

Все животные контрольных и экспериментальных групп после выхода из наркоза идентично восстановили пищевое поведение, физическую активность и поведенческие стереотипы.

ВЫВОДЫ

1. Из сапропеля выделен и очищен от примесей антикоагулянт, специфично угнетающий заключительный этап свёртывания крови. По химической природе выделенный и очищенный эффектор является пептидом.

2. Как в модельных пробирочных тестах, так и при введении животным выделенный пептид тормозит тромбиновое время плазмы крови, а его эффект сохраняется не менее 60 мин.

3. Введение антикоагулянта не приводит к гибели животных или явным нарушениям их физического состояния, что свидетельствует об отсутствии острого токсического действия.

4. Выделенный пептидный антикоагулянт из сапропеля можно рассматривать как основу для разработки фармакологического средства коррекции гемостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бышевский А.Ш., Чирятёв Е.А., Умутбаева М.К. О возможной роли ингибитора самосборки фибрина в регуляции свёртывания крови // Гематол. и трансфузиол. — 1985. — Т. 30, №1. — С. 35-38. [Byshvskiy A.Sh., Chiryat'ev E.A., Umutbaeva M.K. The possible role of fibrin self-assemble inhibitor in blood clotting regulation. *Gematologiya i Transfuziologiya*. 1985; 30 (1): 35-38. (In Russ.)]

2. Дарбре А. Практическая химия белка / Под ред.

УДК 612.753: 612.084: 616-008.853.8: 615.917: 616.15

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ КОСТНОГО И ОСТЕОКЛАСТИЧЕСКОГО ДИФФЕРОНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ПОДОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ДИХЛОРЭТАНОМ

Феликс Хусаинович Камиров¹, Екатерина Рафаэловна Фаршатова¹,
Дамир Ахметович Еникеев¹, Галина Васильевна Иванова^{2*}

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

²ООО «Проммедэко», г. Уфа, Россия

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-828

Цель. Исследовать в плазме крови содержание растворимого лиганда рецептора активатора ядерного фактора κВ (RANKL), остеопротегерина и склеростина в модели подострой интоксикации дихлорэтаном у крыс.

Методы. Эксперименты проведены на 20 половозрелых самцах крыс с массой тела 180–200 г. Крысам опытной группы ежедневно внутривенно в течение 2 мес вводили дихлорэтан в оливковом масле из расчёта 0,84 мг/кг массы тела, что в суммарной дозе составило 0,1 ЛД₅₀. Животным контрольной группы вводили соответствующий объём оливкового масла. С использованием коммерческих наборов реагентов методом иммуноферментного анализа в плазме крови определяли содержание растворимого RANKL (реагенты «Free RANKL»), остеопротегерина («Osteoprotegerin») и склеростина («Sclerostin») фирмы «Biomedica Medizinprodukte Gmb and CoKG».

А. Дарбре. — М.: Мир, 1989. — 621 с. [Practical protein chemistry — a handbook. Ed. by A. Darbre. John Wiley and Sons, Chichester. 1986; 620 p. Russ Ed.: A. Darbre. *Prakticheskaya khimiya belka*. Moscow: Mir. 1989; 621 p.]

3. Деметьева И.А. Защитное действие недиализующейся фракции экстракта медуницы при угрозе тромбоза / В кн.: Обмен веществ в норме и патологии. / Под ред. А.Ш. Бышевского. — Тюмень: ТюмГМИ, 1992. — С. 30. [Dement'eva I.A. Protective activity of nondialyzable fraction of lungwort extraction at the risk of thrombosis, in *Obmen veshchestv v norme i patologii*. (Metabolism in health and disease.) Ed. by A.Sh. Byshvskiy. Tyumen: Tyumen State Medical Institute. 1992; 30 p. (In Russ.)]

4. Калинин Е.П., Русакова О.А., Чирятёв Е.А. Способ получения антикоагулянта из сапропеля. Патент на изобретение №RUS2175552 от 16.03.2000. [Kalinin E.P., Rusakova O.A., Chiryat'ev E.A. A method for obtaining anticoagulant from peloid. Patent for invention №RUS2175552, issued at 16.03.2000. (In Russ.)]

5. Государственный реестр лекарственных средств. — <http://www.grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 30.08.2015). [State Drug Registry. <http://www.grls.rosminzdrav.ru> (Access date: August 30, 2015).]

6. Суханова Г.А., Меликян А.Л., Вахрушева М.В. и др. Варфариновый некроз кожи у пациента с дефицитом протеина С // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2014. — №1. — С. 75-82. [Sukhanova G.A., Melikyan A.L., Vachrusheva M.V. Warfarin-induced skin necrosis in patient with deficiency of protein C. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2014; 1: 75-82. (In Russ.)]

7. Чирятёв Е.А., Бышевский А.Ш., Яковлева Н.В., Платонов Е.В. Способ получения средства, обладающего антикоагулянтной активностью Патент на изобретение №RUS2101023 от 10.01.1998. [Chiryat'ev E.A., Byshvskiy A.Sh., Yakovleva N.V., Platonov E.V. A method for obtaining a substance with anticoagulant activity. Patent for invention №RUS2101023, issued at 10.01.1998. (In Russ.)]

8. Dimova N. RP/PLC analysis of amino acids with UV-detection // *Compter rendus l'Academie bulgare des Sciences*. — 2003. — Vol. 56, N 12. — P. 75-78.

9. Ellis G., Camm A.J., Datta S.N. Novel anticoagulants and antiplatelet agents; a guide for the urologist // *BJU International*. — 2015, Mar 23. — DOI: 10.1111/bju.13131. [Epub ahead of print]

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета программы Statistica 6,0 (Stat Soft).

Результаты. При действии дихлорэтана у животных в плазме крови повышался уровень растворимого RANKL, снижалось содержание остеопротегерина, отражая интенсификацию остеокластогенеза и функциональное состояние остеокластов. Содержание склеростина – негативного регулятора остеобластогенеза – увеличивалось, свидетельствуя об ингибировании дифференцировки преостеобластов и функции остеобластов

Вывод. При подострой интоксикации дихлорэтаном в плазме крови содержание лиганда рецептора активатора ядерного фактора κ B (RANKL) увеличивается, остеопротегерина – уменьшается, склеростина – повышается.

Ключевые слова: костная ткань, RANKL, остеопротегерин, склеростин, интоксикация дихлорэтаном.

BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE AND OSTEOCLASTIC DIFFERONS IN PLASMA AT SUBACUTE DICHLOROETHANE INTOXICATION

F.Kh. Kamilov¹, E.R. Farshatova¹, D.A. Enikeev¹, G.V. Ivanova²

¹Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;

²ООО «Prommedeko» Ufa, Russia

Aim. To explore the plasma level of soluble receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), osteoprotegerin and sclerostin in a model of subacute dichloroethane intoxication in rats.

Methods. Experiments were carried out on 20 adult male rats weighing 180–200 g. The rats of the experimental group were administered dichloroethane at the dose of 0.84 mg/kg, mixed with olive oil by a gastric tube daily for two months, which amounted to 0,1 LD₅₀. Control animals received an adequate amount of olive oil. Levels of soluble RANKL, osteoprotegerin and sclerostin were determined in blood serum by ELISA using commercially available reagent kits (reagents «Free RANKL», «Osteoprotegerin» and «Sclerostin» by «Biomedica Medizinprodukte Gmb and CoKG» company. Statistical data processing was performed using the Statistica 6.0 (Stat Soft) software package.

Results. Exposure to dichloroethane resulted in increased levels of soluble RANKL, reduced levels of osteoprotegerin, reflecting the intense new bone formation and the functional state of osteoclasts. The level of sclerostin, which is the negative regulator for new bone formation, was elevated, indicating osteoblast precursors' differentiation inhibition and decreased function of osteoblasts.

Conclusion. In subacute dichloroethane intoxication, the serum level of soluble receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) increases, osteoprotegerin level reduces, sclerostin level increases.

Keywords: bone, RANKL, osteoprotegerin, sclerostin, dichloroethane intoxication.

В формировании и поддержании структуры костной ткани принимают участие клетки двух дифферонов – костного и остеокластического [6], участвующих в процессах ремоделирования. Остеокластогенез с активацией фазы резорбции в процессах ремоделирования, так же как и фаза остеогенеза, регулируется многоуровневой системой, включающей кальций-регулирующие (паратиреоидный гормон, кальцитонин, кальцитриол) и другие гормоны (инсулин, соматотропин, половые), системные ростовые факторы (макрофагально-колониестимулирующий, инсулиноподобные, фактор роста фибробластов и др.), локальные (короткодистантные) факторы: трансформирующие факторы роста, простагландины, костные морфогенетические белки и др. Взаимосвязь и дублирование их регулирующих эффектов значительно повышает их надёжность.

В механизмах контроля метаболических функций и ремоделирования костной ткани особую роль играет цитокиновая система рецептора активатора ядерного фактора κ B (RANK) – его лиганд (RANKL), остеопротегерин (OPG) [5, 10]. RANKL синтезируется остеобластами. Взаимодействуя с RANK на предшественниках остеокластов, он активизирует созревание остеокластов, осуществляющих интенсивную резорбцию костной ткани. Одновременно регистрируется торможение апоптоза остеокластов с удлинением периода их функциональной активности [5, 9].

OPG – растворимый рецептор RANKL, также экспрессируется остеобластами и связывает RANKL, являясь специфической «ловушкой» данного лиганда. Взаимодействие RANKL с OPG задерживает пролиферацию остеокластов, их дифференцировку, что в конечном итоге снижает резорбцию кости [10]. Таким образом, общее «конвергентное» соотношение RANKL/OPG контролирует выраженность остеокластной дифференцировки, активность и апоптоз остеокластов.

Для дифференцировки преостеобластов в зрелые остеобласты необходимо участие транскрипционного фактора Osterix/Sp7 и RUNX-2 [7]. Снижают остеогенную дифференциацию транскрипционные факторы Twist [8]. Важнейшими регуляторами остеогенной дифференциации служат секреторные белки семейства морфогенов Wnt: трансформирующие ростовые факторы- β 1, β 2 и β 3, активины, ингибины, факторы роста фибробластов-2, и -9, инсулиноподобный фактор роста-1, костные морфогенетические белки [2].

Сигнальную систему Wnt/ β -catenin ингибирует склеростин, который в постнатальном периоде вырабатывается только остеоцитами и гипертрофированными минерализованными хондроцитами [1]. Склеростин взаимодействует с рецептором липопротеинов низкой плотности 5, который вместе с корцептором липопротеинов низкой плотности 6 служит основным мем-

Содержание регуляторных цитокинов в плазме крови (пмоль/л) при 2-месячной подострой интоксикации дихлорэтаном, Ме [Q₁; Q₃]

Цитокины	Контрольная группа, n=10	Основная группа (дихлорэтан 0,1 ЛД ₅₀), n=10	Критерий Манна-Уитни
sRANKL	0,60 [0,12; 1,29]	0,74 [0,73; 0,76]	0,0405
OPG	0,41 [0,40; 0,43]	0,26 [0,11; 0,34]	0,0029
Склеростин	12,3 [12,2; 12,5]	18,5 [12,9; 18,7]	0,0206

Примечание: sRANKL – растворимый рецептор активатора ядерного фактора κВ; OPG – остеопротегерин: ЛД₅₀ – полудетальная доза.

браносвязанным кофактором Wnt/β-catenin сигнального пути, стимулирующим остеобластогенез и функции остеобластов [9], являющимся негативным регулятором остеобластогенеза [11].

Проведённые ранее эксперименты показали, что подострая интоксикация дихлорэтаном в суммарных дозах 0,05 полудетальной дозы (ЛД₅₀) и 0,1 ЛД₅₀ у экспериментальных животных вызывает изменения ремоделирования костной ткани с превалированием процессов резорбции, повышение катаболизма костного коллагена и угнетение его биосинтеза [3].

Цель настоящего исследования – оценить изменения содержания в плазме крови растворимого лиганда RANKL, OPG и склеростина при подострой интоксикации дихлорэтаном у крыс.

Эксперименты проведены на 20 половозрелых самцах крыс с массой тела 180–200 г. Крысам основной группы (n=10) ежедневно внутривенно в течение 2 мес вводили дихлорэтан в оливковом масле из расчёта 0,84 мг/кг массы, что в суммарной дозе составило 0,1 ЛД₅₀ [4]. Животным контрольной группы (n=10) вводили соответствующий объём оливкового масла.

С использованием коммерческих наборов реагентов методом иммуоферментного анализа в плазме крови определяли содержание растворимого RANKL (реагенты «Free RANKL»), OPG («Osteoprotegerin») и склеростина («Sclerostin») фирмы «Biomedica Medizinprodukte Gmb and CoKG». Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета программы Statistica 6,0 (Stat Soft).

У экспериментальных животных при подострой интоксикации дихлорэтаном в малой дозе в плазме крови наблюдалось снижение содержания OPG и повышение sRANKL (табл. 1).

При этом «Конвергентное» соотношение RANKL/OPG существенно повышалось с 1,46±0,22 (X±Sx) у контрольной группы жи-

вотных и до 2,84±32 (p <0,02) в основной группе, что отражает активацию процессов дифференцировки и созревания остеокластов. Угнетение экспрессии OPG наблюдают при состояниях, протекающих с превалированием резорбции кости над формированием новой ткани, – гипострогемии, гиперпаратиреозидизме, длительной стероидной терапии, усилении секреции провоспалительных интерлейкинов, простагландин E₂ и др. [1, 5, 9].

Содержание склеростина у животных опытной группы увеличивалось, отражая подавление процессов остеобластогенеза при действии дихлорэтана. Роль этого цитокина как одного из важных регуляторов ремоделирования показана в экспериментальных и клинических исследованиях при использовании моноклональных антител к склеростину [1].

Уровень циркулирующего в крови склеростина повышается при глюкокортикоидной терапии, анкилозирующем спондилоартрите [9, 11].

ВЫВОД

При подострой интоксикации дихлорэтаном в плазме крови содержание лиганда рецептора активатора ядерного фактора κВ увеличивается, а остеопротегерина – уменьшается, отражая активацию процессов остеокластогенеза. В эксперименте уровень склеростина повышается, свидетельствуя о подавлении дифференцировки клеток костного дифферона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дыдыкина С.И., Веткова Е.С. Склеростин и его роль в регуляции метаболизма кости // Науч.-практ. ревматол. – 2013. – Т. 51, №3. – С. 296–301. [Dydykina I.S., Vetkova E.S. Sclerostin and its role in the regulation of bone metabolism. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2013; 51 (3): 296–301. (In Russ.)]
2. Захаров Ю.М., Макарова Э.Б. Регуляция остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток костного мозга // Рос. физиол. ж. им. И.М. Сече-

нова. — 2013. — Т. 99, №4. — С. 417–432. [Zakharov Yu. M., Makarova E.B. Regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells of bone marrow. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2013; 99 (4): 417–432. (In Russ.)]

3. Камилев Ф.Х., Ганеев Т.И., Фаршатов Е.Р. и др. Ремоделирование костной ткани при действии хлорированных низкомолекулярных алифатических углеводородов // Мед. вестн. Башкортостана. — 2011. — Т. 6, №2. — С. 305–309. [Kamilov F.Kh., Ganeyev T.I., Farshatova Ye.R. et al. Remodelling of bone tissues by the action of chlorinated aliphatic hydrocarbons. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2011; 6 (2): 305–309. (In Russ.)]

4. Карпищенко А.И., Глушков С.И., Смирнов В.В. Глутатион-зависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном // Токсикол. вестн. — 1997. — №3. — С. 17–23. [Karpishchenko A.I., Glushkov S.I., Smirnov V.V. Glutathione-dependent antioxidant system in some tissues in rats at acute dichloroethane poisoning. *Toksikologicheskiy vestnik*. 1997; 3: 17–23. (In Russ.)]

5. Кушлинский Н.Е., Тимофеев Ю.А., Герштейн Е.С. Система RANK/RANKL/OPG при метастазах и первичных новообразованиях костей // Молекулярн. мед. — 2013. — №6. — С. 3–10. [Kushlinskiy N.E., Timofeev Yu.A., Gershtein E.S. RANK/RANKL/OPG system in bone

metastases and primary bone tumors. *Molekulyarnaya meditsina*. 2013; 6: 3–10. (In Russ.)]

6. Омеляненко Н.П., Слущкий Л.И. Соединительная ткань (патогистология и биохимия). В 2 т. / Под ред. С.П. Миронова. — М.: Известия, 2010. — Т. 2. — 600 с. [Omel'yanenko N.P., Slutskiy L.I. et al. *Soedinitel'naya tkan' (patogistologiya i biokhimiya)*. (Connective tissue — pathohistology and biochemistry.) Ed. by S.P. Mironov. Moscow: Izvestiya. 2010; 2: 600 p.]

7. Chen G., Deng C., Li Y.P. FGF-p and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation // *Jnt. J. Biol. Sci.* — 2012. — Vol. 8, N 2. — P. 272–288.

8. Isenmann S., Arthur A., Sannetino A.C. et al. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment // *Stem. Cells*. — 2009. — Vol. 26. — P. 2457–2468.

9. Kabayashi Y. Roles of Wnt signaling in bone metabolism // *Clin. calcium*. — 2012. — Vol. 22, N 11. — P. 1701–1706.

10. Sigalovski S., Shonert M. RANKL-RANK-OPG system and bone remodeling: a new approach on the treatment of osteoporosis // *Clin. Exper. Pathol.* — 2011. — Vol. 10, N 2. — P. 146–153.

11. Van Bezooijen R.L., ten Dijke P., Papapoulos S.E., Lowil C.W. SOST/Sclerostin, in osteocyte — derived negative regulator of bone formation // *Cytokine Growth factor Rev.* — 2005. — Vol. 16. — P. 319–327.

УДК 57.087.1: 612.087: 612.432: 612.441: 612.084: 616.441-008.64

ИССЛЕДОВАНИЕ СООТНОШЕНИЙ ГИПОФИЗАРНО-ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ОСНОВЕ РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА

Феликс Хусаинович Камилев¹, Валерий Николаевич Козлов^{2*},
Валерий Нурмухаметович Байматов³, Александр Николаевич Мамцев²,
Денис Юрьевич Смирнов²

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

²Филиал Московского государственного университета технологий и управления им. К.Г. Разумовского, г. Мелеуз, Россия;

³Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, г. Москва, Россия

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-831

Цель. Разработка математической модели, позволяющей рассчитывать уровни гормонов гипофизарно-тиреоидной системы методом наименьших квадратов у крыс при экспериментальном гипотиреозе.

Методы. Для исследования взаимосвязи уровней гормонов использовали регрессионный анализ. Поиск коэффициентов осуществляли методом наименьших квадратов. Исследования проводили на крысах, которые были разделены на шесть групп по 12 крыс в каждой: первая группа — контрольная, у животных второй, третьей, четвертой, пятой и шестой групп вызывали гипотиреоз ежедневным внутривенным введением тиамазола соответственно в дозах 2,5; 20,0; 10,0; 5,0 и 1,0 мг на 100 г массы тела крысы в течение 3 нед.

Результаты. Проведён регрессионный анализ, выбран вид регрессии и вычислены параметры, на основе полученных результатов проведён статистический анализ взаимосвязи гормонов. Путём сопоставления результатов расчёта лабораторного анализа установлена достаточно высокая надёжность разработанной модели. Отклонение среднего арифметического значения уровня тиреотропного гормона, полученное на основе экспериментальных и расчётных данных, составляет 2,7%. При уменьшении дозы тиреостатика повышалась и точность расчётов уровня тиреотропного гормона. При этом относительная погрешность при расчётах свободного тироксина в этих же группах крыс не превышала 2,15%, составляя 1,64; 1,34; 0,36 и 2,15% соответственно при ежедневном введении 20,0; 10,0; 5,0 и 1,0 мг антигипотиреозного препарата на 100 г массы тела. Можно утверждать о надёжности построенной модели для воспроизведения показателей уровня содержания гормонов гипофизарно-тиреоидной системы.

Вывод. При отсутствии современных высокочувствительных иммунохемилюминесцентных методов диагностики полученные результаты можно использовать для расчёта уровня тиреотропного гормона как одного из ведущих маркеров функционального состояния щитовидной железы.

Ключевые слова: крысы, экспериментальный гипотиреоз, гипофизарно-тиреоидные гормоны, регрессионный анализ.