

всего, в объективизации и визуализации регистрируемых эффектов, получении дополнительной информации, сравнении и корреляции с биохимическими параметрами, исключении субъективных и неточных методов измерений, применяющихся в других методах. Конкретные данные по действию нейрорепродуктивных препаратов, регуляторных пептидов и средств, повышающих физическую и психоэмоциональную работоспособность, на основе описанной модели, будут приведены нами в следующих публикациях.

Список литературы

1. Биркгоф Г. Гидродинамика. Методы. Факты. Подobie. – Гос. изд-во иностранной литературы. 1963. 246 с.
2. 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. № 4. 2012 (в печати).
3. Каркищенко Н.Н. Фармакология

процессов адаптации и переносимости предельных нагрузок в спорте и режимах работы «до отказа»: второй тайм для дженериков // Биомедицина. № 4. 2010. С. 6-23.

4. Ландырь А.П., Ачкасов Е.Е. Мониторинг сердечной деятельности в управлении тренировочным процессом в физической культуре и спорте. – М.: Триада-Х, 2011. 176 с.

5. Метаболизм в процессе физической деятельности / под ред. М. Харгривса. – Киев: Олимпийская литература. 1998. 286 с.

6. Михайлов С.С. Спортивная биохимия. – М.: Советский спорт, 2010, 348 с.

7. Основы гидродинамики : учеб. пособие / С. Д. Чижиумов. – Комсомольск-на-Амуре : ГОУВПО «КНАГТУ». 2007. 106 с.

8. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль–2С. 2010. 358 с.

9. Солвей Дж. Г. Наглядная медицинская биохимия. – М.: ГЭОТАР-Медиа.

Hydrokinesiodynamic model for the assessment of endurance and efficiency of laboratory animals

N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko

Hydrokinesiodynamic model refers to hydrochannels with adjustable shock fluid and can be used for scientific purposes in the study of efficiency and endurance of the experimental animals (rats, dogs, etc.), as well as for the evaluation of the medicinal and food resources for these processes. Hydrochannel is equipped with a house-bait, located at the side of the feed flow of the liquid. Hydrochannel is equipped with strapping scale and special sensors of movement. The system provides for establishing and maintaining a constant temperature of the fluid, equipped with video cameras support, and house-bait - capacitive sensor connected to the shutdown system pumping fluid. Automatic control is carried out by a computer, on which closed all sensor systems. Model includes mathematical and hydrodynamic rationale clear quantitative assessment of the efficiency and endurance of the animals.

Key words: hidrokinesiodynamic model, efficiency, endurance, laboratory animals.



РАБОТОСПОСОБНОСТЬ И ВЫНОСЛИВОСТЬ В СПОРТИВНОЙ БИОМЕДИЦИНЕ

Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине

В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, Л.Х. Казакова, О.В. Алимкина, Н.В. Касинская

ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

Контактная информация: д.м.н., проф. Каркищенко Владислав Николаевич, scbmt@yandex.ru

Описаны методики, применяемые в доклинических исследованиях при разработке фармакологических субстанций для различных целей спортивной медицины. Рассмотрены основные моторные, сенсорные и когнитивные функции, а также выносливость и работоспособность.

Ключевые слова: лабораторные животные, методология, спортивная медицина, доклинические исследования.

Спорт высших достижений, как правило, сопряжен с экстремальными физическими и эмоциональными нагрузками, предъявляющими повышенные требования к здоровью. Как отмечали еще античные «отцы-основатели» медицины, организм регулярно и усиленно тренирующегося спортсмена отличается от обычного организма не в лучшую сторону. Еще Гиппократ (460-477 гг. до н.э.) писал: «Организм атлета нельзя считать «естественным», а Клавдий Гален (131-200 гг.), много лет занимавшийся наблюдением и лечением профессиональных спортсменов того времени – гладиаторов, еще более расширил это положение: «Жизнь атлета полностью противоположна тому, что предписывает гигиена, я считаю, что их образ жизни более способствует болезням, чем здоровью».

Спортивная фармакология — это, прежде всего, фармакология здорового человека, позволяющая расширить возможности приспособления организма к чрезвычайно большим нагрузкам спорта высших достижений, которые граничат с возможностями конкретного спортсмена. Рациональное применение препаратов при экстремальных тренировочных и соревновательных нагрузках способствует достижению собственного рекордного результата, поэтому фармакология спорта изучает влияние препаратов, которые повышают физическую работоспособность, психическую устойчивость и способность организма к быстрому восстановлению ресурсов [20].

Первым этапом разработки любой фармакологической субстанции являются доклинические исследования. Важ-

ной их составляющей является изучение влияния веществ-агентов на системы органов и организм в целом. По причине отсутствия единой регламентированной методики для доклинической оценки выносливости, работоспособности, стрессоустойчивости и проч. показателей психофизического и эмоционального состояния животных в настоящее время используется вся батарея стандартных тестов для поведенческого фенотипирования – SHIRPA-протокол [1, 6, 8, 13]. Он позволяет выявить нарушения в нервно-мышечной, сенсорной и вегетативной системах организма. Некоторые методики этого протокола пригодны для использования в доклинических исследованиях.

Для изучения веществ, способствующих повышению работоспособности, выносливости и др. качеств, необходимых для достижения высоких спортивных результатов, в доклинических исследованиях имеет смысл обращать внимание на моторные, сенсорные и когнитивные функции лабораторных животных. Взаимосвязь между этими функциями и работоспособностью представлена на рис. 1.

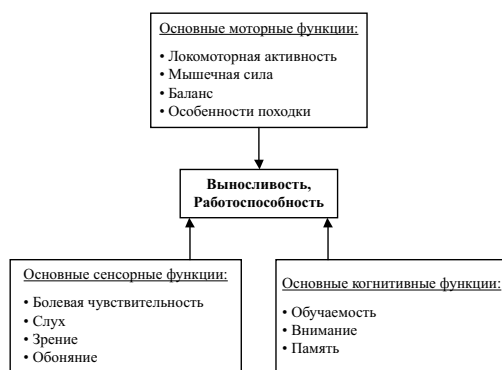


Рис. 1. Взаимосвязь между функциями организма.

Методики, рекомендуемые для оценки локомоторной активности

«Открытое поле» (*open field*). Этот тест был разработан американским исследователем Холлом [12] для оценки общей и исследовательской активности. Классическая установка представляет собой арену, поделенную на одинаковые квадраты. В центр помещается животное, регистрируется число пересеченных квадратов, то есть пройденное за определенное время (обычно 10 мин) расстояние.

Современные установки снабжаются фотоэлементами либо датчиками вибрации, и процессорами, позволяющими фиксировать различные виды локомоторной активности (базовую, исследовательскую, груминг, вертикальную активность, стереотипные движения), фиксировать траекторию движения, рассчитывать соотношения нахождения животного в центре и на периферии поля. Данные преобразовываются в цифровой формат.

Ротарод (*rotarode*) (рис. 2). Прибор, разработанный в 50-х г. XX века [9]. Предназначен для оценки чувства равновесия, способности балансировать на вращающемся барабане. Под барабаном расположена решетка, на которую подается напряжение. Увеличение скорости



Рис. 2. Тест на ротароде.

вращения провоцирует более быстрое падение с установки. Обычно регистрируется максимальная скорость вращения барабана, при которой животное может на нем удержаться в течение заданного времени (как правило, не более 30 секунд), или время падения с ротарода на разных скоростях.

«Прогулка по приподнятой перекладине» (*raised-beam walking*). Используется для оценки равновесия. Система представляет собой приподнятую перекладину разной конфигурации и толщины и закрытую безопасную платформу. Животное обучают проходить по перекладине. Фиксируется время прохода, соскальзывания лап, падения. При нарушении равновесия удлиняется время латентного периода перехода за счет того, что животное цепко держится лапами за перекладину [11].

Анализ походки по следам (*gait analysis system*). Тест для оценки координации животного. Установка представляет собой коридор, по которому животное обучается проходить. Регистрируют время и скорость прохода, продолжительность касания пола каждой частью тела животного (каждая нога, хвост, живот, нос). В норме центр следа стопы падает на центр предшествующего следа кисти. При нарушении координации постановка задней лапы изменяется.

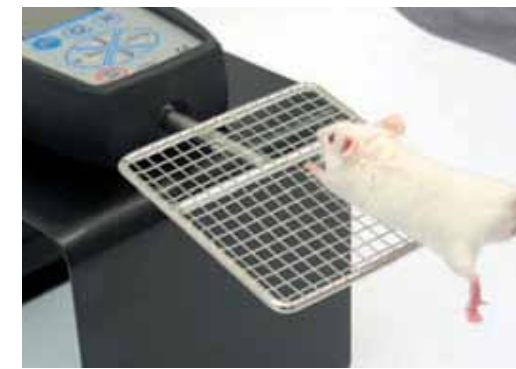


Рис. 3. Тест на силу хватки (*grip strength system*).

Тест на силу хватки (*grip strength system*). Прибор для оценки мышечной силы сжатия передних и/или задних лап (рис. 3). Состоит из решеток, подсоединенных к манометрам. Измеряется усилие, необходимое для того, чтобы животное разжало пальцы кистей или стоп. Современные установки позволяют автоматически регистрировать все необходимые параметры.

Методики, рекомендуемые для оценки сенсорных функций

Болевая чувствительность. Различают острую или постоянную боль. Самая распространенная модель постоянной боли – подкожная инъекция формалина в подошву лапы животного. Для моделирования острой боли используют высокую или низкую температуру в установках, перечисленных ниже. Оценивать с помощью данных тестов выносливость и работоспособность невозможно, поскольку силы организма здесь, в первую очередь, направлены на преодаление болевого синдрома.

«Горячая площадка» (*hot plate*). Оценивается пороговая чувствительность острой боли. Животное помещают на нагретую поверхность (55°C для мышей, 52,5°C для крыс). Фиксируется время, когда животное начинает облизывать одну из лап.

«Отдергивание хвоста» (*tail flick*). Прибор фокусирует обжигающий луч на хвосте животного. Фиксируется время отдергивания хвоста.

Слуховая чувствительность. Лабораторные животные слышат в диапазоне частот, отличном от человека (80-100 кГц для мышей). Грызуны более чувствительны к внезапным звукам, шумам. Наиболее точно слуховой порог определяется электрофизиологическим методом. Хорошее разрешение

имеет метод, основанный на рефлекторном вздрагивании животного при неожиданном звуке.

«Стартл-рефлекс» (*startle reflex system*). Методика является основной при изучении многих параметров аудиочувствительности. Современные установки создают комбинации различных шумов. Фиксируется вздрагивание животных на новые резкие аудиосигналы. При одновременном наблюдении за несколькими животными важно изолировать их друг от друга.

Зрительная чувствительность. Зрение лабораторных животных отличается от зрения человека. Грызуны являются ночными животными и инстинктивно избегают яркого света. Существуют линейные различия в остроте зрения [16]. В настоящее время нет единого протокола тестирования зрения у животных. Наиболее точными считаются неповеденческие методы – гистология сетчатки, электроретинограмма и метод вызванных корковых потенциалов. Однако существуют и этологические тесты для оценки зрения [1].

Visual cliff apparatus. Используется для оценки остроты зрения. Двухуровневая установка имеет уступ, на который помещается животное. Обрыв закрыт прозрачным стеклом. Особи с нормальным зрением останавливаются перед краем и исследуют его [7].

Virtual optomotor system. Метод основан на оптомоторном рефлексе: животное следит (поворачивает голову) за движущимся предметом. В тесте животному предлагается следить за бегущими на мониторе серо-белыми полосами, контрастность которых снижается в процессе тестирования [14].

Startle reflex system. У животного вырабатывают условный рефлекс на свет

или на предмет как на отрицательный стимул. Если животное не способно его видеть, рефлекс не выработается.

Обонятельная чувствительность. Исследование обонятельной перцепции основано на поиске и/или обнюхивании аттрактивной приманки (пища, феромоны), помещенной в клетку. Учитывается время обнаружения и изучения приманки [5, 10].

Методики, рекомендуемые для оценки выносливости и работоспособности

Выносливость – способность совершать работу заданного характера в течение возможно более длительного времени.

Работоспособность – это свойство организма в течение заданного времени и с определенной эффективностью выполнять максимально возможное количество работы [19].

Для оценки выносливости и работоспособности животных в доклинических исследованиях обычно используют беговую дорожку (тредбан). Для изучения выносливости и работоспособности в условиях повышенного уровня стресса используется вынужденное плавание с грузом. Необходимо также контролировать параметры дыхания и сердцебиения животных. Для мелких лабораторных животных (крысы, мыши) рекомендуется использовать системы дистанционного учета физиологических параметров. Для крупных лабораторных животных, при условии приучения к оборудованию, можно использовать проводные системы контроля.

Беговая дорожка (тредбан). Устройство представляет собой движущуюся ленту, оборудованную электродами, которые являются отрицательным подкреплением и стимулируют животное двигаться по ленте. На современных тредбанах воз-

можны регулировка угла наклона дорожки, скорости движения ленты, силы тока, подаваемого на электроды, времени бега. В НЦБМТ РАМН разработан тредбан для крупных лабораторных животных (мини-свиней).

Вынужденное плавание. Классическая методика теста Порсолта (вынужденного плавания) предназначена для оценки депрессивного поведения (в частности, «отчаяния»), однако после модификации, разработанной в НЦБМТ РАМН, ее можно рекомендовать для оценки выносливости и работоспособности в условиях стресса. Для этого используется груз (оптимально, по нашим расчетам, – 10% от массы тела животного), который прикрепляется к задним лапам животного.

Установка состоит из стеклянных емкостей для воды, круглых или квадратных в сечении (рис. 4). Высота и диаметр зависит от вида животного (для крыс, к примеру, $h=40$ см, $d=18$ см). Температура воды приближена к температуре тела животных. После прикрепления груза животное аккуратно опускают в воду и засекают время до полного отказа от плавания [3, 4, 16].



Рис. 4. Вынужденное плавание.

Методики, рекомендуемые для оценки когнитивных функций

Когнитивные (познавательные) процессы – виды поведения животных и человека, в основе которых лежит не условнорефлекторный ответ на воздействие внешних стимулов, а формирование мысленных представлений о событиях и связях между ними [2]. Основные когнитивные функции, важные в физиологии и медицине спорта – это различные виды памяти, способность к обучению и внимание.

Память и способность к обучению тесно связаны между собой, поэтому для их изучения используются схожие методики – в основном, различные лабиринты.

Метод радиального лабиринта. Используется специальное устройство – 6- или 12-лучевой радиальный лабиринт (рис. 5). Задача состоит в выборе животным стратегии исследования и нахождения пищи с минимумом усилий. Методика позволяет отдельно изучать кратковременную и долговременную память и скорость научения. Используется для мышей и крыс. Необходимо предварительное обучение животных.



Рис. 5. Радиальный лабиринт.

Метод Т-образного лабиринта. Основная задача животного – найти приманку. Учитывается количество ошибок, возвратов, посещений рукавов с приманкой. Используется для изучения памяти.

Метод Скиннера. Данная методика используется для изучения оперантного научения. Животное помещают в специальный ящик, оборудованный рычагом и устройством для подачи корма либо открывания двери. Отмечают время, за которое животное научится пользоваться рычагом.

Особенности изучения внимания у человека требуют наличия вербального общения, в связи с чем к животным неприменимы [21]. Для изучения внимания у животных целесообразно применять методы электроэнцефалографии и вызванной поляризации [17].

Заключение

Таким образом, значение поведенческих малоинвазивных методов доклинических исследований для медицины спорта высших достижений сложно переоценить. Необходимость моделирования изменения различных параметров организма в условиях экстремальных нагрузок не вызывает сомнений как при создании стимуляторов, так и быстродействующих лекарств для спортсменов.

Список литературы

1. **Амикишиева А.В.** Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование // Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 3. С. 529-542.

2. **Зорина З.А., Полетаева И.И.** Зоопсихология. Элементарное мышление животных. – М.: Аспект Пресс. 2001. 320 с.

3. **Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В.** Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. № 1. С. 72-74.

4. **Петунов С.Г., Бобков Д.В., Лукина А.М., Нечайкина О.В.** Оценка физической работоспособности при интенсивной физической нагрузке в моделях на лабораторных животных // Медико-биологические аспекты обеспечения химической безопасности Российской Федерации. Сборник трудов Всероссийского симпозиума, посвященного 50-летию со дня основания ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России. 2012. С. 101-102.

5. **Amikishieva A.V., Semendyaeva S.N.** Effects of baclofen on anxiety, sexual motivation, and olfactory perception in male mice in different psychoemotional states // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2007. V. 37. № 9. P. 929-937.

6. **Brown R.E., Stanford L., Schellinck H.M.** Developing standardized behavioral tests for knockout and mutant mice // *ILAR J.* 2000. V. 41. P. 163-174.

7. **Crawly J.N.** Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests // *Brain Res.* 1999. V. 835. P. 18-26.

8. **Crawly J.N.** Behavioral phenotyping strategies for mutant mice // *Neuron.* 2008. V. 57. P. 809-818.

9. **Dunham N.W., Miya T.S.** A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice // *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1957. V. 46. P. 208-209.

10. **Ferkin M.H., Li H.Z.** A battery of olfactory-based screens for phenotyping the

social and sexual behaviors of mice // *Physiol. Behav.* 2005. V. 85. P. 489-499.

11. **Goldstein L.B., Davis J.N.** Beam-walking in rats: Studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury // *J. Neurosci. Methods.* 1990. V. 31. P. 101-107.

12. **Hall C.S.** Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // *J. Comp. Psychol.* 1934. V. 18. P. 385-403.

13. **Masuya H., Inoue M., Wada Yu., Shimizu A.** Implementation of the modified-SHIPRA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program // *Mammalian Genome.* 2005. V. 16. P. 829-837.

14. **Prusky G.T., Alam N.M., Beekman S., Douglas R.M.** Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a

virtual optomotor system // *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45. № 12. P. 4611-4616.

15. **Porsolt R.D., Anton G., Blavet N. et al.** Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment // *Europ. J. Pharmacol.* 1978. v. 47. p. 379-391.

16. **Voikar V.** Evaluation of methods and applications for behavioral profiling of transgenic mice. Academic dissertation. Faculty of Biosciences, University of Helsinki. 2006. 73 p.

17. <http://imp.rudn.ru/psychology/psychophysiology/6.html>

18. www.science-pribo.ru

19. http://sport-health.com.ua/read-teoriya_sporta-rabotosposobnost.html

20. <http://www.sportium.org/>

21. http://www.xliby.ru/psihologija/klinicheskaja_psihologija/p23.php

Methods of studying physiological functions of laboratory animals for preclinical researches in sports medicine

V.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, L.Kh. Kazakova, O.V. Alimkina, N.V. Kasinskaya

Describes the techniques used in preclinical researches in the development of pharmacological substances for various purposes of sports medicine. Considered the basic motor, sensory and cognitive functions as well as endurance and performance.

Key words: laboratory animals, methodology, sports medicine, preclinical researches.