

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«ПОЛИФАРМ»**

197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кронверкская, д.23, лит. А., телефон:
(812) 233-78-45; факс: (812) 336-16-98; e-mail: polifarm@inbox.ru

**«У Т В Е Р Ж Д А Ю»
Генеральный директор
ООО «ПОЛИФАРМ»**



Гаврилов В.Е

2014 г.

ОТЧЕТ

**«ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ГРАФЕНОПОДОБНЫХ
СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ОБЪЕМА ТОКСИЧЕСКИХ
ПРОЯВЛЕНИЙ УРЕМИЧЕСКИХ ИНТОКСИКАЦИЙ»**

Ответственный исполнитель
Заместитель генерального директора
ООО «ПОЛИФАРМ» по научной работе
с.н.с., к.м.н.
Воробейчиков Е.В. _____

Санкт-Петербург 2014

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	3
2. Объект исследования	6
3. Применение графеноподобной субстанции «ИТВАЙЗ» при моделировании острой почечной недостаточности	7
4. Применение графеноподобной субстанции «ИТВАЙЗ» при моделировании нарастающей хронической почечной недостаточности	13
5. Оценка изменений показателей неспецифического иммунитета на фоне перорального применения графеноподобной субстанции «ИТВАЙЗ»	21
6. Оценка изменений показателей неспецифического иммунитета у животных на фоне продолжительного употребления водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС	27
7. Выводы	37

ВВЕДЕНИЕ

При развитии почечной недостаточности (ПН) происходит прогрессирующее склерозирование почечной ткани и гибель нефронов, что сопровождается развитием уремической интоксикацией организма. Клиническая картина и динамика течения этого тяжелого заболевания зависит также от эффективности методов детоксикации, направленных на снижение объема проявлений уремической интоксикации и метаболических нарушений. Для этого на этапе додиализной терапии применяют: малобелковые диеты, кишечный диализ, энтеросорбенты, бактериальные ферменты, усиливающие расщепление азотистых веществ, принудительную осмотическую диарею, перфузию изолированной тонкой кишки и т.д.

Последние два метода плохо переносятся больными, т.к. достаточно агрессивны и имеют весьма ограниченное применение, а нежелание или невозможность соблюдения больными малобелковой диеты снижает возможность практического использования этого метода в формате додиализной терапии ранних стадий развития ПН.

Применение энтеросорбентов (ЭС) является наиболее воспроизводимым способом снижения уремической интоксикации и метаболических нарушений на ранних стадиях формирования ПН, его эффективность надежно диагностируется клиническими и биохимическими тестами. Кроме того, пероральный способ введения ЭС позволяет больному самостоятельно проводить прием препарата, что обеспечивает ему большую свободу в перемещениях, снимает известные деонтологические проблемы, существенно облегчает организацию лечебного процесса. Поэтому поиск и разработка новых ЭС является одной из фундаментальных задач эфферентной медицины.

Традиционное представление о возможности удаления уремических токсинов через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) хорошо известно специалистам. В настоящее время, значительный прогресс достигнут в изучение ренального гомеостаза, расширен спектр идентифицируемых уремических токсинов и метаболитов, показано влияние на гомеостаз токсинов

среднемолекулярной массы, продуктов перекисного окисления и т.д. При этом палитра токсических веществ постоянно увеличивается: от известных дериватов азотистого обмена и электролитов до средних молекул олигопептидов, фенола, гуанитидина и гормонов.

Токсические метаболиты выводили ЭС на основе оксикрахмала, модифицированной целлюлозы, активированного угля различных видов, включая известные марки СКН и т.д. [Лукичев Б.Г., 1988, Савченко Н.Е., 1982].

Окисленный крахмал избирательно адсорбирует мочевины и аммиак, но не поглощает креатинин и мочевую кислоту. При использовании оксикрахмала в качестве энтеросорбента примерно на 33,0% снижается уровень сывороточной мочевины.

При энтеросорбции активированными углями получены неоднозначные результаты. Так, например, в модельных растворах уголь сорбирует фенол, мочевую кислоту и гуанитидин. Однако в условиях *in vivo* достоверного снижения азотистых метаболитов в крови не найдено. Возможно, это связано с потерей адсорбционных свойств активированным углем из-за преимущественной сорбции жиров из кишечного раствора, что снижает сорбционную емкость, например, по креатинину до 95,0%. В работе [Zaltman M., et al., 1976] продемонстрировано увеличение длительности выживания нефрэктомизированных крыс на фоне введения ЭС. Однако убедительных объяснений механизма этого эффекта не приведено.

Существенным ограничением применения активированного угля в клинических и амбулаторных условиях является необходимость использования достаточно высоких доз препарата (несколько десятков г/сутки) для достижения биохимически тестируемого эффекта [Kolff W., et al., 1976], что практически невозможно.

Активированные угли марки СКН и СКН-2М снижают уровень креатининемии, как экзогенной этиологии, так и вызванной нефрэктомией у собак. В кишечник креатинин выделяется в основном в проксимальной части тонкой кишки. Отсюда же он и более эффективно выводится. Ускорение

элиминации креатинина способствует увеличению объема артериального кровотока в кишке. Применение угольного энтеросорбента в клинических условиях в 52,0% случаев снижает уровень креатининемии. Вместе с тем, если исходить из цифровых данных, приводимых авторами: 0,69 мкмоль до введения энтеросорбента и 0,59 мкмоль после введения сорбента, то становится очевидным, что эффективность угольной энтеросорбции по этому параметру явно не высока [Шкутин С.А., 1988, Шостка Г.Д., 1994, Бриккер В.А., 1983]. Кроме того, имеются серьезные противопоказания для угольной энтеросорбции, связанные с наличием язвенных процессов в (ЖКТ), гиперкалиемией, некорректируемого ацидоза.

Опыт применения энтеросорбентов по данным многих исследователей свидетельствует о несоответствии их сорбционной активности в модельных и в клинических условиях. Установлено, что тестируемый токсический метаболит высокоселективно поглощается сорбентом в условиях *in vitro*, а из организма выводится в значительно меньшем количестве от ожидаемого. Вместе с тем, на этом фоне клинически отмечаются положительные сдвиги в виде улучшения самочувствия, стабилизации биохимических показателей и т.д., что, возможно, обусловлено окислительным разложением токсических метаболитов на поверхности сорбентов [Бриккер В.А., 1983, Мамырбаев А.М., 1990, Земсков В.С. 1988].

Таким образом, поиск веществ пригодных для энтеросорбции в условиях развития уремических интоксикаций, имеющих развитую поверхность, представляется логичным и перспективным направлением эфферентной медицины. Для этих целей в качестве потенциального сорбционного вещества могут быть использованы графеноподобные субстанции, полученные на основе структурированного углерода. Основным преимуществом таких веществ является возможность уменьшения их дозы при сохранении высокой биологической активности. Однако эффективность их применения и формулировка механизма влияния данного класса веществ на изменение объема проявлений уремических интоксикаций требует проведения ряда доклинических исследований. Отсут-

ствии этой информации не позволяет определить перспективы использования таких субстанций в качестве энтеросорбентов, снижающих токсические проявления в условиях развития ПН.

Поэтому целью доклинических исследований является экспериментальная оценка возможности перорального применения графеноподобных субстанций на основе структурированного углерода для уменьшения выраженности уремических интоксикаций при острой и хронической почечной недостаточности.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве уремического протектора использовали графеноподобную субстанцию, содержащую структурированный углерод, полученный путем инициации процесса автотермической деструкции графита марки ГСМ-2 (графит специальный малозольный, ГОСТ 18191-78). В результате этой реакции происходит разрыв межплоскостных слоев графита, что приводит к увеличению его удельной поверхности. Далее порошкообразное вещество гранулируют с помощью раствора фруктозы, что обеспечивает возможность приготовления однородной смеси для дальнейшего капсулирования.

Таким образом, исследуемое вещество состоит из структурированной углеродной смеси, представляющее собой микронизированный порошок черного цвета, помещенный в желатиновые капсулы массой 90,0 мг.

В настоящее время, это вещество зарегистрировано в виде биологически активной добавки к пище (БАД), имеет коммерческое наименование «ИтВайз» [СГР № RU.77.99.11.003.E.002379.10.10 от 29.10.2010г.], производится в соответствии с документами: ТУ 9197-002-96144318-10, изготовитель ООО НПФ «БИОС», 198099, Санкт-петербург, ул. Калинина, д.13 (адрес производства: 188679, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, пос. им. Морозова, на площадях Опытного завода ФГУП РНЦ «Прикладная химия», корп.102, 102а, 209, 202/204, Российская Федерация).

ПРИМЕНЕНИЕ ГРАФЕНОПОДОБНОЙ СУБСТАНЦИИ «ИТВАЙЗ» ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Острая почечная недостаточность (ОПН) – жизнеугрожающее заболевание с высокой смертностью, патофизиология которого до конца не исследована, терапевтические возможности имеют ограничения, значительной части пациентов необходим диализ. Вместе с тем, причины развития ОПН разделяют на три основные группы: 1. Снижение почечного кровотока (преренальная причина, 40–79% случаев); 2. Непосредственное повреждение паренхимы почек (ренальная причина, 10–50% случаев); 3. Обструкция мочевыводящих путей (постренальная причина или обструктивная проблема, 10% случаев).

Приоритетными направлениями изучения ОПН являются ранняя диагностика, надлежащие профилактические меры, оптимизация водного баланса, идентификация и лечение основной причины развития этого состояния, а также своевременное проведение заместительной терапии [Hilton R., 2006]. Практически отсутствует информация, доказывающая эффективность каких-либо препаратов в замедлении прогрессии ОПН или ускорении восстановления функций почки [Kwok M.H., Sheridan D.J., 2006], что свидетельствует об актуальности работ, связанных с этапом доклинических исследований новых веществ, которые быть основой для создания, в том числе, энтеральных противоуремических протекторов.

Поэтому на первом этапе доклинического исследования была проведена оценка влияния графеноподобной субстанции «ИтВайз» на выживаемость (%) нефрэктомированных лабораторных животных в эксперименте, моделирующего развитие ОПН.

Материалы и методы исследования

В эксперименте использовали половозрелых самцов белых крыс весом тела 250-300 г. Состояние острой почечной недостаточности (ОПН) вызывали хирургическим удалением почек в один этап. Субстанцию «ИтВайз» вводили в желудок животным ежедневно в дозе 30,0 мг один раз в день с помощью зонда

в виде суспензии, приготовленной на основе физиологического в количестве 1,0 мл.

Оценка продолжительности жизни нефрэктомированных крыс осуществлена путём построения кривых дожития по данным протоколов, составленных в соответствии с «моментным» методом E.Kaplan-P.Meier [Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б., 2000; Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., 2005].

Биохимические исследования проводили в отдельных экспериментах, в которых состояние ОПН моделировали вышеуказанным способом. В этих экспериментах осуществляли взятие образцов крови в соответствии с принципом «наблюдение доживших до анализируемого интервала» (withdrawn alive from interval), что предписывало брать образцы на вторые и третьи сутки с момента удаления почек.

Для биохимических исследований собирали кровь животных после декапитации, из которой стандартным способом получали плазму. Физико-химические исследования выполнены на здоровых крысах, которым в течение двух суток вводили исследуемую субстанцию вышеуказанным способом и дозировкой.

Для физико-химических исследований брали кровь из правого желудочка сердца с доступом посредством торакотомии с помощью гепаринизированных игл и шприцов. Биохимические показатели плазмы и физико-химические свойства крови изучены с применением сертифицированных анализаторов клинической лаборатории. В соответствии с задачами исследования сформированы следующие группы:

1 группа – 5 интактных крыс, содержащихся на стандартном рационе (контроль).

2 группа — 10 крыс с экспериментальной моделью ОПН, при содержании которых использовано пероральное введение жидкой питательной смеси.

3 группа – 20 крыс с экспериментальной моделью ОПН, при содержании которых использовано пероральное введение графеноподобной субстанции

«ИтВайз» в сочетании с жидкой питательной смесью. Данные о выживаемости крыс этой группы были применены в актуариальных расчётах.

4 группа– 15 крыс с экспериментальной моделью ОПН, при содержании которых использовано пероральное введение графеноподобной субстанции «ИтВайз» в сочетании с жидкой питательной смесью. Крысы этой группы были предназначены для биохимических исследований.

5 группа – 10 крыс с экспериментальной моделью ОПН, при содержании которых использовано пероральное введение графеноподобной субстанции «ИтВайз» совместно с жидкой питательной смесью. Крысы этой группы были предназначены для физико-химических исследований.

Хирургические манипуляции, включая взятие образцов крови, а также евтаназия, выполнены у крыс, находившихся в состоянии эфирного наркоза с учётом норм «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Страсбург, 18.03.1986 г., Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»].

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены кривые линии дожития нефрэктомированных крыс, содержащихся на стандартном рационе и рационе с содержанием графеноподобной субстанции «ИтВайз». Установлено, что максимальная продолжительность жизни нефрэктомированных крыс в двух экспериментальных группах достигает 6-7 суток, что, по-видимому, является биологическим пределом выживаемости для данного вида животных на фоне острой почечной недостаточности.

Форма и соотношение параметров кривых линий дожития животных демонстрирует их «расщепление» в виде эффекта гистерезиса. Это означает, что под влиянием перорального введения исследуемой субстанции включаются иные, нежели в обычных условиях, физиологические механизмы, которые существенно увеличивают вероятность выживания животных на фоне развития

ОПН. Прежде всего, это проявляется в ранние сроки формирования ОПН. В частности, в интервале 35-40 часов фактическая выживаемость (actual survival) нефрэктомированных крыс, содержащихся на графеноподобном рационе, остаётся на уровне 100%. При этом количество выживших нефрэктомированных крыс, содержащихся на стандартном рационе, в этом же временном интервале не превышает 50 %. В свою очередь, 50% выживаемость нефрэктомированных крыс, получавших перорально графеноподобную субстанцию, смещена к 90 часам.

Таким образом, показатели динамики выживаемости и объёма выживших нефрэктомированных крыс, содержащихся на графеноподобном рационе, практически в 2 раза превышают соответствующие показатели нефрэктомированных крыс, содержащихся на стандартном рационе.

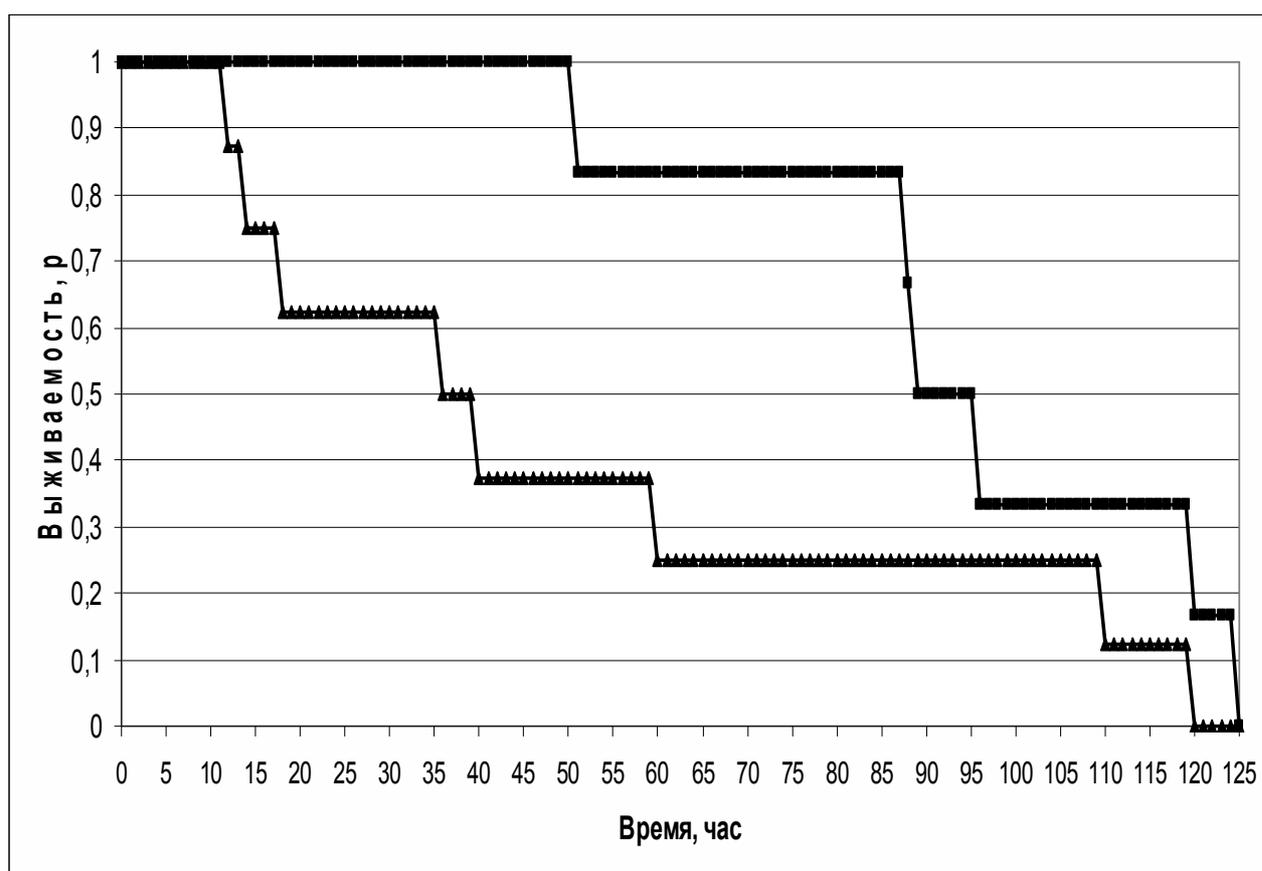


Рис.1. Кривые дожития нефрэктомированных крыс, содержащихся на стандартном рационе (нижняя линия) и рационе, содержащем графеноподобную субстанцию «ИтВайз» (верхняя линия).

В таблице 1 представлены результаты определения концентрации мочевины и креатинина у здоровых и нефрэктомированных крыс. По данным биохимических исследований пероральное введение графеноподобной субстанции «ИтВайз» как в условиях физиологической нормы, так и при ОПН значимого влияния на концентрацию креатинина в плазме крови не оказывает.

Однако под воздействием графеноподобной субстанции в условиях физиологической нормы уже в первые сутки существенно увеличивается концентрация мочевины в плазме крови. При этом эффект гиперкарбадемии, индуцированный этим веществом, сохраняется и при почечной недостаточности. Механизм этого феномена остаётся не известным.

Таблица 1.

Влияние графеноподобной субстанции на концентрацию мочевины и креатинина в плазме крови нефрэктомированных крыс ($M \pm m$).

Метаболит (Мкмоль)	Здоровые крысы 1-е сутки		ОПН 48 часов		ОПН 72 часа	
	Рацион стандарт	В рационе «ИтВайз»	Рацион стандарт	В рационе «ИтВайз»	Рацион стандарт	В рационе «ИтВайз»
Мочевина	5,4±0,2	8,9±2,3	53,7±0,3	59,0±3,7	51,7±0,1	65,6±1,9
Креатинин	30,7±6,7	32,0±6,1	903,0±16,0	894,0±14,5	1097,0±2,0	1131,0±41,1

Учитывая, что стабильность молекул мочевины в значительной мере определяется концентрацией катионов водорода, при уменьшении которых, в частности, молекулы мочевины становятся более стабильными, нами была выдвинута гипотеза, согласно которой увеличение концентрации мочевины обусловлено ощелачивающим действием исследуемой графеноподобной субстанции. Для проверки этой гипотезы были изучены параметры кислотно-щелочного баланса, которые приведены в таблице 2.

Как свидетельствуют результаты физико-химических исследований, графеноподобная субстанция «ИтВайз» достоверно сдвигает рН плазмы крови в щелочную сторону. Одновременно с этим увеличивается концентрация фракции актуальных гидрокарбонатов и уменьшается парциальное давление углекислого газа. Таким образом, под воздействием графеноподобной субстанции в плазме крови создаётся избыток гидрокарбонатов, которые, по-видимому, рас-

ходуются в меньшей степени в связи с относительным дефицитом катионов водорода, извлекаемых из кишечного раствора и, по механизму мембранного равновесия, из плазмы крови.

Таблица 2.

Влияние графеноподобной субстанции на физико-химические параметры крови здоровых крыс ($M \pm m$).

Исследуемые параметры	Группа контроля	Опытная группа (графеноподобная субстанция)
pH	7,23± 0,05	7,34±0,02
pCO ₂	55,65± 1,32	41,78±2,96
PO ₂	26,25 ±6,17	27,00±5,20
Na	139,50± 0,96	140,33±1,86
K	4,95± 0,47	4,37±0,52
Ca	1,09 ±0,06	1,04±0,15
Cl	106,75± 0,48	108,0±01,53
HCO ₃	23,63± 1,99	22,88±1,03
TCO ₂	25,33± 1,95	24,15±1,11
BE ₀	-6,13± 2,55	-2,83±0,94
Beact	-6,17 ±2,71	-3,03±1,04

Необходимо учесть, что большую часть времени кишечного транзита графеноподобная субстанция находится в щелочной среде. Длительное пребывание этого вещества в щелочной среде неизбежно приведёт к изменению структуры – расширятся межслоевые прослойки и, соответственно, увеличится сорбционная ёмкость по отношению к водороду. Щелочная среда тонкого кишечника в этом смысле может выступить фактором, который преобразует графеноподобную субстанцию в ловушку, активно поглощающую водород. Возможно, что именно абсорбция водорода, по нашему мнению, является ключевым механизмом стабилизации кислотно-щелочного баланса при почечной недостаточности. В конечном итоге, в результате ощелачивания плазмы крови увеличивается прочность химических связей в молекулах мочевины, что сдерживает их диссоциацию. Последствия этого имеют фундаментальное значение,

т.к. повышение прочности молекул мочевины способствует связыванию аммиака.

Заключение

Результаты исследований, выполненные в формате моделирования ОПН, свидетельствуют о достаточно высокой биологической активности субстанции «ИтВайз», содержащей структурированный углерод, который при прохождении через ЖКТ оказывает влияние на состав и физико-химические свойства крови. Это является фундаментальной предпосылкой для дальнейшей оценки возможности использования данной субстанции в виде основы для создания энтерального противоуремического протектора, предназначенного для коррекции преморбидных и актуализированных патологических состояний, при которых происходит нарушение баланса кислотно-щелочного равновесия (КЩР).

В условиях физиологической нормы исследованная графеноподобная субстанция, зарегистрированная в форме БАД к пище «ИтВайз», ощелачивает плазму крови, вызывая состояние близкое к компенсированному метаболическому алкалозу, что, в перспективе, целесообразно использовать для коррекции кислотно-щелочного баланса, например, при метаболических наклонностях к образованию кислых камней. Возможно, что в условиях почечной недостаточности за счёт ощелачивающего действия происходит сдерживание ацидотических проявлений, уменьшение объема полиорганной деструкции, что в конечном итоге, позволит улучшить качество жизни уремических больных.

ПРИМЕНЕНИЕ ГРАФЕНОПОДОБНОЙ СУБСТАНЦИИ «ИТВАЙЗ» ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НАРАСТАЮЩЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

В настоящее время, частота развития хронической почечной недостаточности (ХПН) в различных странах находится в пределах 100-600 человек на 1000000 взрослого населения. На этом фоне ежегодно регистрируют от 50 до 100 новых случаев данного заболевания. При развитии ХПН происходят следующие нарушения гомеостаза: гипергидратация, задержка натрия, объем-На

зависимая артериальная гипертензия, гиперкалиемия, гиперфосфатемия, гипермагниемия, метаболический ацидоз, азотемия, гиперурикемия. Для лечения ХПН применяются методы консервативной направленности, диализа и оперативных подходов, связанных, например, с трансплантацией почки.

Одной из задач консервативной или додиализной терапии является устранение или снижение объема уремической интоксикации и метаболических нарушений. Разработки отечественных ЭС и экспериментальные исследования подтвердили возможность их применения для консервативного лечения ХПН [Дельмачинский Б.В., и др., 1988; Лукичев Б.Г., 1988; Беляков Н.А., 1991]. В частности, были определены пути повышения эффективности ЭС на фоне развития уремической интоксикации:

1. Использование сорбционных материалов, имеющих уреазную активность, с последующей фиксацией аммиака;
2. Предотвращение снижения сорбционной емкости ЭС для уремических токсинов, например, липидами и другими веществами;
3. Сочетание медикаментозной терапии с применением ЭС;
4. Поиск новых ЭС, действие которых направлено на снижение объема выраженности уремических интоксикаций.

Предварительные исследования по снижению выраженности токсических проявлений на модели ОПН показали, что биологически активная добавка (БАД) к пище «ИтВайз», содержащая структурированный углерод, применяемая в качестве перорального противoureмического протектора приводит к ощелачиванию плазмы крови животных. Этот эффект предоставляет возможность рассматривать субстанцию «ИтВайз» в качестве основного соединения для создания потенциального ЭС, влияющего на показатели кислотно-щелочного равновесия. Однако полученный эффект в условиях нарастающей хронической почечной недостаточности (НХПН) не изучен.

Поэтому целью данного этапа работы является оценка влияния перорального введения субстанции «ИтВайз» на биохимические и физико-химические

показатели плазмы крови животных в условиях моделирования нарастающей хронической почечной недостаточности (НХПН).

Материалы и методы

В эксперименте использовали половозрелых самцов белых крыс весом тела 250-300 г. Моделирование состояния НХПН создавали хирургическим способом в несколько этапов.

На первом этапе исследования у животных проводили удаление каудального и краниального полюсов левой почки. На следующий день после нефрорезекции левой почки на фоне стандартного рациона животным одной опытной группы проводили ежедневное введение воды, животным другой опытной группы осуществляли ежедневное внутрижелудочное введение суспензии «ИтВайз». Общая продолжительность перорального введения воды и суспензии структурированного углерода составляла 37 дней.

На втором этапе эксперимента (через 7 дней после нефрорезекции левой почки) у крыс проводили нефрэктомия правой почки, что обеспечивало формирование следующих групп животных:

1 группа (контроль) – 16 крыс (интактные), содержание – стандартный рацион;

2 группа (контроль) — 16 крыс, содержание – стандартный рацион, пероральное введение воды в количестве 1,0 мл. Продолжительность ежедневного внутрижелудочного введения воды составляла 14 дней;

3 группа (контроль) – 16 крыс, содержание – стандартный рацион, пероральное введение суспензии «ИтВайз» в дозе 25,0 мг в количестве 1,0 мл. Продолжительность ежедневного внутрижелудочного введения суспензии – 14 дней;

4 группа (опыт) – 50 крыс с экспериментальной моделью состояния НХПН, содержание – стандартный рацион, пероральное введение воды в количестве 1,0 мл. Продолжительность ежедневного внутрижелудочного введения воды – 14 дней (20 животных) и 34 дня (20 животных), соответственно;

5 группа (опыт) – 50 крыс с экспериментальной моделью состояния НХПН, содержание – стандартный рацион, пероральное введение суспензии «ИтВайз» в дозе 25,0 мг в количестве 1,0 мл. Продолжительность ежедневного внутрижелудочного введения суспензии – 14 дней (20 животных) и 34 дня (20 животных), соответственно.

На третьем этапе эксперимента (на 35 день после нефрэктомии правой почки) у оставшихся 10 животных группы № 4 и у оставшихся 10 животных группы № 5 проводили удаление культи левой почки. Удаление культи почки повышает выраженность проявлений НХПН и позволяет получить информацию о выживаемости животных в условиях развития терминальной стадии данного состояния.

Для биохимических исследований взятие крови у животных проводили после декапитации. Плазму получали стандартным способом. Для физико-химических исследований взятие крови у животных осуществляли из правого желудочка сердца с доступом посредством торакотомии при помощи гепаринизированных игл и шприцов.

Биохимические показатели плазмы и физико-химические свойства крови были изучены с применением сертифицированных анализаторов, находящихся в составе клинической лаборатории. Динамическую оценку изменений биохимических и физико-химических показателей крови животных проводили на 14 и 34 день эксперимента.

Хирургические манипуляции, взятие образцов крови, а также эвтаназия выполнены у крыс, находившихся в состоянии эфирного наркоза с учётом норм «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Страсбург, 18.03.1986 г., Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»].

Обработку результатов исследования проводили с помощью методов описательной статистики и однофакторного дисперсионного анализа, представ-

ленных в электронной таблице EXCEL и в прикладном пакете программ SPSS 13.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

В таблице 3 представлены результаты исследования рН плазмы крови здоровых животных в контрольных группах: № 1 (стандартный рацион), № 2 (стандартный рацион + пероральное введение воды в течение 14 дней) и № 3 (стандартный рацион + пероральное введение суспензии «ИтВайз» в течение 14 дней).

Таблица 3.
Влияние перорального применения суспензии «ИтВайз» на рН плазмы крови здоровых крыс

Исследуемые показатели	Группа № 1 M ± m; σ	Группа № 2 M ± m; σ	Группа № 3 M ± m; σ
рН плазмы крови	7,277 ± 0,01; 0,02	7,275 ± 0,01; 0,03	7,301 ± 0,02; 0,03

Примечание: M – среднее значение; ± m – ошибка среднего значения; σ – стандартное отклонение.

В таблице 4 представлены результаты дисперсионного анализа достоверности различий показателя рН плазмы крови здоровых крыс в контрольных группах № 1, 2 и 3.

Таблица 4.
Достоверность различий значений рН плазмы крови здоровых крыс в группах контроля № 1, 2 и 3

Обозначения групп, №...	Среднее значение рН (M); Дисперсия (D)	Критерий Фишера (F); Уровень значимости (p)
№ 1 – № 2	7,277; 0,0003 – 7,275; 0,0006	0,089; 0,766 (p > 0,05)
№ 2 – № 3	7,275; 0,0006 – 7,301; 0,0009	6,286; 0,018 (p < 0,05)
№ 1 – № 3	7,277; 0,0003 – 7,301; 0,0009	6,619; 0,015 (p < 0,05)

Результаты, представленные в таблицах 3 и 4 демонстрируют, что в условиях физиологической нормы 14 дневное пероральное введение животным суспензии «ИтВайз» приводит к ощелачиванию плазмы крови. Результаты дисперсионного анализа подтверждают достоверность (p < 0,05) эффекта увеличения значений рН плазмы крови в группе животных № 3, по сравнению, с величиной данного показателя, наблюдаемого в группах животных № 1 и 2.

Возможно, что смещение рН плазмы крови в щелочную сторону обусловлено увеличением сорбционных свойств суспензии по отношению к водороду в процессе ее нахождения в щелочной среде кишечника. Выживаемость животных во всех контрольных группах на 14 день эксперимента составляла 100 %. Эти результаты показывают потенциальную возможность применения суспензии «ИтВайз», содержащей структурированный углерод, для коррекции КЩР крови. Однако, оптимальная продолжительность перорального введения данной суспензии в условиях физиологической нормы не изучена, что требует проведения дополнительных исследований.

В таблице 5 представлены результаты изменений рН плазмы крови в опытных группах животных № 4 и 5 при моделировании развития состояния НХПН на 14 и 34 день эксперимента.

Таблица 5.

Влияние перорального применения суспензии «ИтВайз» на рН плазмы крови крыс при моделировании состояния НХПН

Исследуемые показатели	День эксперимента	Группа № 4 М ± m; σ	Группа № 5 М ± m; σ
рН плазмы крови	14	7,256 ± 0,01; 0,027	7,273 ± 0,01; 0,021
	34	7,241 ± 0,01; 0,051	7,270 ± 0,02; 0,053

Примечание: М – среднее значение; ± m – ошибка среднего значения; σ – стандартное отклонение.

В таблице 6 представлены результаты дисперсионного анализа достоверности различий показателя рН плазмы крови крыс между группами № 4 и 5, находящихся в условиях НХПН на 14 и 34 день эксперимента.

Таблица 6.

Достоверность различий значений рН плазмы крови крыс в группах № 4 и 5 на 14 и 34 день моделирования состояния НХПН

Обозначения групп, №...	Среднее значение рН (M); Дисперсия (D)	Критерий Фишера (F); Уровень значимости (p)
№ 4 – № 5 (14 день)	7,256; 0,0007 – 7,273; 0,0004	5,454; 0,025 (p < 0,05)
№ 4 – № 5 (34 день)	7,241; 0,0026 – 7,270; 0,0028	3,203; 0,081 (p > 0,05)

Результаты, представленные в таблицах 5 и 6 показывают, что при увеличении продолжительности эксперимента и, соответственно, времени моделирования состояния НХПН происходит уменьшение значений рН плазмы крови животных. Это свидетельствует о развитии у крыс метаболического ацидоза и адекватности используемой экспериментальной модели.

На 14 день развития НХПН у животных группы № 5 регистрируются более высокие значения показателя рН плазмы крови ($7,273 \pm 0,01$), чем величина этого показателя у животных группы № 4 ($7,256 \pm 0,01$). Установленные минимальные различия средних значений (M) рН плазмы крови и дисперсии (D) данной величины статистически достоверны ($p < 0,05$). Это означает, что пероральное введение животным суспензии «ИтВайз» на ранних стадиях моделирования состояния НХПН оказывает влияние на выраженность развития ацидотических проявлений, по-видимому, за счет стабилизации кислотно-щелочного баланса. На этом этапе эксперимента выживаемость животных составляла 100 %.

На 34 день моделирования НХПН у животных группы № 4, которым перорально вводили воду в течение 34 дней, отмечается дальнейшее снижение величины рН плазмы, что свидетельствует о нарастании выраженности метаболического ацидоза и уремической интоксикации. В этот период наблюдения у животных группы № 5, находящихся на пероральном введении суспензии «ИтВайз», выраженных изменений средних значений рН плазмы, по сравнению с 14 днем эксперимента, не обнаружено. Следовательно, под влиянием исследуемой суспензии тренд ощелачивания плазмы крови животных на поздних сроках развития НХПН в определенной степени сохранится, но продолжительность выраженности этого тренда требует детализации. Так, на 34 день эксперимента статистически достоверных различий в средних значениях (M) рН плазмы крови и дисперсий (D) данного показателя у крыс в группах № 4 и 5 не выявлено ($p > 0,05$). Это свидетельствует о наличии ограничений для эффективного перорального применения суспензии «ИтВайз»

на поздних этапах развития НХПН. Выживаемость животных на 34 день эксперимента также составляла 100 %.

В таблице 7 представлены результаты по оценке выживаемости животных в группах № 4 и 5, у которых на 35 день эксперимента для повышения выраженности состояния НХПН была удалена культя левой почки.

Таблица 7.

Выживаемость животных на третьем этапе моделирования НХПН после удаления культи левой почки

Обозначения групп, №...	Число животных в группе	Медиана выживаемости, час	Максимальная выживаемость, час	Доля выживших, %
№ 4	10	120	144	0,00
№ 5	10	120	148	0,00

Результаты исследования, представленные в таблице 7, показывают, что средняя продолжительность жизни животных в опытных группах, а также их максимальное время жизни не имеют как фактических, так и достоверных статистических различий. Это означает, что пероральное введение суспензии «ИтВайз» животным, находящимся в условиях, практически, терминальной стадии НХПН, не оказывает влияния на их выживаемость и свидетельствует о нецелесообразности применения суспензии, содержащей структурированный углерод, на поздних этапах развития указанного патологического процесса.

Заключение

Результаты эксперимента, проведенные в формате второго этапа исследования, свидетельствуют как о биологической активности суспензии «ИтВайз», так и об адекватности выбранной модели НХПН.

При пероральном пути введения суспензии «ИтВайз» в ЖКТ животным, которым моделировали состояние НХПН наблюдали ощелачивание плазмы крови. На основе дисперсионного анализа показано, что этот эффект достоверно выявляется на ранних стадиях формирования НХПН или ХПН, что демонстрирует возможность потенциального использования данного вещества в качестве основы для разработки протектора уремиических интоксикаций, действие

которого может быть направлено на стабилизацию кислотно-щелочного баланса и сдерживания ацидотических проявлений.

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА НА ФОНЕ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГРАФЕНОПОДОБНОЙ СУБСТАНЦИИ «ИТВАЙЗ»

Прогрессирование ХПН является следствием: хронического диффузного гломерулонефрита, хронического пиелонефрита, амилоидоза почек, почечно-каменной болезни, нарушения проходимости мочевых путей, а также при осложнениях ряда соматических заболеваний (сердечнососудистых, сахарного диабета и т.д.). Так, например, патогенез хронического диффузного гломерулонефрита (ХДГ) связывают с аутоиммунными механизмами повреждения клубочек почек иммунными комплексами, аллергенами, циркулирующими в системном кровотоке. В патогенезе хронического пиелонефрита (ХП) основная роль отводится инфекционно-воспалительному процессу, при котором под действием бактериального агента происходит повреждение лоханок, чашечек и форниального аппарата почек с последующим формированием гранулематозного очага и рубцеванием почечной ткани.

Постепенное развитие ХПН сопровождается дисфункцией клеток иммунной системы в связи с изменением их количественного состава, функциональной активности, а также кооперации между полиморфно-ядерными лейкоцитами, макрофагами и другими презентующими антиген клетками [Осиков М. В., 2007; Vetjes M. G., 2013]. Факторами, подавляющими апоптоз полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) при ХПН, выступают вне- и внутриклеточный ацидоз, легкие цепи свободного иммуноглобулина, ингибиторы Са-АТФазы в цитоплазматической мембране эритроцитов, С5 фракция комплемента и др.

При ХПН большинство исследователей констатируют активацию эффекторов врожденного иммунитета. У пациентов с ХПН среди всех субпопуляций моноцитов преобладают CD14⁺CD16⁺, имеющие самый высокий потенциал генерации провоспалительных цитокинов, что имеет значение в развитии окис-

лительного стресса и системного воспалительного процесса – SIRS [Laudański K., Nowak Z., 2012]. У больных с ХПН повышена экспрессия Toll-рецепторов на фагоцитах: TLR-2 и TLR-4, а также увеличена продукция провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода (АФК) в ответ на активацию липополисахаридом [Gollapudi P., et al., 2010]. Это означает, что при ХДГ и ХП использование иммунокорректирующих препаратов на фоне средств консервативного лечения представляется логичным компонентом комплексной терапии.

Однако при выборе средств иммунокорректирующей терапии при ХПН необходимо учитывать их взаимодействие с рецепторами врожденного иммунитета (Toll-рецепторы), активация которых может привести к повышению реакций неспецифической защиты организма или их ингибированию, что весьма важно для адекватного терапевтического воздействия на патофизиологические механизмы системного воспалительного процесса. Следовательно, определение влияния суспензии «ИтВайз» на показатели неспецифического иммунитета, в том числе, в условиях физиологической нормы, является важной доклинической характеристикой специфической биологической активности этого вещества. Поэтому целью данного этапа исследования является оценка изменений показателей неспецифического иммунитета экспериментальных животных при пероральном введении суспензии «ИтВайз».

Материалы и методы

Оценка динамики изменений показателей неспецифической резистентности организма была проведена при пероральном введении экспериментальным животным суспензии «ИтВайз». Для этого использовали половозрелых самцов белых крыс весом тела 250-300 г. Все исследования проведены в условиях физиологической нормы. В процессе эксперимента животных содержали в стандартных условиях на полноценном рационе питания.

На первом этапе исследования животным контрольной группы (№ 1) однократно вводили стандартный физиологический раствор в количестве 1,0 мл. Контрольная группа состояла из 49 животных. Животные опытной группы

(№2) однократно получали суспензию «ИтВайз» в дозе 25,0 мг в количестве 1,0 мл. Опытная группа состояла из 49 животных.

До введения суспензии, а также после ее введения через 1, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки у животных опытной группы отбирали кровь для определения изменений показателей неспецифической резистентности. В контрольной группе животных в аналогичные сроки после введения физиологического раствора также определяли в крови показатели неспецифической резистентности. В качестве показателей неспецифической резистентности оценивали концентрации лизоцима (Л) и миелопероксидазы (МПО).

Концентрацию Л в сыворотке крови определяли по методу Бухарина О.В. с соавт. (1974). Кровь от животного собирали в центрифужную пробирку и получали сыворотку. Далее, 0,1 мл сыворотки крови переносили в бактериологическую пробирку, в которую добавляли 0,9 мл физиологического раствора. Полученную смесь перемешивали и к ней добавляли 1,5 мл суспензии тест объекта культуры *M.lysodeicticus*, которую предварительно стандартизовали на ФЭК-56М до экстинкции 0,66 (против зеленого светофильтра № 6). Тест объект выращивали на мясопептонном агаре в течение 24 ч в термостате при температуре +37,0° С.

Готовую суспензию, содержащую тест объект и исследуемую сыворотку, перемешивали и помещали в термостат на 30 мин при температуре +37,0° С. После завершения времени инкубации пробирки с материалом вынимали из термостата и определяли его экстинкцию на ФЭК-56М. Полученные в ходе определения величины экстинкций с помощью специальных таблиц переводили в значения, характеризующие концентрацию Л в сыворотке крови и выражали в мкг/мл.

Уровень МПО в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом, Page R.C. et al. (1978). Кровь от животного собирали в центрифужную пробирку и получали сыворотку. Затем, 0,1 мл сыворотки крови переносили в лунку с плоским дном панели для ИФА и в эту же лунку вносили 0,1 мл 5% раствора бензидина. В контрольную лунку вместо исследуемой сыворотки вно-

сили 0,1 мл физиологического раствора. Исследуемые пробы аккуратно перемешивали в планшетах и помещали в термостат на 60 мин при температуре 37,0⁰ С. По окончании времени инкубации планшеты доставали из термостата и просматривали на вертикальном спектрофотометре фирмы «Dunattech» при длине волны 492 нм. Концентрацию МПО в сыворотке крови получали в единицах экстинкции и выражали в условных единицах (у.е./мл).

На втором этапе исследования оценивали изменение указанных показателей неспецифического иммунитета при многократном введении животным суспензии БАД «ИтВайз» и физиологического раствора. Продолжительность перорального введения суспензии «ИтВайз» в опытной группе животных составляла 10 дней. Продолжительность перорального введения физиологического раствора в контрольной группе животных также составляла 10 дней. Опытная и контрольная группы животных состояла из 28 крыс, соответственно. До многократного введения суспензии «ИтВайз» и физиологического раствора, а также на фоне 1, 5 и 10 суток введения препаратов у животных опытной и контрольной групп проводили взятие крови для оценки изменений уровня Л и МПО.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью пакета анализа данных, включенного в электронные таблицы Excel и прикладного пакета программ SPSS 13.0 for Windows. При этом использовали методы описательной статистики и однофакторный дисперсионный анализ.

Результаты и обсуждение

План первого этапа исследования и его результаты представлены в таблице 8. Анализ результатов эксперимента в таблице 8 показывает, что после однократного перорального введения животным суспензии «ИтВайз» на 3-5 сутки происходит очень умеренная, но статистически значимая ($p < 0,05$) активация в крови уровня лизоцима и миелопероксидазы. Это означает, что однократное пероральное введение животным суспензии, содержащей структурированный углерод, не оказывает иммунодепрессивного эффекта на функциональную активность клеточного звена иммунитета.

Таблица 8.

Значения показателей неспецифического иммунитета животных после однократного перорального введения суспензии «ИтВайз» и стандартного физиологического раствора

Показатели неспецифической резистентности животных (белые крысы)	Сроки исследования проб крови до (фон) и после введения препаратов, сутки	Значения показателя в группе животных при введении суспензии БАД «ИтВайз»	Значения показателя в группе животных при введении физиологического раствора
Концентрация лизоцима в сыворотке крови, мкг/мл	0 (фон)	10,07 ± 0,67 δ = 1,79 (N=7)	9,77 ± 0,62 δ = 1,64 (N=7)
	1	12,03 ± 0,82 δ = 2,16 (N=7)	9,90 ± 0,34 δ = 1,04 (N=7)
	3	<u>12,47 ± 0,83</u> δ = 2,18 (N=7)	9,96 ± 0,49 δ = 1,27 (N=7)
	5	<u>12,81 ± 0,42</u> δ = 1,12 (N=7)	9,97 ± 0,44 δ = 1,17 (N=7)
	7	11,85 ± 0,54 δ = 1,42 (N=7)	10,50 ± 0,47 δ = 1,26 (N=7)
	14	9,73 ± 0,56 δ = 1,43 (N=7)	10,08 ± 0,58 δ = 1,54 (N=7)
	21	10,88 ± 0,40 δ = 1,07 (N=7)	9,93 ± 0,53 δ = 1,39 (N=7)
	Концентрация миелопероксидазы в сыворотке крови, у.е./мл	0 (фон)	0,90 ± 0,09 δ = 0,24 (N=7)
1		1,26 ± 0,14 δ = 0,39 (N=7)	0,83 ± 0,08 δ = 0,22 (N=7)
3		<u>1,77 ± 0,12</u> δ = 0,32 (N=7)	1,01 ± 0,11 δ = 0,30 (N=7)
5		<u>1,80 ± 0,11</u> δ = 0,29 (N=7)	0,86 ± 0,09 δ = 0,25 (N=7)
7		<u>1,53 ± 0,16</u> δ = 0,42 (N=7)	0,90 ± 0,11 δ = 0,29 (N=7)
14		1,13 ± 0,16 δ = 0,43 (N=7)	0,87 ± 0,09 δ = 0,25 (N=7)
21		0,93 ± 0,10 δ = 0,26 (N=7)	0,97 ± 0,08 δ = 0,23 (N=7)

Примечание: показатели неспецифической резистентности представлены в виде среднего значения и его ошибки, $M \pm m$; стандартного отклонения, δ . Число животных в группе, N ; подчеркнутые значения показателей имеют статистически значимые различия по отношению к фону (до введения препаратов), $P < 0,05$.

План второго этапа исследований и его результаты представлены в таблице 9. Результаты эксперимента в таблице 9 демонстрируют, что на фоне многократного перорального введения животным суспензии «ИтВайз» также отмечается весьма умеренная статистически достоверная ($p < 0,05$) активация лизоцима и миелопероксидазы, которая сохраняется в течение 5-10 суток применения препарата. Следовательно, курсовое 10 дневное пероральное введение экспериментальным животным исследуемого вещества также не оказывает иммунодепрессивного эффекта на показатели клеточного иммунитета.

Таблица 9.

Значения показателей неспецифического иммунитета животных после многократного перорального введения суспензии «ИтВайз» и стандартного физиологического раствора

Показатели неспецифической резистентности животных (белые крысы)	Длительность введения препаратов, сутки	Значения показателя в группе животных при введении суспензии БАД «ИтВайз»	Значения показателя в группе животных при введении физиологического раствора
Концентрация лизоцима в сыворотке крови, мкг/мл	0 (фон)	$9,96 \pm 0,51$ $\delta = 1,34$ (N=7)	$9,63 \pm 0,59$ $\delta = 1,55$ (N=7)
	1	$11,57 \pm 0,60$ $\delta = 1,61$ (N=7)	$10,47 \pm 0,51$ $\delta = 1,35$ (N=7)
	5	<u>$13,41 \pm 0,42$</u> $\delta = 1,12$ (N=7)	$9,80 \pm 0,45$ $\delta = 1,35$ (N=7)
	10	<u>$12,26 \pm 0,23$</u> $\delta = 0,36$ (N=7)	$9,86 \pm 0,44$ $\delta = 1,15$ (N=7)
Концентрация миелопероксидазы в сыворотке крови, у.е./мл	0 (фон)	$0,85 \pm 0,07$ $\delta = 0,19$ (N=7)	$0,97 \pm 0,12$ $\delta = 0,33$ (N=7)
	1	$1,14 \pm 0,15$ $\delta = 0,36$ (N=7)	$0,88 \pm 0,10$ $\delta = 0,27$ (N=7)
	5	<u>$1,84 \pm 0,13$</u> $\delta = 0,35$ (N=7)	$0,91 \pm 0,09$ $\delta = 0,24$ (N=7)
	10	<u>$1,70 \pm 0,10$</u> $\delta = 0,27$ (N=7)	$0,89 \pm 0,08$ $\delta = 0,20$ (N=7)

Примечание: показатели неспецифической резистентности представлены в виде среднего значения и его ошибки, $M \pm m$; стандартного отклонения, δ . Число животных в группе, N ; подчеркнутые значения показателей имеют статистически значимые различия по отношению к фону (до введения препаратов), $P < 0,05$.

Заключение

Результаты проведенных исследований биологической активности суспензии «ИтВайз» показывают отсутствие выраженной активации и ингибирования показателей неспецифического иммунитета на фоне курсового перорального введения этой субстанции. Это означает, что исследуемое вещество в условиях его применения в качестве потенциального энтеросорбента для снижения объема уремической интоксикации на ранних стадиях развития ХПН, не будет вызывать иммунодепрессивных реакций организма, что имеет значение для проведения адекватной терапии, учитывающей иммунные механизмы развития системного воспалительного процесса данного патологического состояния.

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА У ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО УПОТРЕБЛЕНИЯ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ, ОЧИЩЕННОЙ ФИЛЬТРОМ ZF-МЧС

Одним из возможных способов выведения из организма токсических метаболитов является применение графеноподобных субстанций в виде энтеросорбентов. Проведенные исследования, связанные с пероральным применением графеноподобной субстанции «ИтВайз» показали, что это вещество может быть использовано для разработки комплексного протектора уремических интоксикаций, действие которого направлено на стабилизацию кислотно-щелочного баланса и сдерживания ацидотических проявлений на ранних стадиях развития ХПН. Основным компонентом субстанции «ИтВайз» является структурированный углерод (>90,0 %) или углеродная смесь высокой реакционной способности, которая применяется в системах очистки воды ZF-МЧС (производства ООО «Золотая формула», Россия) в виде фильтрационного элемента.

Технология фильтрации воды с помощью углеродной смеси высокой реакционной способности предполагает улучшение ее физико-химических и биологических характеристик, что, в дальнейшем, может оказывать влияние на функциональную активность различных органов и систем организма животных

и человека. Это означает, что продолжительное употребление, например, водопроводной воды, дополнительно очищенной с помощью углеродной смеси высокой реакционной способности может оказывать влияние и на функциональную активность показателей неспецифического иммунитета, которые характеризуют иммунорегуляторные и гомеостатические функции организма.

Поэтому целью данного этапа исследований является оценка изменений факторов неспецифической резистентности организма животных на фоне естественного продолжительного употребления водопроводной воды, дополнительно очищенной с помощью фильтра ZF-МЧС.

Материалы и методы

Для реализации этого этапа исследования использовали половозрелых самцов белых крыс весом 250-300 г. При проведении эксперимента животные были распределены на следующие группы:

Первая группа животных (№ 1, контроль) находилась на стандартном рационе питания, включающем естественное употребление обычной водопроводной воды. Вторая группа животных (№ 2, опыт) находилась на стандартном рационе питания, включающем естественное употребление водопроводной воды, которая подвергалась предварительной очистке с помощью фильтра ZF-МЧС. Каждая группа животных состояла из 42 крыс. Соответственно, общее число животных в эксперименте – 84 крысы.

Продолжительность эксперимента составляла 60 дней. Выведение животных из опыта для динамического определения в их крови лизоцима (Л) и миелопероксидазы (МПО) проводили в первый день начала эксперимента и, далее, на 10, 20, 30, 40, 50 и 60 день.

Взятие образцов крови проводили путем декапитации крыс, которые находились в состоянии эфирного наркоза с учётом норм «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Страсбург, 18.03.1986 г., Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»].

Концентрацию лизоцима в сыворотке крови определяли по методу Бухарина О.В. с соавт. (1974). Кровь от животного собирали в центрифужную пробирку и получали сыворотку. Далее, 0,1 мл сыворотки крови переносили в бактериологическую пробирку, в которую добавляли 0,9 мл физиологического раствора. Полученную смесь перемешивали и к ней добавляли 1,5 мл суспензии тест объекта культуры *M.lysodeicticus*, которую предварительно стандартизовали на ФЭК-56М до экстинкции 0,66 (против зеленого светофильтра № 6). Тест объект выращивали на мясопептонном агаре (МПА) в течение 24 ч в термостате при температуре $+37,0^{\circ}\text{C}$.

Готовую суспензию, содержащую тест объект и исследуемую сыворотку, перемешивали и помещали в термостат на 30 мин при температуре $+37,0^{\circ}\text{C}$. После завершения времени инкубации пробирки с материалом вынимали из термостата и определяли его экстинкцию на ФЭК-56М. Полученные в ходе определения величины экстинкций с помощью специальных таблиц переводили в значения, характеризующие концентрацию (Л) в сыворотке крови и выражали в мкг/мл.

Уровень миелопероксидазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом, Page R.C. et al. (1978). Кровь от животного собирали в центрифужную пробирку и получали сыворотку. Затем, 0,1 мл сыворотки крови переносили в лунку с плоским дном панели для ИФА и в эту же лунку вносили 0,1 мл 5% раствора бензидина. В контрольную лунку вместо исследуемой сыворотки вносили 0,1 мл физиологического раствора. Исследуемые пробы аккуратно перемешивали в планшетах и помещали в термостат на 60 мин при температуре $37,0^{\circ}\text{C}$. По окончании времени инкубации планшеты доставали из термостата и просматривали на вертикальном спектрофотометре фирмы «Dunattech» при длине волны 492 нм. Концентрацию (МПО) в сыворотке крови получали в единицах экстинкции и выражали в условных единицах (у.е./мл).

Обработку результатов исследования проводили с помощью методов описательной статистики и однофакторного дисперсионного анализа, представ-

ленных в электронной таблице EXCEL и в прикладном пакете программ SPSS 13.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

В таблице 10 представлены план и результаты эксперимента по динамическому определению лизоцима и миелопероксидазы в крови животных, находящихся на стандартном рационе питания, на естественном употреблении обычной водопроводной воды (контрольная группа) и на естественном употреблении водопроводной воды, дополнительно очищенной фильтром ZF-МЧС (опытная группа). В таблице 11 и 12 показана достоверность различий средних значений (M) концентраций лизоцима и миелопероксидазы в сыворотке крови животных на фоне употребления обычной водопроводной воды и на фоне употребления водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС.

Результаты исследования демонстрируют, что на фоне 60 дней естественного употребления животными обычной водопроводной воды и стандартного рациона питания (контрольная группа) статистически значимого тренда повышения или снижения концентрации ферментов лизоцима и миелопероксидазы в сыворотке крови не обнаружено. При естественном употреблении животными водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС (опытная группа), на фоне 40 дней также не выявлено значимых изменений концентраций ферментов лизоцима и миелопероксидазы как относительно исходных значений данных показателей, так и достоверности различий этих значений по сравнению с контрольной группой животных ($p > 0,05$).

Однако, при увеличении продолжительности времени употребления животными водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, на 50 и 60 день эксперимента отмечается достоверное повышение активности исследуемых показателей как относительно их исходных значений, так и при сравнении значений данных показателей с контрольной группой ($p < 0,05$). Это означает, что достаточно продолжительное употребление животными водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, усиливает механизмы секреции

ферментов лизоцима и миелопероксидазы в сыворотке крови и не вызывает иммунодепрессивных эффектов показателей клеточного иммунитета.

Таблица 10.

Показатели неспецифического иммунитета животных при естественном употреблении водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, и воды, полученной из городского водопровода

Наименование показателей неспецифической резистентности	Сроки взятия образцов крови, дни	Значения показателя у животных на фоне употребления воды, очищенной фильтром ZF-МЧС	Значения показателя у животных на фоне употребления обычной воды
Концентрация лизоцима в сыворотке крови, мкг/мл	1	9,83 ± 0,60 σ = 1,47 (n=6)	9,50 ± 0,50 σ = 1,22 (n=6)
	10	9,33 ± 0,42 σ = 1,03 (n=6)	9,83 ± 0,54 σ = 1,34 (n=6)
	20	10,00 ± 0,52 σ = 1,26 (n=6)	9,17 ± 0,48 σ = 1,17 (n=6)
	30	10,83 ± 0,47 σ = 1,17 (n=6)	10,00 ± 0,58 σ = 1,41 (n=6)
	40	10,33 ± 0,42 σ = 1,04 (n=6)	9,67 ± 0,66 σ = 1,63 (n=6)
	50	10,67 ± 0,33 σ = 0,82 (n=6)	9,00 ± 0,44 σ = 1,09 (n=6)
	60	11,00 ± 0,26 σ = 0,63 (n=6)	9,33 ± 0,50 σ = 1,21 (n=6)
Концентрация миелопероксидазы в сыворотке крови, у.е./мл	1	0,91 ± 0,09 σ = 0,21 (n=6)	0,98 ± 0,07 σ = 0,18 (n=6)
	10	1,02 ± 0,08 σ = 0,21 (n=6)	0,92 ± 0,07 σ = 0,19 (n=6)
	20	0,95 ± 0,09 σ = 0,23 (n=6)	1,00 ± 0,08 σ = 0,18 (n=6)
	30	1,02 ± 0,10 σ = 0,24 (n=6)	0,91 ± 0,08 σ = 0,20 (n=6)
	40	1,23 ± 0,08 σ = 0,21 (n=6)	1,02 ± 0,10 σ = 0,19 (n=6)
	50	1,31 ± 0,05 σ = 0,13 (n=6)	1,07 ± 0,07 σ = 0,19 (n=6)
	60	1,47 ± 0,05 σ = 0,12 (n=6)	0,96 ± 0,09 σ = 0,21 (n=6)

Примечание: $M \pm m$ – среднее значение и его ошибка; σ – стандартное отклонение; n – число животных в группе.

Таблица 11.

Достоверность различий концентрации лизоцима в сыворотке крови животных на фоне употребления водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, и на фоне воды, полученной из городского водопровода

Сроки взятия образцов крови, дни	Обозначения статистических показателей	Концентрация лизоцима на фоне воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, мкг/мл	Концентрация лизоцима на фоне воды из городского водопровода, мкг/мл	Двухвыборочный Т-тест Стьюдента (Т) для средних значений с раз- личными диспер- сиями и уровень значимости (р)
1	$M \pm \sigma$	$9,83 \pm 1,47$	$9,50 \pm 1,22$	0,43
	D	2,17	1,50	0,68 (>0,05)
10	$M \pm \sigma$	$9,33 \pm 1,03$	$9,83 \pm 1,34$	0,73
	D	1,07	1,76	0,48 (>0,05)
20	$M \pm \sigma$	$10,00 \pm 1,26$	$9,17 \pm 1,17$	1,18
	D	1,60	1,36	0,26 (>0,05)
30	$M \pm \sigma$	$10,83 \pm 1,17$	$10,00 \pm 1,41$	1,11
	D	1,37	2,00	0,29 (>0,05)
40	$M \pm \sigma$	$10,33 \pm 1,04$	$9,67 \pm 1,63$	0,84
	D	1,06	2,66	0,42 (>0,05)
50	$M \pm \sigma$	$10,67 \pm 0,82$	$9,00 \pm 1,09$	2,99
	D	0,67	1,20	0,01 (<0,05)
60	$M \pm \sigma$	$11,00 \pm 0,63$	$9,33 \pm 1,21$	2,98
	D	0,40	1,46	0,02 (<0,05)

Примечание: М – среднее значение; $\pm \sigma$ – стандартное отклонение;
D – дисперсия; р – уровень значимости.

Таблица 12.

Достоверность различий концентрации миелопероксидазы (МПО) в сыворотке крови животных на фоне употребления водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, и на фоне воды, полученной из городского водопровода

Сроки взятия образцов крови, дни	Обозначения статистических показателей	Концентрация МПО на фоне воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, мкг/мл	Концентрация МПО на фоне воды из городского водопровода, мкг/мл	Двухвыборочный Т-тест Стьюдента (Т) для средних значений с раз- личными диспер- сиями и уровень значимости (р)
1	$M \pm \sigma$	$0,91 \pm 0,21$	$0,98 \pm 0,18$	0,60
	D	0,05	0,03	0,56 (>0,05)
10	$M \pm \sigma$	$1,02 \pm 0,21$	$0,92 \pm 0,18$	0,87
	D	0,04	0,03	0,40 (>0,05)
20	$M \pm \sigma$	$0,95 \pm 0,23$	$1,00 \pm 0,19$	0,41
	D	0,05	0,03	0,69 (>0,05)
30	$M \pm \sigma$	$1,02 \pm 0,24$	$0,91 \pm 0,20$	0,85
	D	0,06	0,04	0,42 (>0,05)
40	$M \pm \sigma$	$1,23 \pm 0,21$	$1,02 \pm 0,19$	1,86
	D	0,04	0,03	0,09 (>0,05)
50	$M \pm \sigma$	$1,31 \pm 0,13$	$1,07 \pm 0,19$	2,59
	D	0,02	0,04	0,03 (<0,05)
60	$M \pm \sigma$	$1,47 \pm 0,12$	$0,96 \pm 0,21$	5,12
	D	0,02	0,05	0,001 (<0,05)

Примечание: М – среднее значение; $\pm \sigma$ – стандартное отклонение;
D – дисперсия; р – уровень значимости.

В таблице 13 представлены изменения коэффициента вариации (C_v , %) средних значений концентрации лизоцима в сыворотке крови животных на фоне продолжительного употребления водопроводной воды, очищенной с помощью фильтра ZF-MЧС, и на фоне воды из городского водопровода. Результаты расчетов показывают, что длительное употребление животными водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-MЧС, сопровождается снижением коэффициента вариации средних концентраций лизоцима с 14,95 % до 7,68-5,73 %. Это свидетельствует об устойчивости и низкой вариабельности (разброса) средних значений концентрации лизоцима в крови опытной группы животных. Низкая вариабельность средних концентраций фермента лизоцима в сыворотке крови опытной группы животных в совокупности с эффектом умеренного повышения данного показателя на 50 и 60 день эксперимента свидетельствует о формировании тенденции активации клеточного звена иммунитета, что в условиях физиологической нормы связано с усилением адаптационных реакций организма.

Таблица 13.

Коэффициент вариации средних значений концентрации лизоцима в сыворотке крови животных на фоне употребления водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-MЧС, и на фоне воды, полученной из городского водопровода

Сроки взятия образцов крови, дни	Коэффициент вариации (C_v , %) средних значений концентраций лизоцима на фоне воды, очищенной фильтром ZF-MЧС	Коэффициент вариации (C_v , %) средних значений концентраций лизоцима на фоне воды, полученной из городского водопровода
1	14,95	12,84
10	11,04	13,63
20	12,60	12,76
30	10,80	14,10
40	10,07	16,85
50	7,68	12,11
60	5,73	12,97

В контрольной группе животных, находящихся на стандартном рационе питания и естественном употреблении обычной водопроводной воды, полученной из городского водопровода, аналогичных изменений коэффициента вариации средних значений концентрации лизоцима не выявлено. Это свидетельствует об отсутствии устойчивости и низкой вариабельности средних концентраций лизоцима во времени у животных контрольной группы.

В таблице 14 представлены изменения коэффициента вариации (C_v , %) средних значений концентрации миелопероксидазы в сыворотке крови животных на фоне продолжительного употребления водопроводной воды, очищенной с помощью фильтра ZF-МЧС, и на фоне воды из городского водопровода.

Результаты исследования показывают, что при продолжительном употреблении животными водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, также происходит снижение коэффициента вариации средних концентраций фермента миелопероксидазы с 23,07 % до 9,92-8,16 %, что свидетельствует об устойчивости и низкой вариабельности изменений средних значений концентрации миелопероксидазы в крови опытной группы животных. Низкая вариабельность средних концентраций фермента миелопероксидазы в сыворотке крови опытной группы животных в сочетании с эффектом умеренного повышения данного показателя на 50 и 60 день эксперимента свидетельствует о формировании тенденции активации клеточного звена иммунитета, что в условиях физиологической нормы связано с усилением адаптационных реакций организма.

В контрольной группе животных, находящихся на стандартном рационе питания и естественном употреблении обычной водопроводной воды, полученной из городского водопровода, аналогичных изменений коэффициента вариации средних значений концентрации миелопероксидазы не обнаружено. Это означает отсутствие устойчивости и низкой вариабельности средних концентраций миелопероксидазы у животных контрольной группы на фоне 60 дней эксперимента, что демонстрирует случайную направленность изменений данного показателя в указанной группе животных.

Таблица 14.

Изменения коэффициента вариации (C_v , %) средних значений концентрации миелопероксидазы (МПО) в сыворотке крови животных на фоне употребления водопроводной воды, очищенной фильтром ZF-МЧС, и на фоне воды, полученной из городского водопровода

Сроки взятия образцов крови, дни	Коэффициент вариации (C_v , %) средних концентраций МПО на фоне воды, очищенной фильтром ZF-МЧС	Коэффициент вариации (C_v , %) средних концентраций МПО на фоне воды, полученной из городского водопровода
1	23,07	18,37
10	20,59	19,56
20	24,21	19,00
30	23,53	21,98
40	17,07	18,63
50	9,92	17,76
60	8,16	21,87

Заключение

Таким образом, по сравнению с группой контроля, изменения концентрации ферментов сыворотки крови лизоцима и миелопероксидазы у животных опытной группы, находящихся на стандартном рационе питания и естественном употреблении водопроводной воды, дополнительно очищенной фильтром ZF-МЧС, имеют сходную направленность изменений, которая выявляется на 50 и 60 день эксперимента. Это означает, что продолжительное употребление животными очищенной воды формирует тенденцию повышения исследованных неспецифических показателей иммунитета и в условиях физиологической нормы связано с усилением адаптационных реакций организма. Это имеет значение для разработки комплексных программ, связанных с повышением работоспособности и выносливости организма в условиях повышенных физических нагрузок или неблагоприятных факторов внешней среды.

ВЫВОДЫ

1. При моделировании острой почечной недостаточности у крыс показано, что динамика выживаемости животных, которым пероральным способом вводили графеноподобную субстанцию «ИТВАЙЗ», практически в 2 раза превышает выживаемость контрольной группы нефрэктомированных животных, содержащихся на стандартном рационе.

2. Пероральное введение животным субстанции «ИТВАЙЗ» в условиях физиологической нормы приводит к ощелачиванию плазмы крови, что свидетельствует о биологической активности данной субстанции. Возможно, что в условиях острой почечной недостаточности за счёт ощелачивающего действия данной субстанции происходит сдерживание ацидотических проявлений, которое повышает среднюю (50,0%) выживаемость нефрэктомированных животных опытной группы.

3. При моделировании у крыс состояния нарастающей хронической почечной недостаточности и перорального введения графеноподобной субстанции «ИТВАЙЗ» также отмечается ощелачивание плазмы крови. Этот эффект определяется на ранних стадиях формирования указанного патологического состояния, что демонстрирует возможность применения субстанции «ИТВАЙЗ» в качестве одного из основных компонентов для создания капсульной формы комплексного протектора уремических интоксикаций, действие которого может быть направлено на сдерживание ацидотических проявлений.

4. В условиях физиологической нормы как однократное пероральное введение животным субстанции «ИТВАЙЗ», так и многократное (курсовое) введение данного вещества в течение 10 дней показывает отсутствие выраженной активации и ингибирования показателей неспецифического иммунитета. Это означает, что потенциальное использование субстанции «ИТВАЙЗ» в качестве одного из компонентов протектора уремических интоксикаций на ранних стадиях развития хронической почечной недостаточности не будет вызывать иммунодепрессивных реакций. Это имеет значение для проведения адекватной

терапии, учитывающей иммунные механизмы развития системного воспалительного процесса данного патологического состояния.

5. Естественное продолжительное (60 дней) употребление экспериментальными животными водопроводной воды, дополнительно очищенной фильтром ZF-МЧС, в условиях физиологической нормы имеет тенденцию повышения неспецифических показателей иммунитета (лизоцим, миелопероксидаза), что связано с повышением адаптационных реакций организма.