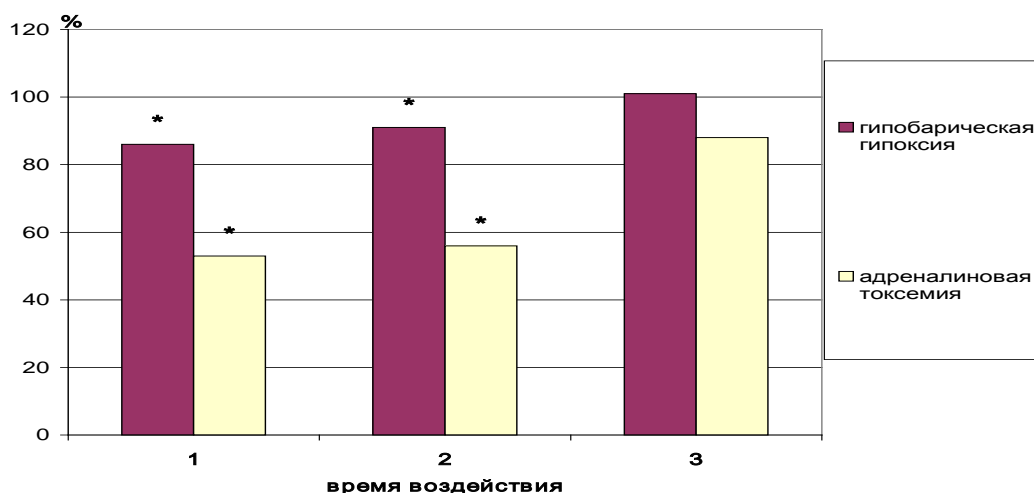


Рис. 1 Изменение ЭФПЭ (%) крови крыс при альтертирующих воздействиях.

*Примечание:* 1-15 минут; 2- 1сутки; 3-1 неделя

\*- статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ( $p \leq 0,05$ ), принятой за 100%.

Таким образом, была установлена типовая однофазная реакция эритроцитов на оба стрессорные воздействия, проявляющаяся в изменении их ЭФП: уменьшение ЭФПЭ с последующим восстановлением. Вместе с тем, указанная реакция отличалась по интенсивности в зависимости от модели – более выраженное снижение ЭФПЭ регистрировалось при моделировании адреналиновой токсемии.

При анализе изменения интенсивности ПОЛ при исследованных альтертирующих воздействиях было установлено, что при и том и другом стрессовом воздействии в организме, в фазу снижения ЭФПЭ, наблюдается рост концентрации МДА, с последующим восстановлением по мере восстановления скорости ЭФПЭ. Однако и здесь скорость, и интенсивность нарастания уровня МДА зависели от вида модели альтерации. Так, при моделировании адреналиновой токсемии уже на 1-15 минуте регистрировали

максимальный прирост МДА, тогда как при гипобарической гипоксии он максимально возрастал только через сутки после воздействия (рис.2).

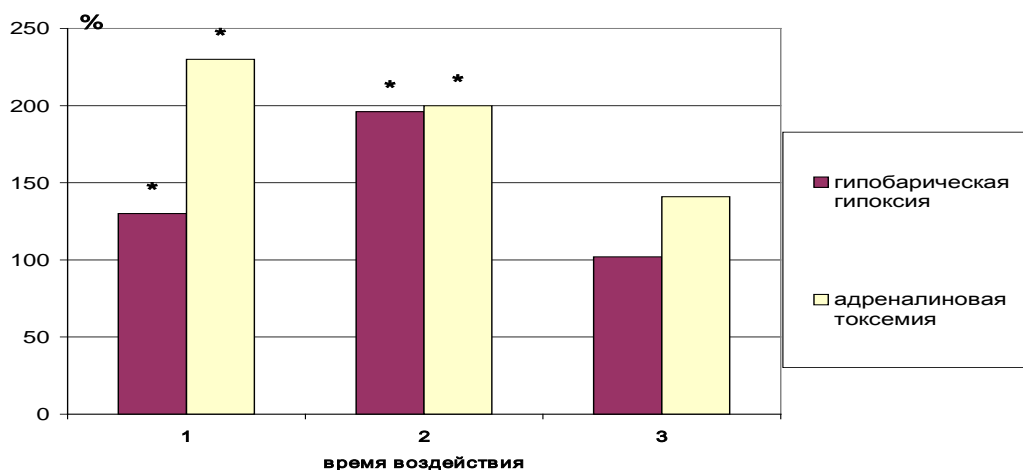


Рис. 2 Изменение концентрации МДА в эритроцитах (%) крови крыс при альтерирующих воздействиях.

*Примечание:* 1-15 минут; 2- 1сутки; 3-1 неделя

\*- статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ( $p \leq 0,05$ ), принятой за 100%.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что изменение ЭФПЭ связано с процессами ПОЛ эритроцитов и может отражать стереотипную реакцию клеток на стресс (Крылов, Дерюгина, 2005). Результаты свидетельствуют, что снижение ЭФПЭ сочетается с активацией процессов ПОЛ при действии стресс-факторов, тогда как восстановление значений ЭФПЭ сопровождается уменьшением концентрации МДА. Вместе с тем, выявленные типовые изменения ЭФПЭ и МДА имеют свою специфичность, зависящую от выбранной модели альтерации. Полученные результаты позволяют полагать, что адреналиновая токсемия вызывает более выраженную стресс-реакцию организма.

Ранее было показано (Крылов, Дерюгина 1998, 2005), что динамика изменения ЭФПЭ при действии различных стресс - факторов сопряжена с последовательной активацией стресс-реализующих систем организма: снижение ЭФПЭ обусловлено активацией симпато - адреналовой системы, тогда как повышение - гипофизарно-надпочечниковой. В отличие от этих исследований, в наших условиях установлено, что типичность изменения ЭФПЭ при моделировании гипобарической гипоксии и адреналиновой токсемии включает только первую фазу (снижение ЭФПЭ) без проявления второй фазы (повышение ЭФПЭ). Видимо, это связано с более существенной активацией только первого звена стресс-реализующей системы (симпато – адреналовой), с соответствующим увеличением уровня циркулирующих катехоламинов в крови и (или) повышением чувствительности к ним адренорецепторов клеток. Из этого можно объяснить и более значимое

изменение изученных параметров именно при адреналиновой токсемии – эндогенные катехоламины могли потенцировать эффект экзогенного адреналина.

### **Исследование ЭФПЭ крыс при альтерирующих воздействиях и профилактическом действии адаптогенов.**

Эксперименты, связанные с профилактическим использованием янтарной кислоты и убихинона-10 при моделировании адреналиновой токсемии и маточного молочка и убихинона-10 при гипобарической гипоксии выявили отсутствие уменьшения ЭФПЭ, характерного для обоих видов при альтерации (контроль). При моделировании адреналиновой токсемии было установлено, что предварительное введение убихинона-10, так же как и янтарной кислоты и их смеси препятствовало снижению ЭФПЭ (рис.3). При этом наиболее значимо влияло на восстановление ЭФПЭ до значений интактных животных применение смеси препаратов. Так, через 7 суток исследования ЭФПЭ крови крыс после курсового введения смеси веществ не отличалась от уровня интактных животных (рис. 3).

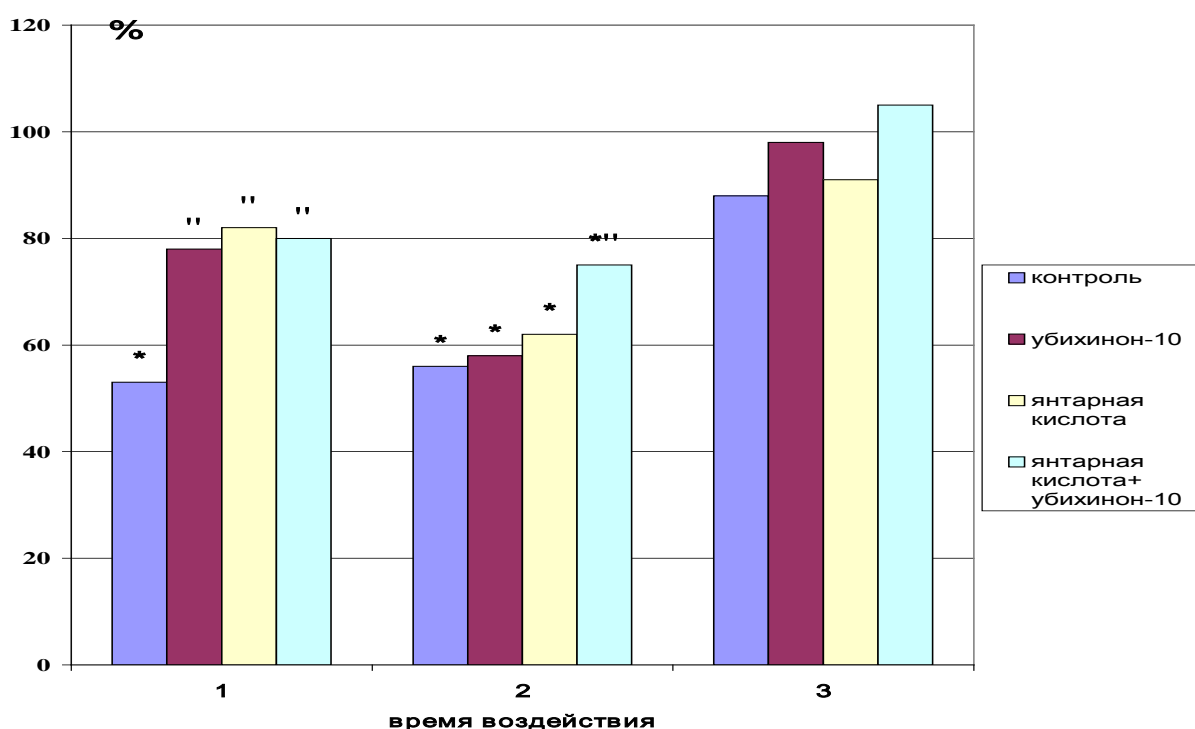


Рис. 3 Изменение ЭФПЭ (%) крови крыс при моделировании адреналиновой токсемии и профилактическом действии убихинона- 10 и янтарной кислоты.

*Примечание:* 1-15 минут; 2- 1сутки; 3-1 неделя.

\* - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ( $p \leq 0,05$ ), принятой за 100%; \*\* - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно говорить об эффективности применения исследуемых адаптогенов в качестве профилактики гипоксии, вызванной введением стресс-фактора - адреналина. При этом наиболее эффективным оказалось применение смеси убихинона-10 с янтарной кислотой. Исходя из концепции последовательных нарушений митохондриальных ферментов в условиях кислородной недостаточности и развития энергодефицита в клетке, можно заключить, что совместное применение убихинона-10 - корректора цитохромного участка и янтарной кислоты - корректора субстратного участка дыхательной цепи, позволяет более эффективно предотвратить возникающую гипоксию организма с соответствующим ответом изменения ЭФПЭ.

Таблица 1.

Изменение ЭФПЭ (мкм см В<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>) крови крыс при моделировании гипобарической гипоксии и профилактическом действии убихинона-10 и маточного молочка.

Группы	Время воздействия		
	15 минут	1 сутки	1 неделя
Интактные животные	1.27±0.03''	1.27±0.02''	1.23±0.02
Контроль	1,11±0,02*	1,15±0,02*	1.29±0.03*''
Убихинон-10	1.22±0.03''	1.20±0.03*	1.29±0.03*''
Маточное молочко	1.18±0.02*''	1.15±0.03*	1.28±0.02
Убихинон-10+ Маточное молочко	1.34±0.03''	1.30±0.02''	1.36±0.03*''

*Примечание:* \*- статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ( $p \leq 0,05$ ); ''- статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ( $p \leq 0,05$ ).

Аналогичные результаты были получены на другой модели альтерации – гипобарической гипоксии. В результате проведенных экспериментов по профилактике гипоксии убихиноном-10 и маточным молочком было установлено, что предварительное введение исследуемых препаратов также препятствовало снижению ЭФПЭ крови крыс во всех опытных группах (табл.1). Вместе с тем, было показано, что совместное применение маточного молочка и убихинона-10 не только препятствовало снижению ЭФПЭ, но и приводило к ее повышению по сравнению с группой интактных животных (табл.1). На 15 минуте и на 7 -е сутки исследования смесь препаратов наибольшим образом увеличивала ЭФПЭ крови животных относительно контроля, что может свидетельствовать о развитии

адаптационных процессов в организме, обеспечивающих приспособление его функционального состояния в условиях стрессового воздействия.

Вероятно, усиление метаболических процессов, благодаря совместному действию маточного молочка, которое улучшает трофику тканей, способствует активизации ферментативного обмена, улучшению тканевого дыхания (Крылов и др., 2007) и убихинона-10, обладающего выраженными антиоксидантными свойствами, (Лукиянова, 2000), способствует повышению адаптационных резервов организма.

Полученные результаты позволяют заключить, что исследуемые вещества-адаптогены препятствуют снижению и (или) приводят к повышению ЭФПЭ, что свидетельствует об активации компенсаторных механизмов регуляции функций организма, приводящих к уменьшению деструктивных изменений эритроцитарных мембран, развивающихся при альтерирующих воздействиях.

### **Исследование ЭФПЭ крыс при моделировании тотальной и локальной ишемии головного мозга и введении фармакологических средств.**

Физиологические механизмы гипоксии и адаптации в полной мере развиваются при ишемическом повреждении мозга, поэтому целесообразно было исследовать изменения ЭФПЭ с целью характеристики стресс-реакции организма в этих условиях. Необходимо учитывать, что как локальная, так и тотальная ишемия являются хроническим стрессом, при котором неспецифическая активация симпато-адреналовой системы, вызывающая снижение ЭФПЭ (Козинец, 2008), может сглаживаться развитием адаптационных процессов на уровне организма, связанных с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса вегетативной регуляции функций.

Таблица 2.

Электрофоретическая подвижность эритроцитов (мкм · см / В · с) крови крыс при хронической ишемии головного мозга

Группы	Время воздействия	
	10 суток	60 суток
Интактные животные	1,37±0,02	1,32±0,02
Тотальная ишемия головного мозга	0,86±0,05*	1,46±0,04*
Локальная ишемия головного мозга	0,92±0,04*	1,63±0,03*

*Примечание\**- статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ( $p \leq 0,05$ ).

В экспериментах на крысах было установлено, что при моделировании как тотальной, так и локальной ишемии головного мозга в крови животных наблюдается первичное снижение ЭФПЭ на 10-е сутки после воздействия с последующим повышением исследуемого показателя к 60-м суткам исследования (табл.2). При этом наиболее значимо ЭФПЭ повышалась при локальной ишемии головного мозга, что свидетельствует о более выраженной активации гипофизарно-надпочечниковой системы при данной альтерации организма.

Таким образом, установлено, что при моделировании хронической ишемии головного мозга у животных наблюдается типичное двухфазное изменение ЭФПЭ: первичное снижение – 1 фаза с последующим увеличением ЭФПЭ - 2 фаза. Полученные результаты свидетельствуют об универсальном характере структурно-функциональной перестройке мембран эритроцитов в ответ на действие различных стресс-факторов, что подтверждает проведенные ранее исследованиями положения (Крылов, Дерюгина, 2005): снижение ЭФПЭ обусловлено активацией симпатoadrenalовой системы, тогда как повышение - гипофизарно-надпочечниковой.

На 10-е сутки после воспроизведения хронической ишемии головного мозга крыс, в фазу понижения ЭФПЭ, были проведены «терапевтические» мероприятия, заключающиеся в курсовом введении препаратов-адаптогенов. Была применена схема, аналогичная терапевтическим мероприятиям у больных дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) – базовая терапия: пирацетам (ноотороп) плюс кавинтон (нейровасодиллятор) с добавлением веществ-адаптогенов – цитофлавина (янтарная кислота с витаминами), дельтарана (пептид дельта-сна). В соответствии со схемой исследовали отдаленные результаты проводимой «терапии» - на 60-е сутки эксперимента.

Было показано, что в условиях тотальной ишемии головного мозга животных наиболее значимое изменение ЭФПЭ в указанный этап исследования производила «базовая терапия» - внутрибрюшинное введение пирацетама и кавинтона (рис. 4). Менее значимо, но так же эффективно по сравнению с контролем и интактными животными повышалась ЭФПЭ при дополнении к пирацетаму и кавинтону цитофлавина. Дополнительное использование дельтарана не влияло на показатели ЭФПЭ крови животных, которые были сравнимы с уровнем контроля.

Иные результаты были получены в экспериментах с моделированием локальной ишемии головного мозга. Из рис. 5 видно, что, в отличие от тотальной ишемии, при локальной – на 60-е сутки после клиппирования средней мозговой артерии скорость ЭФПЭ в контрольной группе была существенно повышена. Однако эффекты изменения ЭФПЭ при терапевтических воздействиях при локальной и тотальной ишемией были достаточно однотипными: наибольшие изменения по сравнению с интактными животными наблюдались при базовой терапии и добавлении цитофлавина, а наименьшие – при добавлении дельтарана. Однако только дельтаран приводил к уменьшению ЭФПЭ по отношению к контролю.

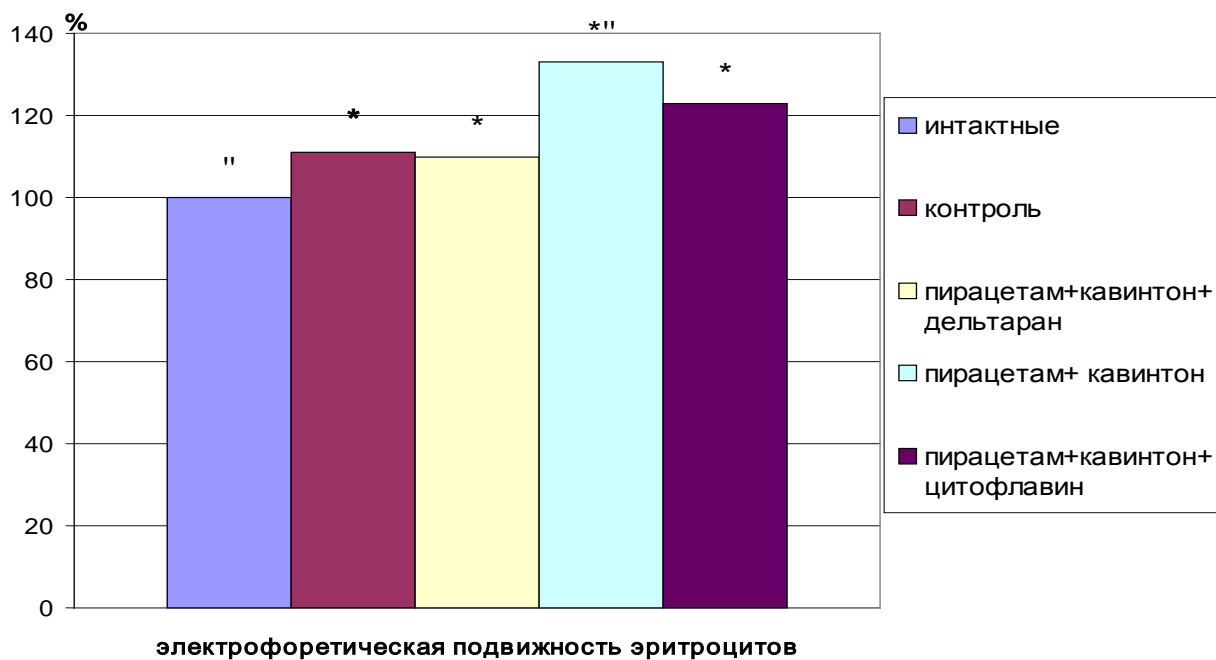


Рис. 4 ЭФПЭ (%) крови крыс при проведении терапии на фоне тотальной ишемии головного мозга к 60 суткам наблюдения.

Примечание: на рис. 4, 5 \*- статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ( $p \leq 0,05$ ); ''- статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ( $p \leq 0,05$ ).

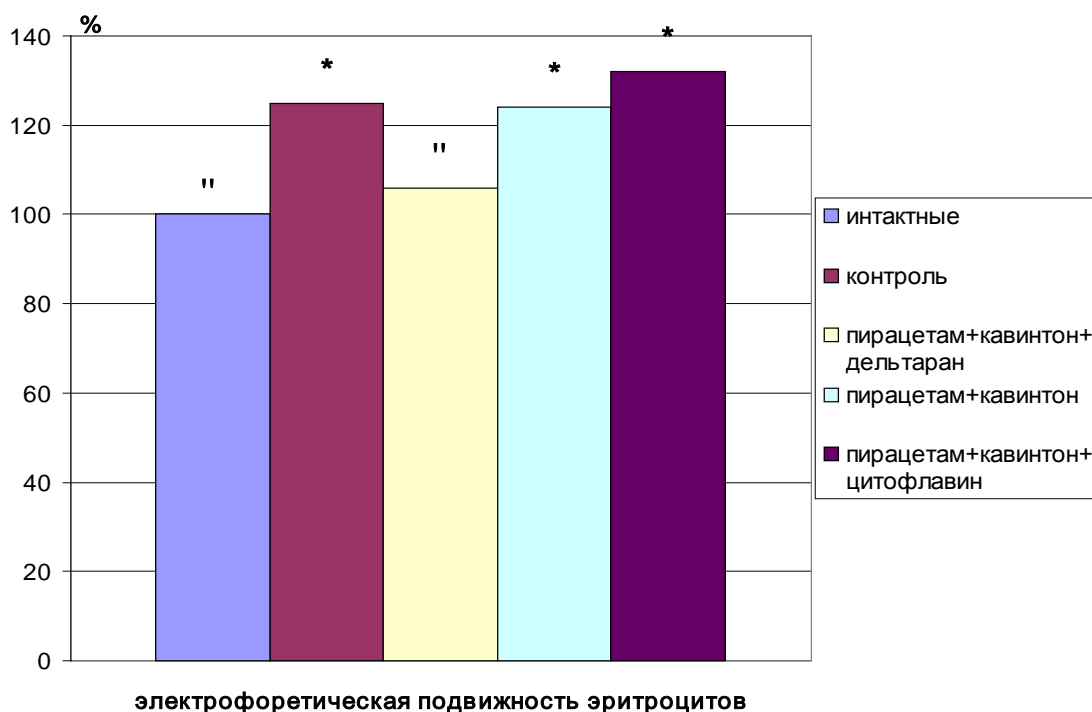


Рис. 5 ЭФПЭ (%) крови крыс при проведении терапии на фоне локальной ишемии головного мозга к 60 суткам наблюдения.

Из полученных результатов следует заключить, что препараты: пирацетам, обладающий ноотропным действием; кавинтон - сосудорасширяющий препарат и цитофлавин – цитопротектор, судя по изменению ЭФПЭ, вызывали дополнительную активацию стрессреализующих систем при моделировании как тотальной, так и локальной ишемии головного мозга крыс. В отличие от этого, при локальной ишемии только действие дельтарана приводило к снижению ЭФПЭ крови стрессированных животных, тем самым, приближая адаптационные реакции к уровню физиологической нормы и вызывая восстановление исходного статуса организма.

### **Исследование изменений ЭФПЭ крови больных дисциркуляторной энцефалопатией разной степени тяжести в ходе терапевтических мероприятий.**

В ходе исследования ЭФПЭ крови больных дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) было показано, что при поступлении в стационар на I и II стадиях заболевания ЭФПЭ была повышена, а на III стадии - понижена по сравнению с возрастной нормой. Мы связали это с постепенным истощением субстратов коры надпочечников и снижением адаптационных резервов организма в целом при развитии ишемических повреждений головного мозга. При этом лейкоцитарная формула (ЛФ) (табл.3) свидетельствовала о снижении уровня реактивности на всех стадиях заболевания, особенно выраженной на третьей стадии, в связи с развитием десинхронизации в работе подсистем организма при усугублении патологии. Исследование изменения ЭФПЭ и ЛФ больных ДЭ после проведенной курсовой терапии показало, что она зависит как от тяжести заболевания, так и выбора препаратов лечения. На рисунке 6 видно, что применение базовой терапии (пирацетам и кавинтон) больным ДЭ I-й стадии заболевания, так же как и дополнительно дельтарана и цитофлавина приводило к тенденции восстановления (снижения) ЭФПЭ к уровню показателей ЭФПЭ условно-здоровых людей (доноры), указывая на приближение адаптационных реакций к уровню физиологической нормы и восстановлению баланса стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем. Применение геримакса в отличие от цитофлавина и дельтарана приводило к дальнейшему повышению ЭФПЭ больных, что, видимо, отражало переактивацию адаптационных процессов.

На II-й стадии заболевания, в отличие от результатов, полученных при изучении ЭФПЭ больных I-й стадии, применение препаратов базового комплекса и дополнительно геримакса и цитофлавина приводило к повышению ЭФПЭ по отношению к ЭФПЭ группы здоровые (доноры) (Рис.7). Регистрируемые изменения ЭФПЭ свидетельствуют об активизации процессов адаптации при действии исследуемых препаратов, что, видимо, обусловлено недостаточной активностью гипофизарно – надпочечниковой системы на второй стадии. Однако отмеченное избыточное нарастание показателя отражало переактивацию адаптационных процессов. В то же



время дополнительное использование к базовой терапии дельтарана, вызывало уменьшение исходно повышенного показателя ЭФПЭ (Рис.7).

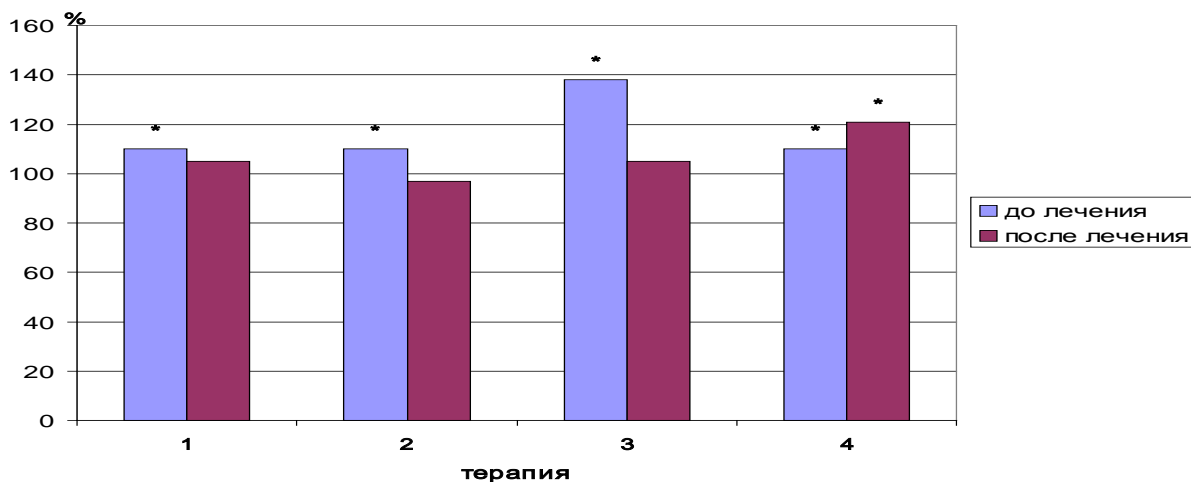


Рис. 6 ЭФПЭ (%) крови больных дисциркуляторной энцефалопатией 1-й стадии заболевания при терапии.

1. Базовое лечение (пирацетам и кавинтон)
2. Комплексное лечение (базовое + дельтаран)
3. Комплексное лечение (базовое + цитофлавин)
4. Комплексное лечение (базовое + геримакс)

Примечание \*-  $p \leq 0,05$  по отношению к группе здоровые (доноры) (100%).

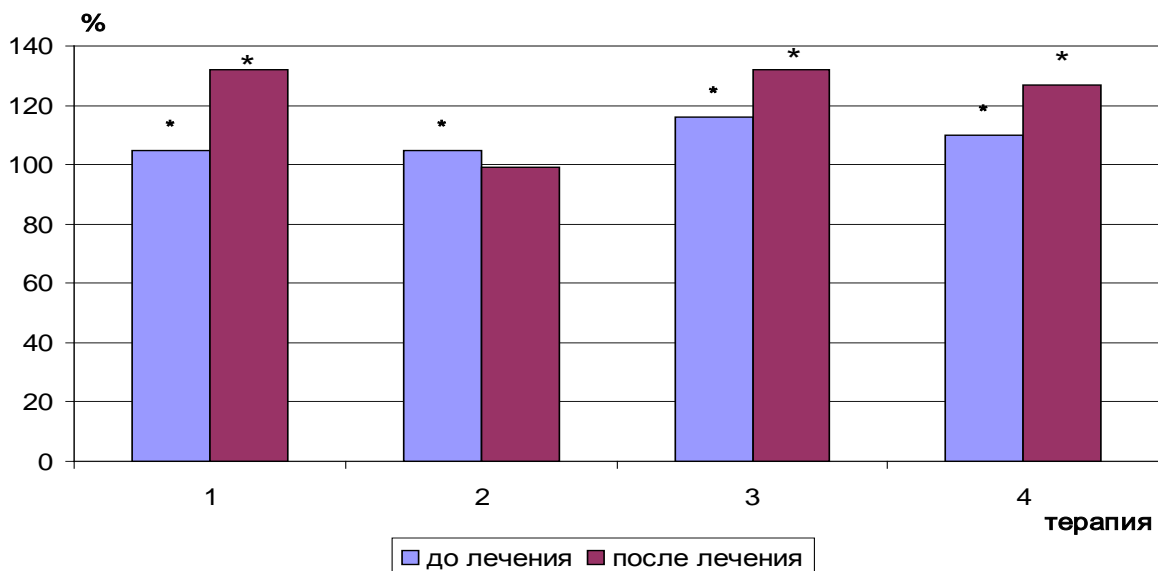


Рис. 7 ЭФПЭ (%) крови больных дисциркуляторной энцефалопатией 2 стадии заболевания при терапии.

1. Базовое лечение (пирацетам и кавинтон)
2. Комплексное лечение (базовое + дельтаран)
3. Комплексное лечение (базовое + цитофлавин)
4. Комплексное лечение (базовое + геримакс)

Примечание \* -  $p \leq 0,05$  по отношению к группе здоровые (доноры) (100%).

На третьей стадии заболевания при дополнительном использовании к базовой терапии дельтарана и цитофлавина наблюдалось восстановление до уровня физиологической нормы исходно пониженной ЭФПЭ. Применение базовой терапии, в большей степени, – с геримаксом, приводило к увеличению исследуемого показателя ( $p \leq 0,05$ ), относительно группы здоровые (доноры) (Рис 8).

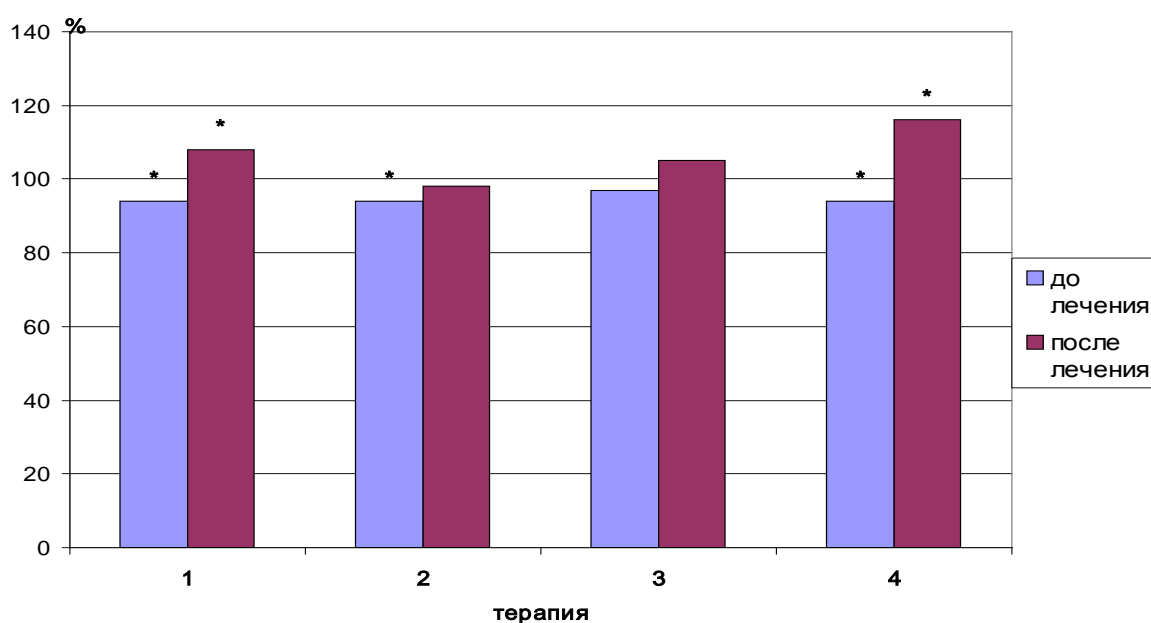


Рис. 8 ЭФПЭ (%) крови больных дисциркуляторной энцефалопатией 3 стадии заболевания при терапии.

1. Базовое лечение (пирацетам и кавинтон).
2. Комплексное лечение (базовое + дельтаран)
3. Комплексное лечение (базовое + цитофлавин)
4. Комплексное лечение (базовое + геримакс)

Примечание \* -  $p \leq 0,05$  по отношению к группе здоровые (доноры) (100%).

Анализируя критерии адапционных реакций по лейкоцитарному коэффициенту (ЛК), можно говорить, что рост ЛК при развитии патологии свидетельствует о снижении уровня реактивности, тогда как терапевтические мероприятия вызывают активацию адапционных процессов организма. При этом в ряде случаев отмечался рост ЛК в ходе используемой терапии, характеризующий наличие признаков напряженности адапционных процессов (Табл.3) Так, отмеченный рост лейкоцитарного коэффициента при

действии дельтарана на I-й стадии заболевания, а также базовой терапии и дополнительного использования цитофлавина на III-й стадии заболевания. Анализ ЭФПЭ больных ДЭ свидетельствует, что уровень вовлечения адаптационных резервов организма существенно различается на разных стадиях заболевания. Так, повышенный уровень ЭФПЭ свидетельствует об активации гипофизарно-надпочечниковой системы на I-й стадии заболевания с постепенным ее истощением в ходе усугубления патологического процесса (Крылов, Дерюгина, 2005).

Таблица 3

Лейкоцитарный коэффициент (лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы) (%) крови больных дисциркуляторной энцефалопатией

Терапевтическое воздействие	Время исследования	Стадии заболевания		
		I	II	III
Базовое лечение	До лечения	0,53 ± 0,07	0,66 ± 0,06	0,80 ± 0,08
	После	0,67 ± 0,08	0,60 ± 0,06	0,96 ± 0,06*
Дельтаран	До лечения	0,59 ± 0,08	0,66 ± 0,07	0,78 ± 0,09
	После	0,80 ± 0,08*	0,62 ± 0,07	0,71 ± 0,06
Цитофлавин	До лечения	0,58 ± 0,08	0,65 ± 0,05	0,76 ± 0,06
	После	0,76 ± 0,08	0,72 ± 0,06	0,90 ± 0,07*
Геримакс	До лечения	0,54 ± 0,08	0,66 ± 0,07	0,78 ± 0,09
	После	0,62 ± 0,08	0,68 ± 0,05	0,66 ± 0,06

*Примечание:* \*- статистически значимые различия ( $p \leq 0,05$ ) к значениям до лечения.

По всей видимости, степень включения адаптационных процессов при развитии хронической цереброваскулярной недостаточности определяет различное влияние препаратов на разных стадиях заболевания, отражаемое в изменении ЭФПЭ. На I-й стадии заболевания действие использованных в работе препаратов направлено на восстановление исходного статуса организма, за исключением включения в комплексную терапию геримакса, на II-й и III-й стадиях препараты определяют дополнительную активацию. В то же время, на основе анализа ЭФПЭ и ЛК продемонстрирована возможность целенаправленного воздействия на течение адаптационно-приспособительных процессов при применении стрессмодулирующей терапии. Так, включение в комплексную терапию регуляторного пептида дельтарана, оказывает корригирующее воздействие на течение

адаптационного процесса на всех стадиях ДЭ и наиболее эффективно в стадии истощения адаптационного процесса (наблюдается восстановление ЭФПЭ при стабильном ЛК). Применение стрессотренирующей терапии (геримакса) оказывает активирующее влияние на адаптационные механизмы, отражая активацию адренало-гипофизарно-надпочечниковой оси для реализации механизмов адаптации. Включение цитофлавина в терапевтический комплекс, препарата обладающего цитопротективным действием, способствует развитию адаптационных процессов, однако на II-й стадии заболевания рост ЭФПЭ свидетельствует об избыточной активации адаптационных механизмов. По всей видимости, цитофлавин, являющийся сукцинат-содержащим антиоксидантом, активирует реакции срочной адаптации и эффективен только при относительной сохранности адаптационного резерва, что и наблюдается в восстановлении ЭФПЭ и ЛК на I-й стадии заболевания.

На основании полученных результатов следует заключить, что как у крыс с моделируемой ишемией головного мозга, так и при ишемических нарушениях функции головного мозга у больных ДЭ, регистрируются типовые изменения ЭФПЭ периферической крови. Эти изменения зависят как от тяжести альтерации или заболевания, так и от проводимой терапии разными препаратами. Как видно из результатов, повышение на начальных этапах - на первой и второй стадиях заболевания ДЭ ЭФПЭ крови больных оказалось сходным с реакцией повышения ЭФПЭ крыс при моделировании локальной и тотальной ишемии головного мозга. И только у больных ДЭ 3-й стадии ЭФПЭ была сниженной, что соответствует литературным данным о типовой реакции ЭФПЭ при различных заболеваниях. Из этого можно предположить, что стадийность заболевания ДЭ отражает стадийность стрессовой реакции организма больных, что подтверждается и результатами анализа ЛФ больных ДЭ. Результаты экспериментальных данных свидетельствуют, что оценка исходного уровня адаптационных резервов организма по показателям ЭФПЭ позволяет скорректировать использование препаратов в целях повышения неспецифической резистентности организма и обосновать целесообразность включения стрессмодулирующей терапии в комплекс лечения хронической ишемии головного мозга.

## **ВЫВОДЫ**

1. Моделирование гипобарической гипоксии и адреналиновой токсемии у крыс вызывали типовое однофазное изменение ЭФПЭ крови: снижение с последующим восстановлением данного показателя.
2. Предварительное введение маточного молочка, убихинона-10 и янтарной кислоты, а также их смеси препятствовало снижению ЭФПЭ крови крыс при гипобарической гипоксии и адреналиновой токсемии.

3. Тотальная и локальная ишемия головного мозга крыс вызывали однотипное двухфазное изменение ЭФПЭ: первоначальное снижение (1фаза), с последующим повышением (2 фаза).
4. Установлено, что в условиях как тотальной, так и локальной ишемии головного мозга у крыс, на 60- е сутки эксперимента (2-я фаза изменения ЭФПЭ) действие исследуемых веществ-адаптогенов: пирацетам+кавинтон, пирацетам+ кавинтон+цитофлавин приводило к дальнейшему повышению ЭФПЭ относительно уровня у интактных животных, а применение пирацетама+кавинтона+дельтарана приводило к восстановлению ЭФПЭ.
5. Установлено, что ЭФПЭ крови больных ДЭ первой, второй, третьей стадии заболевания зависит от тяжести заболевания. У больных ДЭ 1-й и 2-й стадии ЭФПЭ была повышенной, а при 3-й – пониженной по сравнению с нормой.
6. Направленность изменения ЭФПЭ крови больных ДЭ в ходе терапии сочеталась с развитием общих адаптационных процессов в организме. На 1-й стадии восстановление ЭФПЭ наблюдалось при действии базовой терапии и дополнительно дельтарана и цитофлавина; на 2-й при действии дополнительно дельтарана; на 3-й при действии дополнительно дельтарана и цитофлавина.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК**

1. Крылов В.Н. Влияние пчелиного яда на адаптивные реакции эритроцитов при иммобилизационном стрессе / В.Н.Крылов, А.В. Дерюгина, **О.А. Захарова**// Вестник ННГУ. Серия Биология. №2(2) 2010. С. 627- 630.
2. Крылов В.Н. Исследование системы крови при ишемических нарушениях функций головного мозга / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, **О. А. Захарова** Е.А. Антипенко // Клиническая лабораторная диагностика № 12, Москва. 2010. С. 28- 30.

### **Статьи в региональных изданиях и материалы конференций**

3. **Белякова О.А.** Оценка гомеостаза крови больных дисциркуляторной энцефалопатией методом измерения электрофоретической подвижности/ О.А. Белякова// Материалы 61-й научной студенческой конференции биологического факультета. Н.Новгород: ННГУ, 2008. С. 5 – 6.

4. **Белякова О.А.** Электрофоретическая подвижность эритроцитов как отражение гомеостаза при альтерации функций головного мозга/ О.А. Белякова, Ю.А. Старателева // Тезисы докладов 13- й Нижегородской сессии молодых ученых. Н.Новгород, 2008. С.8 – 9.
5. **Белякова О.А.** Скрининг препаратов применяемых при лечении дисциркуляторной энцефалопатии /О. А. Белякова // Ломоносов -2009: тезисы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. М., 2009. С. 247.
6. Антипенко Е.А. Адаптивные реакции крови в ходе лечения хронической ишемии мозга (клинико – экспериментальное исследование)/ Е. А. Антипенко, А.В. Дерюгина, В.Н. Крылов, А.В. Густов, **О.А. Белякова** // Материалы XIV международного симпозиума «Эколого- физиологические проблемы адаптации»; Москва, РУДН: Тезисы докладов. М. 2009. С. 48 – 50.
7. **Белякова О.А.** Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов при терапии больных дисциркуляторной энцефалопатией / О. А. Белякова // Материалы 62-й научной студенческой конференции биологического факультета; Н.Новгород: ННГУ, 2009. С.7-8.
8. **Захарова О. А.** Изменение показателей крови при нарушениях мозгового кровообращения и методы лечения / О. А. Захарова // Ломоносов -2010: тезисы докладов XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. М., 2010. С. 170-171.
9. Дерюгина А. В. Влияние однократного и многократного стрессового воздействия на электрокинетические про- и антиоксидантные свойства эритроцитов / А. В. Дерюгина, **О. А. Захарова** // Материалы Всероссийской научно- практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной науки и образования» Башкирия, г. Сибай, 2010. Том II. С 201-204.
10. Дерюгина А.В. Сравнительно- видовое изучение электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовом воздействии / А.В. Дерюгина, **О.А. Захарова** // Тезисы докладов XIV-й Пушкинской Международной школы- конференции молодых ученых. Пушкино, 2010. С. 123- 124.
11. Дерюгина А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов при действии различных экзотоксинов на организм / А.В. Дерюгина, **О.А. Захарова** // Тезисы докладов XXI съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Москва- Калуга, 2010. С.226-227.
12. Крылов В.Н. Метод клиновидной дегидратации при оценки возрастных, гормональных и альтерационных изменений организма / В.Н. Крылов, А.В.

Дерюгина, Л.М Обухова, **О. А. Захарова** // Материалы Международной конференции Пчеловодство XXI веке. Москва, 2010. С.56 – 58.

13. **Захарова О.А** Влияние маточного молочка и убихинона на функциональные характеристики эритроцитов крыс при развитии иммобилизационно-болевого стресса / О. А. Захарова // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». – Нижний Новгород, 2010.- С. 131.

14. Крылов В.Н. Влияние пчелиного яда на адаптивные реакции эритроцитов крыс при экспериментальном стрессе/ В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, **О.А Захарова.** // Материалы Международного форума пчеловодов, Саранск, 2010, С.9-12.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГГНС	гипофизарно-гипоталамо-надпочечниковая система
ДЭ	дисциркуляторная энцефалопатия
КА	катехоламины
ЛК	лейкоцитарный коэффициент
ЛФ	лейкоцитарная формула
МДА	малоновый диальдегид
ПОЛ	перекисное окисление липидов
САС	симпатоадреналовая система
ЭФПЭ	электрофоретическая подвижность эритроцитов
ХЦВН	хроническая цереброваскулярная недостаточность

