

High performance liquid chromatographic determination of perchlozone in serum using mass spectrometric detection and its application in human pharmacokinetic studies

A.M. Vlasov, Y.N. Bashkatova, A.Y. Savchenko, M.R. Khaitov,
G.V. Ramenskaya

A new sensitive high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with ultraviolet and mass spectrometry detection was developed for determination of perchlozone, a new Russians antitubercular medicine, in human plasma. Perchlozone were extracted from plasma using acetonitrile and the extract was injected into a column (ZORBAX SB C18 precolumn, 5 μm , 35 mm \times 2,1 mm I.D.) for clean-up and column (ZORBAX SB C18 analytical column, 5 μm , 150 mm \times 2,1 mm I.D.) for separation. Mean absolute recoveries were 88.0 for perchlozone. Intra- and inter-day relative standard deviations were less than 9,5 and 14,2% for perchlozone, at the different concentration ranges. The validated concentration ranges of this method were 10–10000 ng/ml for mass spectrometry determination and 250–10000 ng/ml for ultraviolet detector determination. The limits of quantification were 10 ng/ml for mass spectrometry determination and 250ng/ml for ultraviolet detector determination.

Key words: perchlozone; HPLC; pharmacokinetic, mass spectrometry.

Способ моделирования синдрома хронической усталости в эксперименте

М.А. Самотруева¹, Д.Л. Теплый², Т.К. Сережникова¹, Н.Р. Кулешевская¹

¹ — Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань

² — Астраханский государственный университет, Астрахань

Контактная информация: Сережникова Татьяна Константиновна 414057 г.Астрахань, ул.Звездная, д.9, кор.1, к.28.

Предложен способ моделирования «синдрома хронической усталости» в эксперименте, включающий сочетание информационного (формирование пищедобывательного поведения в многоальтернативном лабиринте), физического (плавание с грузом 10 % от массы тела) и социального (агонистические конфронтации между особями) воздействий. Доказано, что комплекс хронических истощающих воздействий сопровождается дисбалансом нейроиммунорегуляторных механизмов, лежащих в основе формирования данного патологического состояния.

Ключевые слова: «синдром хронической усталости», информационно-физический стресс, агонистические конфронтации, нейроиммунный дисбаланс.

«Синдром хронической усталости» (СХУ) — одно из достаточно распространенных патологических состояний настоящего времени, развитие которого связано, прежде всего, с особенностями современной жизни населения крупных городов, типом жизни в развитых странах, а также чрезмерной эмоционально-

психической нагрузкой на организм. Его появление напрямую связано с резким ускорением ритма жизни и увеличением умственной и психологической нагрузки. В большинстве случаев данное заболевание поражает энергичных, ответственных и деловитых людей. Как самостоятельная нозологическая форма «синдром хронической усталости» охарактеризован в конце прошлого века, но этиология и патогенез этого процесса, несмотря на многочисленные исследования, полностью не раскрыты. За последние годы появлялось множество теорий, но все они оказались небезупречны. Поэтому и до сегодняшнего дня это заболевание называется «синдромом». Лидирующее положение имеют несколько гипотез происхождения «синдрома хронической усталости»: вирусная (вирусы Эпштейн-Барра, герпеса 1-го, 2-го и 6-го типов, цитомегаловирусы, энтеровирусы и др.); иммунная (прежде всего, цитокиновая дисрегуляция); «дрожжевая» (грибы рода *Candida* продуцируют нейротоксин, определяющий клинические проявления), генетическая (мутация гена, отвечающего за активность кортизола), «депрессивная» (хроническая усталость — вариант депрессивного состояния). «Синдром хронической усталости» является многофакторным заболеванием с преимущественным нарушением функции центральной нервной, иммунной и эндокринной систем в ответ на различные повреждающие факторы (инфекционные, стрессовые, физические и др.) [4, 6].

Известен способ моделирования СХУ путем однократного внутрибрюшинного введения животным синтетической двуцепочечной РНК — Поли И:Ц [2]. Однако, данный способ не является полноценной моделью патологии, так

как он не учитывает многих патогенетических звеньев реальной клинической ситуации, т.е. указанный способ моделирования не позволяет комплексно проанализировать специфику развития патологии. Кроме того, индукция хронической усталости введением синтетической РНК затрудняет проведение патофизиологических и патоморфологических исследований в результате неоднозначного подхода к анализу развивающихся нарушений с позиции «что является причиной нейроиммунных нарушений — инъекция РНК или формирующийся СХУ?».

Целью нашей работы явилось создание такой модели экспериментального СХУ, при которой индуктором патологии рассматривалась бы не инъекция синтетического агента, а комплекс хронических истощающих воздействий на психоэмоциональное, физическое состояние и когнитивные функции организма.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Wistar 5-7 мес. возраста массой 200-250 г. Животные получены из питомника филиала «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН. Содержание крыс осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми «Международной конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986).

Животные были разделены на 2 группы (n=10): контрольную, представленную интактными особями и опытную, которую формировали крысы с моделью СХУ.

Моделирование СХУ проводили путем сочетания информационно-физического и социального воздействий. Информационно-физическое воздействие основано на чередовании двух ви-

дов нагрузок: информационной — формирование пищедобывательного поведения в многоальтернативном лабиринте, структура которого меняется каждые 2-3 дня и физической — плавание с грузом 10 % от массы тела (температура воды 30°C, время «до предела») [1, 3]. Социальные взаимодействия формировались в результате повторного опыта побед и поражений в ежедневных конфронтациях [5]. Для этого животных помещали в экспериментальные клетки, разделенные прозрачной перегородкой с отверстиями, по одному животному в каждый отсек. Ежедневно во второй половине дня (15.00-17.00 часов) перегородку убирала на 10-15 минут, что приводило к конфронтациям. После каждой конфронтации побежденного самца помещали в незнакомую клетку с другим агрессивным самцом за перегородкой.

Ежедневно на фоне конфронтаций лабораторные животные подвергались информационному и физическому «испытаниям» (интервал между проведением поведенческого моделирования 1 час). Продолжительность воздействия 20 дней.

Оценку функционального состояния иммунной системы проводили на основе клеточной реакции гиперчувствительности замедленного типа с определением индекса реакции (ИР ГЗТ), гуморальной реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), латексного теста по изучению фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови с определением фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ). Также определяли уровень различных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови. В качестве антигенного стимула использовали эритроциты барана.

Психоэмоциональный статус и двигательная активность животных изучены

в поведенческих тестах: «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое поле» и «Порсолт».

Результаты были обработаны статистически с использованием программы «STATGRAPH» с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В условиях экспериментальной патологии у животных опытной группы выявлено изменение психоэмоционального статуса. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» снижены время пребывания в аверсивном отсеке лабиринта в 2,6 раз и исследовательская активность в 1,8 раз; увеличилось число актов кратковременного груминга в 2,9 раз ($p < 0,05$), что свидетельствует о повышенном уровне тревожности (табл. 1).

В тесте «Порсолт» отмечено достоверное увеличение суммарного времени иммобильности (на 64 %) и снижение латентного периода до первого «зависания» (на 22 %) в сравнении с контролем ($p < 0,05$) (табл. 2). Результаты свидетельствуют о формировании депрессивноподобного состояния у животных. Изучение поведения животных в тесте «Открытое поле» показало снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности более чем на 40 %, а также исследовательской реакции в 2,8 раз ($p < 0,05$), что также говорит о повышении уровня тревожности (табл. 3). В группе животных с моделью СХУ формировался иммунный дисбаланс. Так, индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа и титр антител в реакции пассивной гемагглютинации были достоверно ниже в сравнении с интактными особями в 1,9 и 3,9 раз соответственно ($p < 0,05$) (табл. 4). Оценка фагоцитарной

Таблица 1

**Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости» в тесте
«Приподнятый крестообразный лабиринт»**

Поведенческие показатели	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
Время, проведенное на открытых рукавах, M ± m, сек.	9,8 ± 1,4	3,8 ± 0,6*
Стойки, M ± m	8,1 ± 0,5	4,4 ± 0,1*
Кратковременные акты груминга, M ± m	0,9 ± 0,1	2,6 ± 0,3*

* — p<0,05 в сравнении с контролем

Таблица 2

**Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости»
в тесте «Порсолт»**

Поведенческие показатели	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
Иммобильность, M ± m, сек.	53,7 ± 4,6	88,1 ± 7,3*
Латентный период до первой иммобильности, M ± m, сек.	74,9 ± 2,1	58,3 ± 4,4*

* – p<0,05 в сравнении с контролем

Таблица 3

**Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости»
в тесте «Открытое поле»**

Поведенческие показатели	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
Горизонтальная двигательная активность, M ± m	30 ± 3,0	17 ± 1,7*
Вертикальная двигательная активность, M ± m	6,1 ± 0,5	3,4 ± 0,1*
Исследовательские «заглядывания» в «норки», M ± m	9,1 ± 0,1	3,3 ± 0,3*

* – p<0,05 в сравнении с контролем

активности нейтрофилов периферической крови показала активацию процессов неспецифической резистентности на фоне экспериментальной патологии ($p < 0,05$). Неоднозначным было измене-

ние уровня различных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови: отмечалось снижение IgM на 30,8 % и увеличение IgG более чем на 20 % в сравнении с контролем ($p < 0,05$) (табл. 4).

Таблица 4

Изменение поведения крыс с «синдромом хронической усталости» в тесте «Открытое поле»

Группы животных / Показатели иммунного ответа	Контроль, n = 10	«Синдром хронической усталости», n = 10
ИР ГЗТ, М ± m, %	13,3 ± 2,3	6,9 ± 1,1*
Титр антител в РПГА, М ± m, Ig	1,32 ± 0,16	0,34 ± 0,06*
ФИ, М ± m, %	65,5 ± 2,5	77,5 ± 1,4*
ФЧ, М ± m,	5,2 ± 0,26	5,5 ± 0,21
Иммуноглобулин G, М ± m, г/л	6,37 ± 0,06	7,81 ± 0,01*
Иммуноглобулин M, М ± m, г/л	0,52 ± 0,01	0,36 ± 0,06*

* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Выводы

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при моделировании «синдрома хронической усталости» путем сочетания информационно-физического и социального воздействий отмечаются нарушения функциональной активности нервной и иммунной систем, что является ведущим признаком при формировании данного патологического состояния. Предложенная модель может найти применение в экспериментальной патофизиологии, патоморфологии и фармакотерапии «синдрома хронической усталости».

Список литературы

1. *Никольская К. А.* Эволюционные аспекты интеллекта позвоночных — может ли интеллект быть фактором, ограничивающим выбор среды обитания? // *Электрн. научн. журнал «Исследовано в России»*, 143/050630. — 2005. — с. 1442-1500.
2. *Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Корнева Е.А.* Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при синдроме хронической усталости в эксперименте // *Росс. физиол. Журнал*. 2009. — Т.95. — № 12. — с. 1324-1335.
3. *Усик С.В., Ленкова Н.В.* Биоэнергетическая характеристика физических

нагрузок различного характера // Физиол. Журнал СССР. — 1981. — № 9. — с. 1370-1376.

4. *Fukuda K., Straus S.E., Hickie I. et al.* The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study // *Ann. Intern. Med.* — 1994. — Vol. 121. — p. 953-959.

5. *Kudryavtseva N.N.* Social model of depression in mice of C57BL/6J strain // *N.N. Kudryavtseva, I.V. Bakshtanovskaya, L.A. Koryakina* //

Pharmacol. Biochem. Behav. — 1991. — Vol. 38. — № 2. — p. 315-320.

6. *Katafuchi T., Kondo T., Yasaka T., Kubo K., Take S.* Prolonged effects of polyriboinosinic : polyribocytidylic acid on spontaneous running wheel activity and brain interferon alfa mRNA in rats: a model for immunologically induced fatigue // *Neuroscience.* — 2003. — Vol. 120. — p. 837-845.

The way modeling of a syndrome of chronic weariness in experiment

M.A. Samotrueva, D.L. Tepliy, T.K. Seregnikova, N.R. Kuleshovskaya

The way of modelling of «chronic fatigue syndrome» in the experiment, including a combination information (formation of food-procuring behaviour in a multialternative labyrinth), physical (swimming with the load of 10% from the total body weight) and social (agonistic is offered confrontation between males) influences. It is proved that the complex of chronic exhausting influences is accompanied by a disbalance of neuroimmunoregulation mechanisms underlying formation of the given pathological condition.

Key words: «chronic fatigue syndrome», information-physical stress, agonistic confrontations, neuroimmune disbalance.