

Сезонная динамика показателей физической работоспособности лабораторных животных

Е.Б. Шустов¹, Ю.В. Фокин¹, Г.Д. Капанадзе¹, И.А. Берзин²,
Н.В. Станкова¹, О.В. Алимкина¹, Е.Л. Матвеев¹, Н.В. Петрова¹

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

² – Федеральное медико-биологическое агентство России, Москва

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

Исследование выполнено как ретроспективный анализ результатов ранее выполненных исследований по доклиническому изучению новых химических соединений, перспективных в качестве средств повышения работоспособности. Анализировались показатели контрольных групп животных, полученных в ходе выполнения кинезогидродинамического исследования, теста вынужденного плавания с грузом, ротарода – на крысах, бега до отказа на тредбане – на мини-свиньях. Показано, что влияние фактора «сезонность» на все анализируемые показатели было статистически достоверным. Наиболее существенным оно было для показателя теста на ротароде, выносливости и максимальной скорости плавания в кинезогидродинамическом исследовании. Умеренная значимость фактора сезонности была установлена для показателя средней скорости плавания, показателей работоспособности и утомляемости в кинезогидродинамическом исследовании. Фактор сезонности практически не оказывал влияния на показатель времени предельного плавания животных с грузом и времени бега мини-свиней на тредбане до отказа. Таким образом, чем экстремальнее тестовое воздействие на животных, тем менее значимым является фактор сезонности. Полученные результаты необходимо учитывать при планировании доклинических исследований, направленных на оценку физической работоспособности животных.

Ключевые слова: лабораторные животные, биомоделирование, физическая работоспособность, факторный анализ.

Введение

Одной из нерешенных методических проблем биомедицинских исследований в области спортивной медицины и доклинического изучения фармакологических средств, влияющих на физическую работоспособность, является несопоставимость результатов, полученных разными исследователями, в силу методических вариаций и расхождений в условиях проведения исследований [6]. Стандартизации условий выполнения тестов доклинического изучения физической работоспособности лабораторных животных в настоящее время

уделяется пристальное внимание [1, 4, 6]. Одним из факторов, способных оказывать влияние на результаты исследования физической работоспособности животных, является сезонность, т.к. животные (особенно грызуны) весьма подвержены природным сезонным биоритмам.

Материалы и методы

Исследование выполнено как ретроспективный анализ результатов ранее выполненных исследований по доклиническому изучению новых химических соединений, перспективных в качестве

средств повышения работоспособности. Анализировались показатели контрольных групп животных, полученные в ходе выполнения кинезогидродинамического исследования, теста вынужденного плавания с грузом, ротарода – на крысах, бега до отказа на тредбане – на мини-свиньях.

Регулирующие стандарты. Исследования, результаты которых включены в анализ, были выполнены согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [7]. Протоколы исследований были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Тестируемые животные. Исследования, результаты которых были включены в анализ, проводились на белых лабораторных крысах-самках линии WAG/GY конвенционального статуса

в возрасте 1,5-3,5 мес. средней массой 160-240 г, а также на мини-свиньях светлогорской популяции обоего пола массой 16-20 кг.

Условия кормления и содержания. Крыс содержали в микроизоляторной системе «RairIsoSystem». Животные соответствовали категории конвенциональных. Мини-свиньи содержались в стационарных клетках, индивидуально. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) (для крыс – ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5, для мини-свиней – ПК 58). Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность воздуха 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Методики доклинического исследования физической работоспособности лабораторных животных

Кинезогидродинамическая модель плавания [4, 5, 6, 8]. Исследование проводилось в специальном гидроканале с изменяющимся встречным потоком жидкости, который должно преодолевать лабораторное животное. Гидроканал построен из прозрачного пластика прямоугольной и равнобокой трапецевидной формы в поперечном сечении (0,4x0,2x0,4 м). Длина канала составляет 1,2 м. Высота уровня жидкости равна 0,2 м. Он оснащен с торцевых

сторон водосборниками, обеспечивающими ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощностью прокачки, теплообменниками для нагрева или охлаждения прокачиваемой жидкости. После включения циркулярного насоса система стабилизировалась на скорости квазиламинарного потока воды не ниже 5 м/мин и температуре воды $24 \pm 1^\circ\text{C}$. «Правильное» направление движения в гидроканале у животных вырабатывалось в ходе предварительного обучения с использованием в конце маршрута домика-приманки (плавающий плотик, который по ходу обучения можно отодвигать дальше к торцу гидроканала) или имитации домика-норки (типа «скворечник»). В процессе эксперимента регистрировались время прохождения рабочей дистанции (1,2 м) и количество выполненных заплывов, до отказа животного от плавания. Скорость встречного потока – 0,25 м/с. Расчетными показателями модели являлись:

- максимальная скорость плавания ($V_{\max}$, м/с)

$$V_{\max} = V_p + L / T_{\min},$$

где V_p – скорость потока, L – длина мерного участка (1,2 м), $T_{\min}$ – минимальное время проплыва мерного участка;

- выносливость (Z , ед) – количество выполненных заплывов;

- работоспособность (L_{sum} , м) – суммарное преодоленное расстояние;

$$L_{\text{sum}} = L * Z + V_p * T_{\text{sum}},$$

где L – длина мерного участка (1,2 м), Z – количество выполненных заплывов, V_p – скорость потока, T_{sum} – суммарное время плавания по всем заплывам;

- утомляемость (U , ед) – тангенс угла наклона эргографической кривой (определяется как угловой коэффициент

линейной регрессии зависимости продолжительности заплывов от их количества);

- средняя скорость плавания ($V_s = R / T_{\text{sum}}$, м/с).

Тест вынужденного плавания лабораторных животных с грузом. Классическая методика теста Порсолта (вынужденного плавания) предназначена для оценки депрессивного поведения (в частности, «отчаяния»), но после модификации – широко используется для оценки эффектов стимуляторов работоспособности в условиях стресса. Тест принудительного плавания представляет собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты [2, 3, 6, 9]. В анализируемых исследованиях применялся груз, составляющий 10% от массы тела и прикрепляемый у основания хвоста животного. Регистрируемый показатель – предельное время плавания (T_p).

Тест на ротароде. Прибор предназначен для оценки чувства равновесия, способности удерживаться на вращающемся барабане [3, 6, 10]. Каждое животное помещалось в закрытую камеру (30х30х40 см) с отверстиями для воздухообмена. Пол камеры состоял из стальных стержней, на которые подавалось постоянное напряжение 35-40 В (ток 1 А без учёта сопротивления кожи животных). Это вынуждало крысу запрыгивать на вращающийся вал, поднятый на высоту 15 см от пола и покрытый мягким пористым материалом (диаметр вала – 7 см, скорость вращения – 1,5 об./сек) и в течение эксперимента передвигаться на нем. Регистрируемый показатель – время удержания на вращающемся валу (T_u).

Тест бега мини-свиней на тредбане до отказа. Данный тест относится к жестким видам теста и служит для оценки выносливости и работоспособности животных [2, 3, 6]. Данные, полученные после проведения теста, можно экстраполировать в дальнейшем на человека. Животные предварительно специально отбираются по способности к бегу (обычно пригодны не более 30% животных из общего поголовья стада) и обучаются бегу на тредбане. Скорость движения беговой дорожки во время тестирования работоспособности – 6 км/ч. Для создания у животных стимула к бегу используется электрическое раздражение. Регистрируемый показатель – время бега (T_t).

Процедура ретроспективного анализа. Группировка данных осуществлялась по двухмесячным интервалам (февраль-март, апрель-май, июнь-июль, август-сентябрь, октябрь-ноябрь, декабрь-январь). Для построения сезонного графика данные нормировались в Т-бальной системе по отношению суммарного годового цикла по следующей формуле:

$$T(X_i) = 50 + 10 \times \frac{x_i - x_m}{\delta},$$

где $T(X_i)$ – Т-бальная оценка X_i значения, x_m – среднее значение годового вариационного ряда, δ – среднеквадратичное отклонение значений в годовом цикле.

Статистическая обработка. Обработка данных осуществлялась методами описательной статистики. Значимость влияния фактора сезонности оценивалась методом однофакторного дисперсионного анализа (прикладной пакет

«Анализ данных» процессора таблиц Microsoft Excel 2010).

Результаты и их обсуждение

Всего было проанализировано 528 результатов кинезогидродинамических исследований, 437 результатов теста вынужденного плавания с грузом 10% от массы тела, 186 исследований на ротароде, 178 забегов мини-свиней на тредбане. Анализируемые показатели: для кинезогидродинамического исследования – максимальная скорость плавания (V_{max} , м/с), средняя скорость плавания (V_s , м/с), суммарная длительность плавания (T_{sum} , с), суммарная дистанция пропыва (L_{sum} , м), количество заплывов (Z , ед.), утомляемость (U , отн.ед.); для теста вынужденного плавания – время плавания (T_p), для теста на ротароде – время удержания (T_u), для бега на тредбане – время бега (T_t).

Статистические характеристики анализируемого массива в годовом цикле представлены в табл. 1.

Общей особенностью практически всех показателей физической работоспособности животных (кроме скоростных показателей в кинезогидродинамическом исследовании) является то, что их статистическое распределение отличается от нормального. Это отражает факт предварительного отбора, обучения и тренировки животных, в силу чего анализируемые показатели закономерно перестают играть роль случайной величины.

При анализе табл. 1 обращает на себя внимание очень высокая вариабельность показателя теста на ротароде ($KB=0,71$), а также показателей выносливости и утомляемости животных в кинезогидродинамическом исследовании (KB равен 0,6 и 0,67 соответственно). Можно пред-

Таблица 1
Статистические характеристики массива показателей физической работоспособности лабораторных животных

Животные	Крысы								Мини-свиньи
Методика	Кинезогидродинамическое исследование						Плав. с грузом	Ротарод	Тред-бан
Показатель	Vmax	Vs	Tsum	Lsum	Z	U	Tr	Tu	Tt
Среднее	21,8	19,9	43,2	14,1	3,6	23,6	127	95,2	21,3
Стандартная ошибка	0,1	0,1	0,9	0,3	0,1	0,71	2	4,9	0,3
Медиана	21,5	19,4	40,3	13,4	3,0	20,0	120	70,5	20
Мода	25,5	16,4	34,0	6,8	3,0	20,0	120	28,0	20
Стандартное отклонение	3,8	2,7	20,5	6,7	2,1	15,8	38	67,6	15,6
Экссесс	-0,72	-0,15	0,50	2,4	6,2	0,91	3,75	0,55	2,58
Асимметричность	0,34	0,63	0,73	1,0	1,7	1,41	1,23	0,98	25
Минимум	15,7	15,7	5,8	2,5	1	3,3	32	13	15
Максимум	34,2	30,0	133,9	51,9	18	60	343	373	40
Коэффициент вариации (КВ)	0,17	0,14	0,48	0,48	0,6	0,67	0,30	0,71	0,19

положить, что эти показатели, в большей степени по сравнению с другими, отражают индивидуальные особенности функционального состояния животных. Наименее вариативными являются показатели скоростных характеристик крыс в кинезогидродинамической моде-

ли и время бега мини-свиней на тредбане до отказа. Можно предположить, что эти показатели в большей степени отражают видовые особенности животных.

Результаты однофакторного (внешний фактор – сезонность) дисперсионного анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2
Результаты дисперсионного анализа влияния фактора «сезонность» на показатели физической работоспособности лабораторных животных

Показатель	Центроиды групп по периодам						D	p
	февраль-март	апрель-май	июнь-июль	август-сентябрь	октябрь-ноябрь	декабрь-январь		
Vmax	20,2	24,8	21,3	24,9	21,0	23,0	0,24	$4 \cdot 10^{-29}$
Vs	19,1	21,3	19,8	21,5	19,5	21,4	0,12	$2 \cdot 10^{-12}$
Tsum	39,8	52,5	43,6	50,9	37,5	21,5	0,12	$2 \cdot 10^{-12}$
Lsum	12,2	18,1	14,4	17,9	12,1	7,6	0,17	$5 \cdot 10^{-20}$
Z	2,7	5,2	3,8	5,3	3,0	2,3	0,26	$2 \cdot 10^{-31}$
U	29,7	12,7	24,8	15,8	24,9	31,9	0,15	$4 \cdot 10^{-17}$
Tr	115,3	141,3	127,0	107,3	125,3	120,2	0,04	0,001
Tu	40	89	56	173	133	104	0,41	$5 \cdot 10^{-20}$
Tt	23,0	26,4	20,2	21,2	20,3	39,7	0,43	$6 \cdot 10^{-18}$

Примечание: D – коэффициент детерминации модели (показывает, какая часть общей вариативности показателя может быть отнесена к влиянию анализируемого фактора); p – уровень значимости.

Анализ табл. 2 показывает, что, в силу большого числа наблюдений, влияние фактора «сезонность» на все анализируемые показатели было статистически достоверным. Однако существенным оно является для показателя теста на ротароде (объясняет 41% вариабельности времени удержания животных на вращающемся валу), выносливости и максимальной скорости плавания в кинезогидродинамическом исследовании (26 и 24% общей вариабельности соответственно). Умеренная значимость фактора сезонности была зафиксирована для показателя средней скорости плавания (12%), обоих показателей работоспособности (T_{sum} – 12%, L_{sum} – 17%), утомляемости (15%). Фактор сезонности практически не оказывал влияния на показатель времени предельного плавания животных с грузом (T_r – 4% общей вариабельности показателя). В отношении времени бега мини-

свиней на тредбане до отказа (T_t) только в одном периоде (декабрь) результаты теста существенно отличаются от среднегодового уровня, однако это может быть отнесено не к сезонным изменениям работоспособности животных, а к их взрослению к этому времени и большему уровню тренированности.

В графическом варианте сезонная динамика показателей кинезогидродинамической модели отражена на рис. 1, других тестов работоспособности животных – на рис. 2.

Анализ рис. 1 показывает, что у крыс в кинезогидродинамическом исследовании выделяется 2 периода повышенной (более 55 Т-баллов) работоспособности – апрель-май и август-сентябрь. В остальное время года показатели работоспособности находятся в пределах естественного разброса (± 5 Т-баллов) по отношению к среднегодовому уровню (50 Т-баллов).

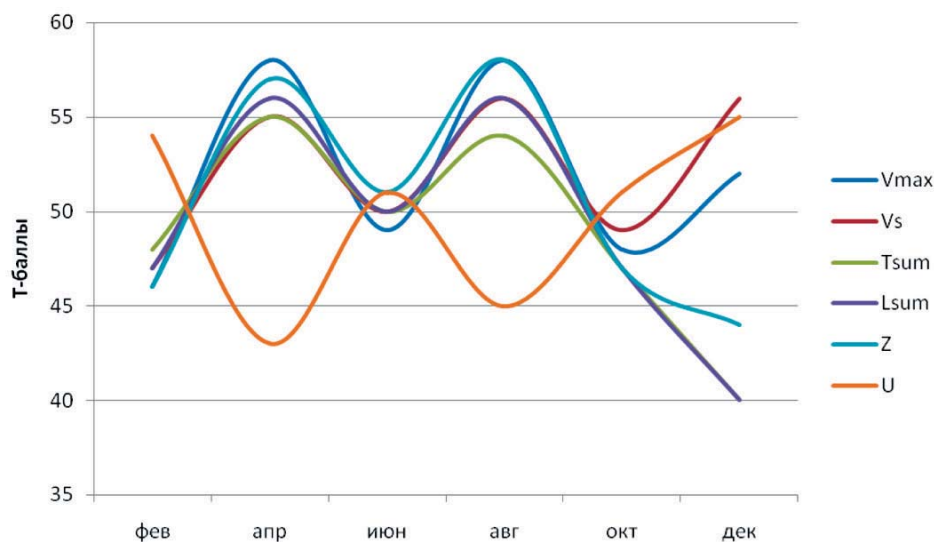


Рис. 1. Сезонная динамика показателей физической работоспособности крыс в кинезогидродинамическом исследовании.

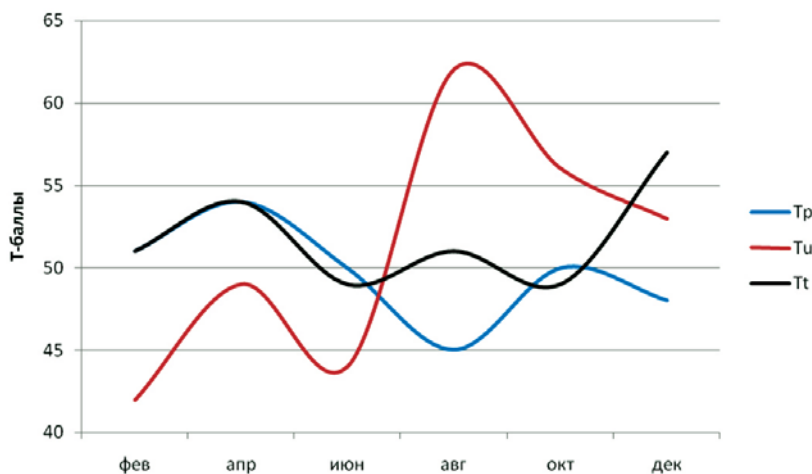


Рис. 2. Сезонная динамика показателей работоспособности крыс в тестах предельного плавания с грузом (Tr) и на ротороде (Tu), а также мини-свиней – в тесте бега на тредбане до отказа (Tt).

Анализ рис. 2 показывает, что время предельного плавания крыс с грузом 10% от массы тела в годовом цикле исследований не имеет выраженных сезонных пиков или провалов (отмечается лишь умеренное повышение в апреле-мае и также умеренное снижение в августе-сентябре).

В тесте на ротороде отмечается выраженная сезонная динамика показателей: низкие значения – в феврале-марте, высокие значения – в августе-ноябре. И только в период апреля-июля и декабря-января значения этого показателя соответствуют среднегодовому уровню.

Время бега мини-свиней до отказа на тредбане фактически не имеет отчетливой сезонной динамики (за исключением периода декабрь-январь). В это время, вероятно, для некоторых животных начинает сказываться не столько фактор сезонности, сколько фактор их взросления, роста, переход в более тренированную к бегу категорию.

Выводы

При планировании доклинических исследований, направленных на оценку физической работоспособности, необходимо учитывать влияние фактора сезонности на крыс.

В кинезогидродинамическом исследовании повышенная работоспособность животных контрольной группы будет отмечаться в апреле-мае и в августе-сентябре.

В тесте предельного плавания крыс с грузом 10% от массы тела незначительное повышение по сравнению со среднегодовым уровнем времени выполнения теста будет отмечаться в апреле-мае, а некоторое снижение – в августе-сентябре.

В связи с выраженными сезонными колебаниями значений показателя работоспособности крыс в тесте на ротороде, подобные исследования целесообразно планировать на период с апреля по июль, т.к. именно в это время результаты теста являются более стабильными.

При планировании доклинических исследований работоспособности на мини-свиньях необходимо особенно четко контролировать однородность групп по возрасту и уровню тренированности. По возможности, для исключения влияния сезонного фактора, нецелесообразно их планировать на декабрь-январь месяцы.

Список литературы

1. *Зайцева М.С., Иванов Д.Г., Александровская Н.В.* Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины ее вариабельности // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 30-42.
2. *Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н.* Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. – 2013. – № 1. – С. 7-17.
3. *Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В.* Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 15-21.
4. *Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Алимкина О.В., Семенов Х.Х., КAPANADZE Г.Д.* Факторы, влияющие на физическую работоспособность лабораторных животных в кинезогидродинамическом исследовании // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 23-29.
5. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н.* Кинезогидродинамическая модель для оценки выносливости и работоспособности лабораторных животных // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 6-14.
6. *Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б.* Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. - М., СПб.: Айсинг. – 2013. – 288 с.
7. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. – 2010. – 358 с.
8. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Касинская Н.В.* Кинезогидродинамическая оценка скоростных характеристик физической работоспособности животных в фармакологических исследованиях // Биомедицина. – 2013. – № 3. – С. 6-17.
9. *Dawson C., Horvath S.* Swimming in small laboratory animals // Med. sci. sports. – 1970 – V. 2. – P. 51-78.
10. *Dunham N.W., Miya T.S.* A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rate and mice // J. Amer. pharm. assoc. sci. ed. – 1957. – V. 46. – P. 208-209.

Seasonal dynamics of indicators of physical health of laboratory animals

**E.B. Shustov, Yu.V. Fokin, G.D. Kapanadze, I.A. Berzin, N.V. Stankova,
O.V. Alimkina, E.L. Matveyenko, N.V. Petrova**

The study was performed as a retrospective analysis of the results of previous studies on preclinical researches of new chemical compounds promising as a means of improving efficiency. We analyzed the control group of animals received in the course of the kinezohydrodynamic study, forced swimming test with a load, test on rota-rod with rats, running on a treadmill to failure with mini-pigs. It is shown that the influence of the factor “season” for all analyzed parameters was statistically significant. The most important it was for the index test on rota-rod, endurance and maximum swimming speed in kinezohydrodynamic study. Moderate importance of seasonality factor has been set for the index average swimming speed, performance indicators and fatigue in kinezohydrodynamic study. Seasonality hardly has any effect on the time limit of swimming animals with load and mini-pigs running on a treadmill to failure. Thus, the more extreme impact test animal, the less significant is the seasonal factor. The results need to be considered when planning preclinical studies aimed at assessing the physical performance of animals.

Key words: laboratory animals, biomodeling, physical performance, factor analysis.