

Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения на вокализацию крыс в ультразвуке

Ю.В. Фокин

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Фокин Юрий Владимирович fokin-yuri@yandex.ru

Ультразвуковая вокализация крыс отражает различные психоэмоциональные состояния – как позитивные, так и негативные (тревога, страх, стресс). Преобладание спектральной мощности в диапазоне 20–30 кГц характеризует тревожность, а диапазон 35–45 кГц соответствует комфортному состоянию.

Пептиды и низкомолекулярные белки природного происхождения оказывают анксиолитическое, антифобическое, седативное действия на крыс. Эффект наблюдается уже после недели введения и сохраняется, по крайней мере, в течение 21 дня инъекций препаратов.

Предложенная модель исследования эмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуке может быть использована в доклинических испытаниях препаратов аналогичного действия.

Ключевые слова: низкомолекулярные природные белки и пептиды; ультразвуковая вокализация (УЗВ) крыс; спектральная плотность мощности УЗВ; тревожность; стресс; анксиолитический, антифобический и седативный эффекты; доклинические испытания.

В наших предыдущих работах по данной тематике мы обнаружили высокую информативность генерируемого крысами и другими лабораторными животными ультразвука в разных функциональных состояниях [11, 13, 14], а также при действии различных фармакологических препаратов, изменяющих функции основных нейромедиаторных систем мозга [6]. Однако было бы ошибочным не коснуться такой важной группы веществ как нейропептиды, которые, безусловно, должны оказывать влияние на высшую нервную систему и общее состояние животных.

Особый интерес представляет информация о том, что, по крайней мере, три важные группы лекарственных средств взаимодействуют не только с нейронами, но и с астроцитами. Известно, что к нейролептикам, барбитуратам и бензодиазепинам на клетках астроглии имеются

соответствующие рецепторы [4]. Полагают, что один из этих рецепторов обеспечивает анксиолитические эффекты бензодиазепинов, а другой — седативное действие [3, 8, 9, 10]. Резюмируя общие представления об унитропных рецепторах, следует в первую очередь выделить существование ряда рецепторных белков, с возможностью локализации рецепторов на клетках нейроглии [12]. Однако в настоящее время неизвестно, какой из типов бензодиазепиновых рецепторов связан с плазмолеммой астроцитов, и как они изменяются под влиянием нейролептиков, антидепрессантов и психостимуляторов [2].

Изучение физико-химических свойств, локализации в отделах мозга, клетках и субклеточных структурах нервной ткани, особенностей метаболизма нейроспецифических белков или сроков появления их в процессе онтогенеза позволяет прибли-

зиться к пониманию фундаментальных механизмов функционирования мозга. Установлена связь между наличием нейроспецифических белков с некоторыми патологическими состояниями организма, главным образом — с развитием нервнопсихических заболеваний [5, 1].

Цель исследования — изучить вокализацию крыс в ультразвуковом диапазоне на фоне действия пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения и по полученным данным оценить их влияние на психоэмоциональное состояние животных.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в НЦБМТ РАМН. Тестировались самки крыс линии WAG/GY в возрасте 3 мес., по 9 особей в каждой группе.

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 Руковод-

ством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [7]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ РАМН.

Дизайн и организация исследования направлены на определение УЗВ-параметров и выявление их взаимосвязи с психоэмоциональным состоянием животных. Количество объектов, принимающих участие в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемого эффекта.

Крыс содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 5 особей. Животные соответствовали категории SPF. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма — стандартный комбикорм гранулированный полнорацционный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. 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 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Исследуемые вещества — препараты пептидного происхождения и низкомолекулярные белки, полученные из мозга крупных сельскохозяйственных животных и свиней, под кодовыми названиями «К», «М» и «Р» (молекулярная масса — не выше 50 кД), использовавшиеся отдельно и в комплексе с препаратом «G» (молекулярная масса — до 5 кД). Введение всех препаратов осуществлялось инъекционно, внутривентрально, еже-

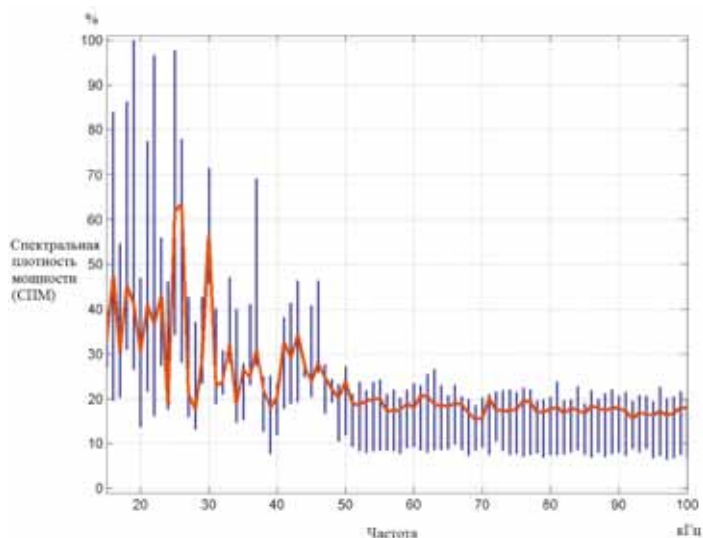


Рис. 1. УЗВ контрольной группы на 7-й день исследования. По оси абсцисс — частота (кГц), по оси ординат — спектральная плотность мощности (%). Красная кривая — медианы частот, синие линии — 95% доверительный интервал. Площадь под кривой — 1991 мм².

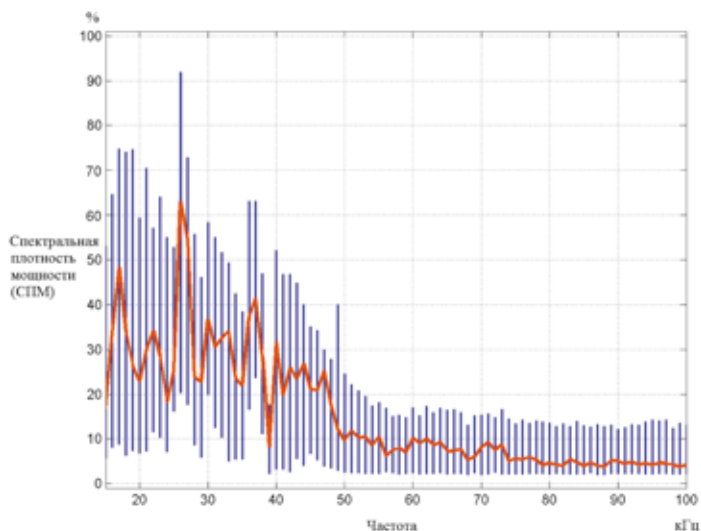


Рис. 2. УЗВ контрольной группы на 21-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 1. Площадь под кривой — 1320 мм².

дневно, в течение 21 суток. Контрольной группе животных в аналогичном режиме вводился физ. раствор.

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 30 мин) у каждого животного сначала осуществляли в состоянии по-

коя (фоновые данные), затем — через 7, 14 и 21 суток после введения препарата. 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 мощности 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 изменяли пропорционально максимуму. 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. Учитывали только достоверные изменения СПМ ($p < 0,01$).

Перед исследованиями все животные подвергались стрессовым условиям посредством прохождения теста вынужденного плавания с грузом.

Результаты и их обсуждение

Анализ УЗВ крыс в фоновых измерениях обнаружил наибольшую мощность пиков в диапазоне 20–30 кГц, с максимумом в области ~25 кГц. Аналогичной картина УЗВ была в группе контроля — до начала эксперимента, на 7-й, 14-й и 21-й день, однако с каждой неделей на-

блюдалось возрастание мощности в сторону диапазона выше 30 кГц (рис. 1 и 2).

Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее [11], и говорят о том, что частотная полоса 20–30 кГц является показателем тревожности и беспокойства у крыс, а полоса 35–45 кГц — показателем комфортного состояния. Косвенно это подтверждает и смещение наибольшей мощности в сторону диапазона от 30 кГц и выше на протяжении эксперимента, что, вероятно, связано с привыканием животных к новым условиям клетки, в которой происходило исследование.

В опытных группах картина УЗВ оказалась отличной от контроля уже на первом этапе исследования, т. е. через 7 дней после введения препаратов. Например, на рис. 3 отчётливо видно, что наибольшая мощность (~70%) приходится на диапазон 37–42 кГц. СПМ в диапазоне 20–30 кГц существенно снижена по сравнению с фоновыми данными (почти на 30%).

Таким образом, снижение СПМ в «диапазоне тревоги» и повышение её в «диапазоне комфорта» позволяет судить о том, что данный препарат обладает анксиолитическим, антифобическим действием на крыс.

Довольно схожая картина УЗВ наблюдалась на данном этапе исследования в группе препарата «Р», вводимого в комплексе с «G» (рис. 4).

Из графика видно, что наибольшая мощность УЗВ также наблюдается в «диапазоне покоя» (на частоте около 33 кГц), а в «диапазоне тревоги» СПМ достоверно снижена почти на 50% по сравнению с фоновыми данными. В целом, действие препарата на данном этапе характеризует значительное снижение спектральной мощности по отношению к фону на всём анализируемом промежут-

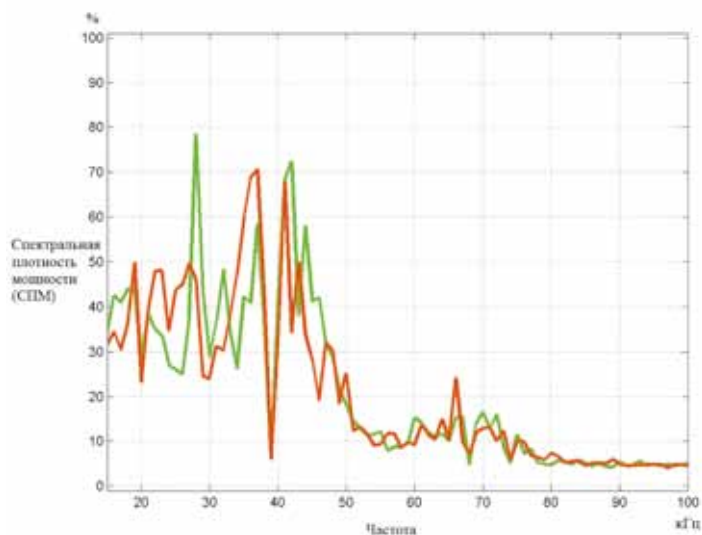


Рис. 3. УЗВ группы препарата «Р» на 7-й день исследования. По оси абсцисс — частота (кГц), по оси ординат — спектральная плотность мощности (%). Зелёная кривая — медианы частот в фоновых измерениях, красная кривая — медианы частот в опытной группе.

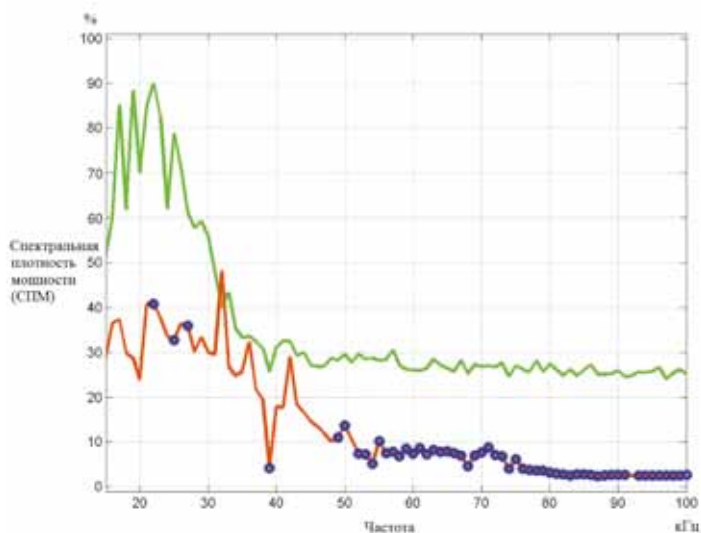


Рис. 4. УЗВ группы «Р+G» на 7-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 3. Синие кружочки — $p < 0,01$ (ANOVA).

ке (в диапазоне 50–100 кГц — разница достоверна). Вероятнее всего, данный эффект связан с расслаблением голосовых связок и миорелаксацией, что позволяет сделать вывод об успокаивающем, седативном действии комплекса «Р+G».

Аналогичные графики наблюдались в

исследовании УЗВ на 7-й день эксперимента и в остальных группах препаратов.

Исследование вокализации на 14-й день эксперимента явило, в целом, схожие, но более ярко выраженные результаты. Например, из рис. 5 видно, что основной, «главный» пик мощности (100%)

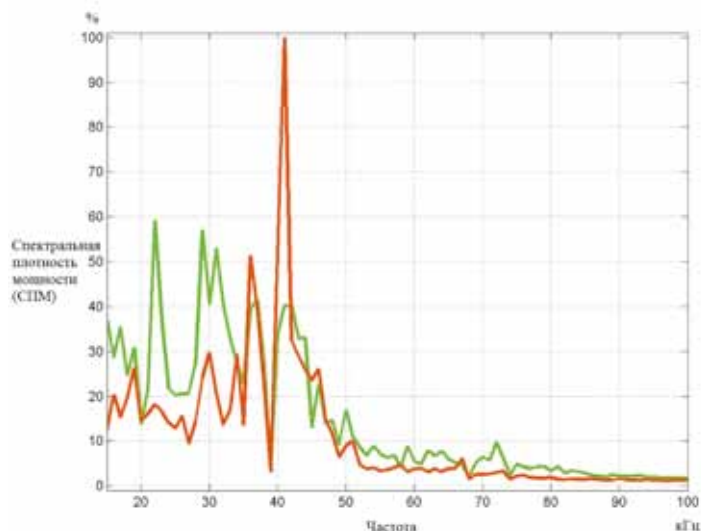


Рис. 5. УЗВ группы «М» на 14-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 3.

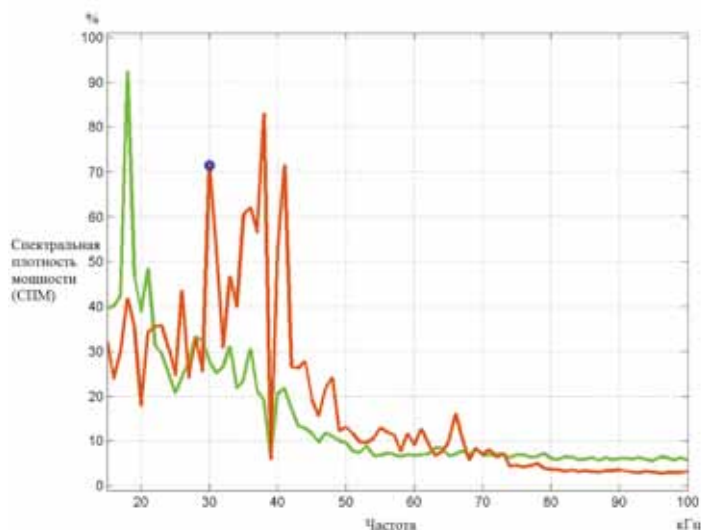


Рис. 6. УЗВ группы «K+G» на 21-й день исследования. Все обозначения — как на рис. 3. Синие кружочки — $p < 0,01$ (ANOVA).

приходится на частоту ~ 41 кГц, а в диапазоне 20–30 кГц СПМ снижена по сравнению с фоном приблизительно на 40%.

Т.е. по истечении 14 дней введения данного препарата у крыс наблюдается анксиолитический, антифобический и частично седативный эффект. Схожая

картина УЗВ на данном этапе исследования наблюдалась и в остальных группах препаратов.

По истечении курса введения тестируемых веществ (на 21-й день эксперимента) было сделано заключительное исследование УЗВ, отразившее стабиль-

ность наблюдаемой тенденции. В доказательство этому приведён рис. 6.

Из рисунка видно, что основная мощность издаваемых сигналов приходится на диапазон 30–42 кГц, т.е. отражает позитивное, комфортное состояние животных. Следовательно, данный комплекс анализируемых препаратов на этом этапе исследования по-прежнему характеризуется антитревожным, противострессорным действием. Такое заключение применимо и ко всем остальным используемым в эксперименте фармакологическим веществам.

Выводы

1. Настоящей работой подтверждено, что УЗВ крыс отражает различные психоэмоциональные состояния — как отрицательные (тревога, страх, стресс), так и положительные (комфорт, спокойное бодрствование). Показателем тревожности является преобладание спектральной мощности в диапазоне 20–30 кГц, а показателем комфорта — диапазон около 35–45 кГц.

2. Пептиды и низкомолекулярные белки природного происхождения способны оказывать позитивное (анксиолитическое, антифобическое, седативное) действие на крыс, которое наблюдается уже после недели введения и сохраняется, по крайней мере, в течение 21 дня инъекций препаратов. Пик указанного действия приходится, вероятнее всего, на 14-е сутки курса введения.

3. Предложенная модель исследования эмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуке может быть использована в доклинических испытаниях препаратов аналогичного действия.

Список литературы

1. Биохимия мозга: Учеб. пособие / Под ред. **И.П. Ашмарина, П.В. Стукалова, Н.Д. Ещенко**. — СПб.: Издательство С.-Петербургского университета. 1999. 57 с.
2. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фарматоксикологии. М.: Изд-во ВПК. 2007. С. 249–250.
3. **Каркищенко Н.Н., Омельченко В.П.** Катехоламинергическая регуляция экспрессивного поведения // Катехоламинергические нейроны. М. Наука. 1979. 94 с.
4. **Каркищенко Н.Н., Омельченко В.П.** Моноаминергические механизмы интрацентральных процессов интеграции // Катехоламинергические нейроны. М. Наука. 1979. 75 с.
5. **Каркищенко Н.Н.** Психофармакологическое исследование некоторых элементов поведения и памяти животных и человека // Память и следовые процессы. Пущино. 1979. 71 с.
6. **Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Сахаров Д.С., Алимкина О.В.** Роль нейромедиаторных систем мозга в генерации ультразвуковой вокализации и её корреляции с поведением животных // Биомедицина. № 4. 2011. С. 8–18.
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. **Каркищенко Н.Н.** Ультраструктурные изменения головного мозга под действием синтетических аналогов энкефалинов // Сб.: «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии». Томск. 1985. 62 с.

9. Каркищенко Н.Н., Солодилов В.В., Бардахчян Э.А. Ультраструктурные основы биологического действия синтетических аналогов энкефалинов. Сообщение I. Роль окаймлённых везикул // Известия СКНЦ ВШ, Естественные науки. 1988. № 2. 122 с.
10. Каркищенко Н.Н., Солодилов В.В., Бардахчян Э.А. Ультраструктурные основы биологического действия синтетических аналогов энкефалинов. Сообщение II. Роль субповерхностных цистерн // Известия СКНЦ ВШ, Естественные науки. 1988. № 2. 201 с.
11. 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.
12. Каркищенко Н.Н., Макляков Ю.С., Солодилов В.В., Спиглазов В.И. Фармакологический скрининг биологически активных соединений пептидной природы // Сб.: «Проблемы клинич. фармакологии». Ростов-н-Д. 1981. 9 с.
13. 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.
14. Фокин Ю.В., Сахаров Д.С. Сравнительная характеристика и возможность использования наркотизирующих препаратов Золетил 100 и диэтиловый эфир при проведении операция по вживлению ЭЭГ-электродов на крысах // Биомедицина. 2011. № 1. С. 84–89.

Influence of peptides and low-molecular proteins of a natural origin on vocalization of rats in ultrasound

Yu.V. Fokin

Ultrasonic vocalization of rats reflects various psychoemotional conditions — both positive, and negative (alarm, fear, a stress). Prevalence of spectral power in a range of 20–30 kHz characterizes uneasiness, and the range of 35–45 kHz corresponds to a comfortable condition.

Peptides and low-molecular proteins of a natural origin render anxiolitical, antiphobical, sedative actions on rats. The effect is observed after a week of introduction and remains, at least, within 21 days of injections of preparations.

The offered model of research of an emotional condition on vocalization of rats in ultrasound can be used in nonclinical tests of preparations of similar action.

Key words: low-molecular natural proteins and peptides; ultrasonic vocalization (USV) of rats; spectral power density of USV; uneasiness; stress; anxiolitical, antiphobical and sedative effects; nonclinical tests.