

Влияние синтетических пребиотиков на психоэмоциональное состояние крыс

Ю.В. Фокин¹, А.М. Зубалий², М.К. Чугреев², М.М. Борисова²,
О.В. Алимкина¹

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

² – ФГБОУ ВПО «РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, fokin-yuri@yandex.ru

Пищевые добавки на основе пребиотиков способствуют нормализации психоэмоционального состояния крыс, поддержанию его на достаточно высоком уровне комфорта и имеют седативное действие, что отражается в ультразвуковой вокализации животных. Курсовое потребление биологически активных добавок на основе лактулозы, янтарной и аминокислот не изменяет нормальных поведенческих реакций крыс, что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния данных средств. Анализ свободного поведения и ультразвуковой вокализации крыс может служить объективным методом оценки эффектов пребиотиков, БАДов и других средств аналогичного действия.

Ключевые слова: пребиотики, пищевые биологически активные добавки, психоэмоциональное состояние, поведение, ультразвуковая вокализация, крысы.

Введение

Биологически активные добавки к пище (БАД) – термин, вошедший в современную медицину сравнительно недавно. Однако ещё до новой эры во многих странах Востока сложились довольно стройные системы профилактики и терапии различных заболеваний человека путём использования, чаще всего, в натуральном виде, специально приготовленных продуктов из растительных и животных тканей, минерального сырья. БАДы улучшают самочувствие, способствуют более быстрому выздоровлению при многих болезнях, но, как и лекарства, принимать их следует с большой осторожностью.

Цель исследования – оценить влияние месячного потребления пищевых биологически активных добавок на основе пребиотика-лактолозы на поведение и ультразвуковую вокализацию крыс.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в НЦБМТ ФМБА России. Тестировались самки крыс линии WAG/GY в возрасте 3 мес., по 8 особей в контрольной и опытной группах.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003), 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 [2]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ ФМБА России.

Дизайн и организация исследования направлены на изучение поведенческих форм животных, употребляющих пищевые биологически активные добавки на основе лактулозы, а также их ультразвуковой вокализации (УЗВ) и выявление взаимосвязи данных характеристик с психоэмоциональным состоянием крыс. Количество объектов, принимающих участие в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемого эффекта.

Условия кормления и содержания. Крыс содержали в микроизоляторной системе RairIsoSystem по 4 особи. Животные соответствовали категории конвенциональных. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине

7 дней в клетках.

Исследуемые вещества – пищевые биологически активные добавки на основе лактулозы – дисахарида, состоящего из остатков молекул галактозы и фруктозы. Лактулоза является синтетическим стереоизомером молочного сахара – лактозы, используется в качестве стимулирующего перистальтику кишечника лекарственного средства, применяется при диагностике нарушений желудочно-кишечного тракта, запорах, печёночной энцефалопатии. Тестируемые вещества («Гликолакт» и «Lar-Su», производство ООО «ЯНИЦПП «Парадокс», г. Ростов, Россия), в состав которых также входят глицин и янтарная кислота, применялись в качестве питьевой добавки в рекомендуемых производителем дозах в течение 30 суток. Контрольной группе животных в аналогичном режиме давалась водопроводная очищенная вода в стандартных поилках, вволю.

Регистрация поведенческих компонентов происходила с применением компьютерной системы Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая позволяла вычислять длительность таких форм поведения, как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность (иммобилизация), стойки (вертикальная активность), умывание (груминг). Кроме того, оценивалось время так называемых нераспознанных системой Laboras движений [5]. Эпоха анализа составляла 15 мин. За исследуемый временной промежуток (до начала и после окончания эксперимента) по каждому животному определяли процент каждой формы поведения. Полученные данные группировали в зависимости от тестируемого вещества, временного интервала исследования и формы поведения.

Регистрация УЗВ. Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрацию ультразвуковых колебаний (в течение 15 мин) у каждого животного сначала осуществляли в состоянии покоя (фоновые данные), затем – после окончания курса потребления тестируемого вещества. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье – 2000 интервалов. В ходе анализа спектральную плотность мощ-

ности ультразвука (СПМ), излучаемого каждым животным, нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения приводили в соответствие с максимумом. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам. Ввиду того, что в разные периоды регистрации не все животные излучали ультразвуковые колебания (число N варьировалось), для оценки статистической значимости изменений по сравнению с фоновыми данными был применен анализ ANOVA для несвязанных групп.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования свободного поведения животных, принимавших участие в эксперименте, представлены в табл.

Таблица

Длительность поведенческих форм животных (в среднем по группе, $M \pm m$), сек

Группа животных	До начала эксперимента (фон)					После окончания эксперимента				
	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.
Гликолакт	291,9	43,5	41,2	264,6	258,8	366,8	60,2	98,5	263,7	110,8
	± 7,75	± 8,33	± 7,91	± 30,14	± 23,65	± 11,57	± 10,00	± 14,64	± 27,26	± 9,10
Lar-Su	301,9	35,4	92,6	224,8	245,3	265,3	36,1	220,7	148,5	229,4
	± 9,49	± 5,0	± 15,29	± 22,15	± 9,14	± 8,18	± 5,43	± 21,40	± 12,91	± 18,54
Контроль	320,6	60,5	87,2	277,9	153,8	328,1	46,8	224,8	178,4	121,9
	± 11,15	± 12,01	± 9,45	± 24,58	± 13,03	± 10,61	± 7,56	± 23,82	± 15,01	± 10,51

Примечание:

ЭСП – элементы системного поведения,
Г.а. – горизонтальная активность (локомоции),
Им. – иммобилизация (неподвижность),
В.а. – вертикальная активность (стойки),
Гр. – груминг (умывание).

Оценка элементарных форм поведения контрольной группы животных показала возрастание времени неподвижности и прочих элементов системного поведения, снижение двигательной активности и умывания после эксперимента по сравнению с фоновыми данными. Возрастание времени неподвижности и снижение длительности умывания отмечалось и в обеих опытных группах. В группе «Гликолакт» отмечалось также повышение горизонтальной активности и незначительное снижение вертикальной активности, показатели которой практически аналогичны таковым, полученным в фоновых замерах, на фоне возрастания элементов системного поведения. В группе «Lar-Su» наблюдалась похожая, но несколько иная картина: повышение горизонтальной, снижение вертикальной активности и длительности элементов системного поведения.

Снижение длительности умывания, в целом, не является позитивным признаком при оценке поведения, но обнару-

жение данного эффекта в контрольной группе указывает, возможно, на изменения погодных условий (осадков, скачков атмосферного давления и т.д.) в период финального исследования, на которые могли отреагировать животные.

Таким образом, можно заключить, что исследуемые препараты практически не оказывают влияния на поведение крыс. А это может свидетельствовать об отсутствии негативных свойств, в т.ч. токсичности, данных средств.

Результаты исследования УЗВ тестируемых животных представлены на рис. 1-3.

Фоновые измерения УЗВ контрольной группы крыс (рис. 1) выявили преобладание частот в диапазоне 31-47 кГц с пиком на 41 кГц, что является показателем комфортного состояния данных животных [1, 3, 4, 7, 9, 11]. По окончании эксперимента в УЗВ этих животных преобладают частоты в области 20-27 кГц с пиком на 22 кГц, отмечается снижение СПМ УЗВ в диапазоне комфорта, что

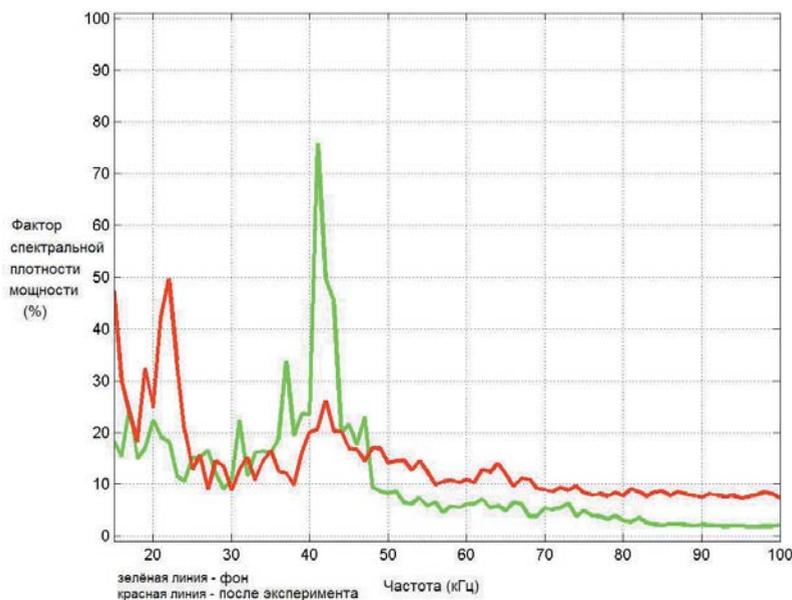


Рис. 1. УЗВ животных контрольной группы.

свидетельствует о пребывании крыс в тревожном, взволнованном состоянии [1, 3, 6, 8, 10].

Причиной этого могут являться те же измененные погодные условия на

данном этапе исследования, что было указано выше, в описании результатов свободного поведения.

Фоновые измерения УЗВ опытной группы «Гликолакт» (рис. 2) показали

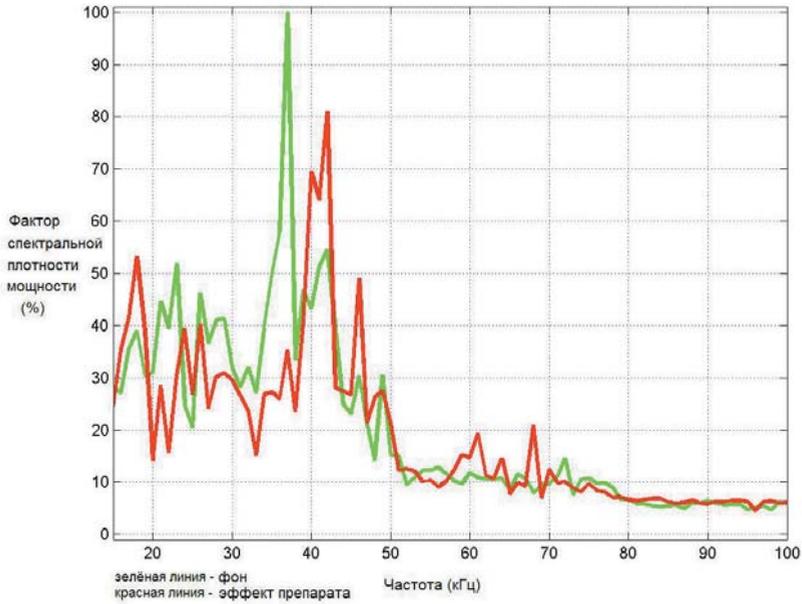


Рис. 2. УЗВ животных группы «Гликолакт».

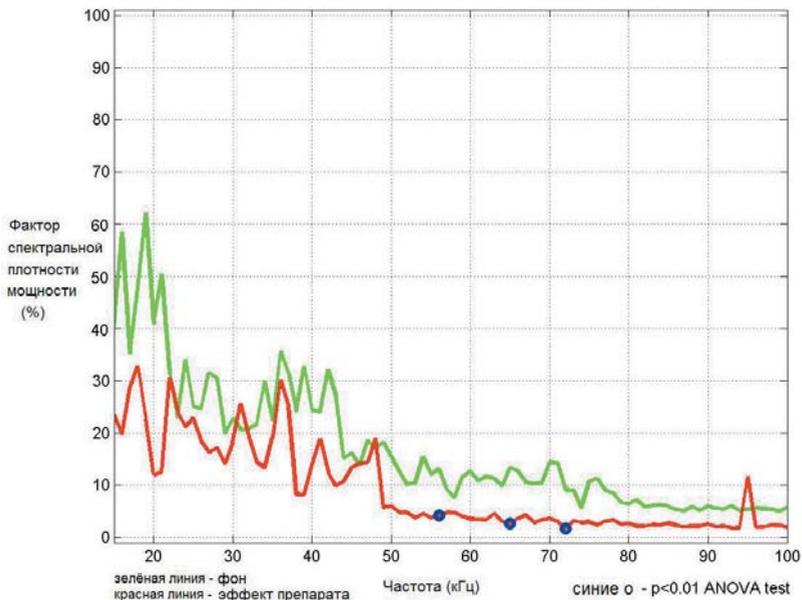


Рис. 3. УЗВ животных группы «Lar-Su».

преобладание частот «диапазона комфорта» (32-45 кГц) с максимумом в точке 37 кГц. Дополнительные пики имеются в «диапазоне тревоги» (20-30 кГц), однако их мощность почти в половину меньше, чем в преобладающем диапазоне. После курса применения Гликолакта картина УЗВ, в целом, аналогична полученной в фоновых измерениях. Наибольшая спектральная мощность отмечается в «диапазоне комфорта» (33-48 кГц, с пиком в точке 42 кГц), также имеются дополнительные пики в «диапазоне тревоги», однако их мощность ещё ниже, чем в фоне. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемое средство поддерживает положительное эмоциональное состояние крыс на достаточно высоком уровне комфорта и даже несколько снижает тревожность и напряженность, обладает слабым седативным эффектом (за счет присутствия в составе аминокислоты глицина) [12].

Результаты фоновых измерений УЗВ опытной группы животных, на которых тестировалась пищевая добавка Lar-Su (рис. 3), имеют достаточно сложную интерпретацию. В психоэмоциональном состоянии крыс преобладают признаки тревоги и беспокойства, на что указывает преобладание частот в области 20 кГц. Мощность ультразвука в «диапазоне комфорта» на 20-30% ниже.

Однако после окончания курса применения Lar-Su график несколько выравнивается, мощность УЗВ в диапазонах «тревоги» и «комфорта» практически одинакова. Наблюдаемый эффект указывает на позитивное влияние исследуемого средства, применение которого, по всей видимости, способствует нормализации психоэмоционального состояния

крыс (предположительно, за счет присутствия в составе янтарной кислоты [13], являющейся непосредственным и очень важным участником энергетического обмена в организме, улучшающей самочувствие и снижающей ощущение усталости и недомогания), имеет достаточно выраженное седативное действие.

Выводы

1. Курсовое потребление (в течение месяца) пищевых добавок на основе пребиотиков способствует нормализации психоэмоционального состояния крыс, поддержанию его на достаточно высоком уровне комфорта и оказывает седативный эффект, что отражается в ультразвуковой вокализации животных.

2. Пищевые биологически активные добавки на основе лактулозы, янтарной и аминокислот не изменяют нормальных поведенческих реакций крыс, что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния данных средств.

3. Исследование свободного поведения и вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне может служить объективным методом оценки эффектов пребиотиков, БАДов и других средств аналогичного действия.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и её информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 4-23.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
3. Фокин Ю.В. Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения

- на вокализацию крыс в ультразвуке // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 84-91.
4. **Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н.** Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 17-21.
 5. **Фокин Ю.В.** Пептидная регуляция системного поведения крыс // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 92-97.
 6. **Blanchard R.J., Blanchard D.C., Agullana R., Weiss S.M.** Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems // *Physiol. Behav.* – 1991. – № 50. – P. 967-972.
 7. **Brudzynski S.M.** Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: Acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding // *Behav. Brain Res.* – 2007. – № 182. – P. 261-273.
 8. **Burgdorf J., Knutson B., Panksepp J., Shippenberg T.S.** Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs // *Psychopharmacology.* – 2001. – № 155. – P. 35-42.
 9. **Knutson B., Burgdorf J., Panksepp J.** Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats // *Psych. Bull.* – 2002. – № 128. – P. 961-977.
 10. **Sanchez C.** Stress-induced vocalization in adult animals. A valid model of anxiety? // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – № 463(1-3). – P. 133-43.
 11. **Thompson B., Leonard K.C., Brudzynski S.M.** Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: A quantitative mapping study and acoustic analysis // *Behav. Brain Res.* – 2006. – № 168. – P. 64-73.
 12. <http://visceralperm.ru/store/glikolakt.html>, режим доступа: свободный. – Загл. с экрана. Яз. рус.
 13. <http://visceralperm.ru/store/lar-su.html>, режим доступа: свободный. – Загл. с экрана. Яз. рус.

Effect of synthetic prebiotics on the psychoemotional state of rats

Yu.V. Fokin, A.M. Zubaliy, M.K. Chugreyev, M.M. Borisova, O.V. Alimkina

Dietary supplements based on prebiotics contribute to the normalization of psychoemotional state of rats, keeping it at a high level of comfort and have a sedative effect, which is reflected in the ultrasonic vocalizations of animals. A course of consumption of dietary supplements on the basis of lactulose, succinic acid and glycine does not alter the normal behavioral responses of rats, which may testify to lack of negative influence of these means. Analysis of free behavior and ultrasonic vocalization of rats can serve as an objective method for assessing the effects of prebiotics, dietary supplements and other means of similar effect.

Key words: prebiotics, dietary supplements, psychoemotional state, behavior, ultrasonic vocalization, rats.