

MEDICINE  
ISSN 2074-5982

2017

3

# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
ФМБА РОССИИ

---

---

В Санкт-Петербургском издательстве «Политехника-принт» вышла монография «**Функциональное питание человека при экстремальных воздействиях**», авторы: **Новиков В. С., Каркищенко В. Н., Шустов Е. Б.**

В ней проанализированы современные подходы к обоснованию функционального питания людей, жизнь и профессиональная деятельность которых проходит в экстремальных и особых условиях.

- Впервые представлены результаты доклинических и клинических исследований эффективности специализированных продуктов питания человека в условиях Арктики, высокогорья, пустыни. Часть данных исследований выполнялись в НЦБМТ ФМБА России.
- Обосновано специализированное эргогенное функциональное питание для спортсменов, военнослужащих и спасателей МЧС.
- Разработаны принципы и виды функционального питания человека при последствиях экологических катастроф и в условиях вредных производств.
- Предложен модульный принцип современного функционального питания.

Издание предназначено для специалистов спортивной, военной, морской и авиакосмической, экстремальной и восстановительной медицины.

С электронной версией монографии можно ознакомиться по адресу <http://scbmt.ru/index.php/ourpub>



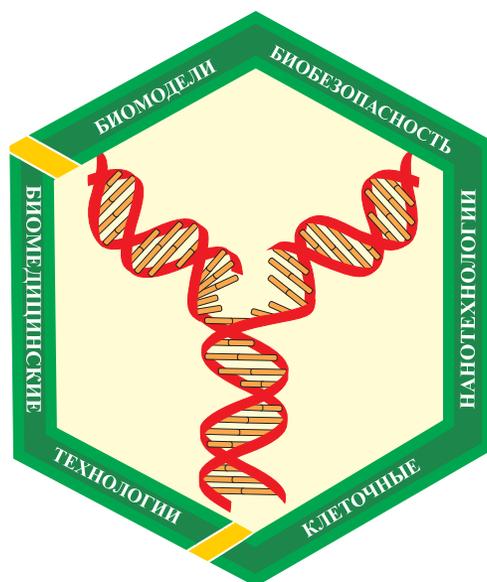
Научный журнал.

Основан в 2005 году ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 09.06.2005 г.

Подписной индекс 57995 в Каталоге «Издание органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и кандидата наук (редакция – март 2017 года)



### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор академик **Н.Н. Каркищенко**

Зам. гл. редактора **В.Н. Каркищенко**

Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

**Г.Д. Капанадзе**, Светлые горы МО, **С.Л. Люблинский**, Обнинск, Калужская область, **Ю.С. Макляков**, Ростов-на-Дону, **Е.Л. Матвеев**, Светлые горы МО, **С.Ю. Пчелинцев**, Любучаны МО, **Г.В. Раменская**, Москва, **А.О. Ревякин**, Светлые горы МО, **В.П. Рябых**, Боровск МО, **Х.Х. Семенов**, Светлые горы МО, **Д.А. Сычев**, Москва, **Ю.В. Фокин**, Светлые горы МО, **Д.Б. Чайванов**, Москва, **Е.В. Ших**, Москва, **Е.Б. Шустов**, Санкт-Петербург

### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**К.В. Анохин**, Москва, **Е.Е. Ачкасов**, Москва, **В.М. Баранов**, Москва, **И.А. Берзин**, Москва, **А.Т. Быков**, Сочи, **В. Влахов**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск, **А.М. Дыгай**, Томск, **А.Л. Зефиров**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан, **В.Г. Кукес**, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **А.И. Мирошников**, Пушкино МО, **А.Н. Мурашёв**, Пушкино МО, **С.В. Оковитый**, Санкт-Петербург, **В.П. Фисенко**, Москва, **Д.Ф. Хритинин**, Москва, **Б.Д. Цыганков**, Москва, **В.И. Цысь**, Смоленск

### Адрес редакции:

143442, Московская область,  
Красногорский р-н,  
пос. Светлые горы, владение 1  
Тел.: 8 (495) 561-52-64

Охраняется Законом Российской Федерации № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 г. и иными нормативно-правовыми актами. Воспроизведение всего издания, а равно его части (частей) без письменного разрешения издателя влечет ответственность в порядке, предусмотренном действующим законодательством.

Отпечатано в типографии «Айсинг»  
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18.  
Подписано в печать 22.09.2017  
Тираж 3 000 экз.

## Содержание

### НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

**Е.Б. Шустов, Г.Д. Капаназе, Ю.В. Фокин, Е.Л. Матвеевко**  
Методические особенности биомедицинских исследований влияния фармакологических средств на устойчивость организма к острой общей гипотермии ..... 4

**Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, В.Н. Каркищенко, Л.А. Таболякова, М.И. Мокроусов, О.В. Алимкина**  
Конвергентная валидация интрацентральных отношений головного мозга животных ..... 16

### РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

**Н.И. Бурцева, М.А. Тюнин, А.С. Гоголевский, С.В. Чепур**  
Оценка риска формирования промежуточного синдрома при отравлениях фосфорорганическими соединениями с использованием молекулярного докинга ..... 40

**Я.В. Горина, Ю.К. Комлева, О.Л. Лопатина, А.И. Черных, А.Б. Салмина**  
Поведенческий фенотипический анализ животных с генетической моделью болезни Альцгеймера ..... 47

### МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**П.П. Золин, В.Д. Конвай**  
Измерение включения изотопной метки в выдыхаемый  $CO_2$  ..... 60

**Г.Д. Капаназе, А.О. Ревякин, Е.Б. Шустов**  
Методика оценки системы детоксикации ксенобиотиков у лабораторных животных ..... 71

**Л.А. Шарифутдинова, М.В. Базунова, Е.И. Кулиш, Н.Н. Курчатова, В.Г. Шамратова, З.Р. Хисматуллина, М.Р. Даминов**  
Влияние ультрадисперсных систем на основе комплексов сукцинамида хитозана с коллоидными частицами йодида серебра на иммунологическую реактивность ..... 82

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

**Н.В. Станкова, М.А. Савина, Г.Д. Капаназе**  
Формирование новых линий светлогорских мини-свиней ..... 95

### ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**И.А. Титович, С.В. Радько, Д.С. Лисицкий, С.В. Оковитый, В.Ц. Болотова, А.В. Бельская, М.В. Михайлова, Ю.И. Сысоев**  
Изучение влияния производного аминокэтанола на когнитивные функции лабораторных животных ..... 102

## Content

### NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

**E.B. Shustov, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, E.L. Matveyenko**  
Methodical features of biomedical research of the influence of pharmacological agents on the resistance of the organism to acute general hypothermia .....4

**N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, V.N. Karkischenko, L.A. Taboyakova, M.I. Mokrousov, O.V. Alimkina**  
Convergent validation of intracranial animals brain relations.....16

### RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

**N.I. Burtseva, M.A. Tyunin, A.S. Gogolevskiy, S.V. Chepur**  
Assessment of risk of formation of the intermediate syndrome in poisonings with organophosphates using molecular docking.....40

**Ya.V. Gorina, Yu.K. Komleva, O.L. Lopatina, A.I. Chernykh, A.B. Salmina**  
Behavioral phenotypic analysis of animals with a genetic model of Alzheimer's disease .....47

### BIOMEDICAL METHODS

**P.P. Zolin, V.D. Conway**  
Measurement of the isotopic label incorporation in the breath CO<sub>2</sub> ..... 60

**G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, E.B. Shustov**  
Method of evaluating the xenobiotic detoxification system in laboratory animals..... 71

**L.A. Sharafutdinova, M.V. Bazunova, E.I. Kulish, N.N. Kurchatova, Z.R. Hismatullina, M.R. Daminov**  
Influence of ultradisperse systems on the basis of complexes of a chitosan and its derivatives with colloidal particles of silver iodide on the immune status..... 82

### LABORATORY ANIMALS

**N.V. Stankova, M.A. Savina, G.D. Kapanadze**  
The formation of new lines of svetlogorsk mini-pigs ..... 95

### NON-CLINICAL RESEARCHES

**I.A. Titovich, S.V. Radko, D.S. Lisitskiy, S.V. Okovitiy, V.Ts. Bolotova, A.V. Belskaya, M.V. Mikhailova, Yu.I. Sysoev**  
The study of the effect of the aminoethanol derivative on cognitive functions of laboratory animals..... 102



## Методические особенности биомедицинских исследований влияния фармакологических средств на устойчивость организма к острой общей гипотермии

Е.Б. Шустов<sup>1,3</sup>, Г.Д. Капанадзе<sup>2</sup>, Ю.В. Фокин<sup>2</sup>, Е.Л. Матвеев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>3</sup> – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Контактная информация: д.м.н. Шустов Евгений Борисович, [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

Рассмотрены методические особенности формирования и изучения острой общей гипотермии у лабораторных животных – белых крыс. Выявлено, что по уровню устойчивости животных к гипотермии исходная популяция животных не однородна, и в ней выделяются «резистентные» и низко устойчивые к воздействию животные. Показатели, отражающие динамику теплового состояния животных (скорость теплонакопления или теплопотерь), по особенностям своего статистического распределения далеки от нормального и не могут быть использованы для популяционного переноса и интерпретации полученных данных. Показатели, основанные на характеристиках работоспособности животных при иммерсионном холодовом воздействии, более корректно отражают динамику компенсаторно-приспособительных процессов и могут считаться преимущественными в исследованиях по изучению специфической фригопротекторной активности новых лекарственных средств. В исследованиях с применением референсных психомоторных стимуляторов (сиднокарб, кофеин) была подтверждена специфичность разработанной экспериментальной модели.

**Ключевые слова:** биомедицинские исследования, гипотермия, сиднокарб, кофеин, фригопротекторы.

### Введение

На современном этапе социально-экономического развития России все большую актуальность приобретают исследования, направленные на расширение возможностей человека по промышленному освоению территорий с экстремальными климато-географическими условиями, в особенности – реги-

онов Крайнего Севера. В силу этого происходит увеличение числа исследований по разработке новых лекарственных средств, действие которых направлено на уменьшение степени гипотермии, т.е. повышение переносимости человеком состояний гипотермии (фригопротекторы). В то же время, в доклинических (биомедицинских) исследованиях не

сформирован корректно апробированный блок методик, позволяющий на интегральном уровне оценивать переносимость животными экстремальных холодовых воздействий и возможность выполнения при этом различных видов деятельности.

В практике биомедицинских исследований известно несколько методов формирования общей гипотермии у лабораторных животных. К ним относятся контактные методы (обкладывание тела фиксированных животных льдом), методы воздушной гипотермии (пребывание животных в климатической камере), водного охлаждения (пребывание фиксированного животного в воде с приподнятой головой, иммерсионная гипотермия свободно плавающего животного), комбинированного воздушно-водного охлаждения (животное в климатической камере стоит в ванночке с холодной водой) [2, 9]. В многочисленных исследованиях показана высокая вариабельность теплового состояния животных в одинаковых условиях охлаждения, а также температур холодной остановки дыхания и сердечной деятельности [10].

В условиях охлаждающего воздействия необходимо разделять две принципиально важные ситуации – острую воздушную гипотермию и острую иммерсионную гипотермию, связанную с пребыванием в холодной воде. В условиях острой воздушной гипотермии у всех теплокровных животных включается универсальная защитная реакция – контрактильный термогенез, связанный с катехоламиновой мышечной дрожью, активацией липолиза в бурой жировой клетчатке, экспрессией генов разобщающих белков, снижающих КПД митохондриального окисления и утечки

энергии в нефосфорилирующих реакциях. О состоянии организма при этом можно судить по динамике теплового содержания (для человека – по динамике температуры ядра тела (Т<sub>р</sub>) и средне-взвешенной температуры оболочки тела (СВТК), для лабораторных животных – по динамике ректальной температуры).

Известно, что для человека устойчивость к холодовому воздействию во многом определяется балансом про- и антиоксидантных систем, выраженностью кортизолового и инсулинового ответа на холодовое воздействие, интенсивностью анаэробного гликолиза, напряженностью иммунных механизмов и выраженностью астенических проявлений, состояния регуляторных механизмов организма [7].

Генетическим предиктором уровня холодовой резистентности организма может являться полиморфизм генов разобщающего белка (UCP). Действие кодированного им протеина вызывает разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях, в результате чего большая часть высвобождаемой при биологическом окислении энергии тратится в виде тепла. Полиморфизм гена этого белка приводит к его недостаточности у части представителей популяции людей [8]. Полиморфизм выявлен у всех трех типов разобщающего белка – UCP1 (адипоциты бурой жировой ткани), UCP2 (многие ткани, белая жировая ткань), UCP3 (миоциты скелетных мышц).

Индивидуальная устойчивость организма к холоду зависит от множества факторов, в т.ч. от возраста, пола, массы тела, количества жировой ткани и т.д. Даже при отсутствии морфологических и возрастных различий устойчивость ор-

ганизма к холоду может быть различной, например, вследствие разной интенсивности обменных процессов, лежащих в основе теплопродукции. Естественно, особое значение различия в индивидуальной реактивности животных к охлаждающему воздействию приобретают в фармакологических исследованиях, т.к. изменение холодовой резистентности тканей, уровня теплопродукции, транспорта кислорода, окислительного фосфорилирования в ключевых органах и тканях может быть также мишенью действия лекарственных средств.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение методических особенностей и статистических характеристик показателей методик, позволяющих формировать у лабораторных животных стандартизированное состояние умеренной гипотермии.

### **Материалы и методы**

Исследование проводилось на белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались по 6 особей в вентилируемых клетках RairIsoSystem при температуре воздуха 20-22°C, относительной влажности 40-60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8<sup>00</sup>. Использовался полнорационный корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм», Москва) при свободном доступе к водопроводной питьевой воде.

Охлаждающее воздействие в разных сериях создавалось помещением фиксированных в ограничивающих подвижность пластиковые пеналы животных в климатическую камеру, поддерживающую температуру воздуха  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  при влажности 75-80%, или погружением животных в десатурированную воду температурой 10-12°C. Динамика теплового состояния при воздушной гипотермии определялась ректальным электротермометром для лабораторных животных Corelle D-10 (Италия) с фиксацией показаний каждые 10 мин. В серии с иммерсионной гипотермией фиксировались только исходные и конечные данные ректальной температуры с помощью портативного электротермометра ТПЭМ-1 (Россия).

В исследовании с воздушной гипотермией животные в исходном состоянии и при достижении ректальной температуры 36°C на короткое время (до 5 мин) извлекались из климатической камеры, и с ними проводилось исследование спонтанной поведенческой активности в тесте «Открытое поле» (НПК «Открытая Наука», Москва). Для этого каждое животное по одному помещали в центр поля и включали секундомер. Фиксировали количество пересечений, стоек, заглядываний в норки, дефекаций, уринаций, грумингов в течение 3-х мин. По истечении этого времени проверяли реакцию на хлопок и захват, результат выражали в баллах. Оценивали общую двигательную активность (ОДА), поисково-исследовательскую активность (ПИА), эмоциональную лабильность (ЭЛ) и агрессивность [1, 6].

В исследовании с иммерсионной гипотермией в качестве интегральной характеристики функционального со-

стояния животных использовалась характеристика их физической работоспособности – время предельного плавания с грузом 5% от массы тела [5].

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась методами описательной статистики, дисперсионного факторного и кластерного анализов с помощью пакета прикладных программ Statistica v. 10.

### Результаты и их обсуждение

В условиях воздушного охлаждения анализировались данные, отражающие динамику ректальной температуры животных. Кластерный анализ позволил разделить массив наблюдений на две неравноценные по количеству группы – стандартную (85%) и резистентную (15%). Типичные примеры температурных кривых для этих групп представлены на рис. 1.

Для обеих групп анализ индивидуальных кривых ректальной температуры позволил вычленивать две фазы динамики теплового состояния. Первая фаза – кратковременный подъем или удержание

температуры на исходном уровне, затем прогрессирующее, практически линейное ее снижение. Длительность первой фазы может отражать способность организма мобилизовать стрессовые механизмы повышения теплопродукции, что является самостоятельным показателем для анализа. Вторая фаза, скорее всего, отражает суммарную скорость теплопотерь (излучением, теплопроводением) и определяется как механизмами регуляции кровотока, так и индивидуальными характеристиками теплоизоляционных свойств шерсти животных. Линейный характер снижения ректальной температуры у животных стандартной группы во время второй фазы позволяет достоверно прогнозировать скорость развития гипотермического синдрома в условиях воздушного охлаждения. С учетом этого, регрессионным анализом по индивидуальным кривым снижения ректальной температуры может быть определено время достижения критической температуры (35°C), при которой наблюдается срыв компенсаторно-приспособительных реакций организма.

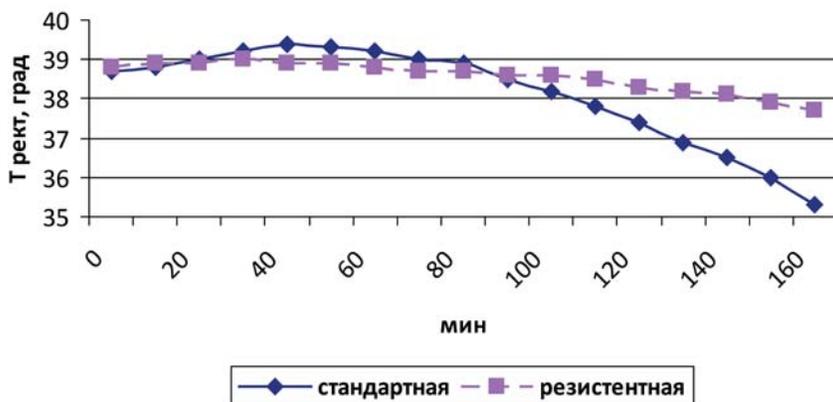


Рис. 1. Примеры типовых кривых динамики ректальной температуры крыс в ходе экспериментального воздушного охлаждения.

Для животных резистентной группы характерны более отчетливые механизмы сохранения теплосодержания в организме, отсутствие избыточной стрессиндуцированной реакции повышения теплопродукции, длительный период стабилизации температуры тела. Можно предположить, что эффект действия фригопротекторных лекарственных средств на животных стандартной и резистентной групп будет существенно отличаться, т.к. дальнейшее повышение уровня холодовой резистентности у таких животных будет требовать реализации иных механизмов действия [11]. Животные этой группы вносят существенный разброс в среднегрупповые данные, снижая статистическую достоверность полученных результатов. Т.к. различия между стандартной и резистентной группами выявляются уже в начале холодового воздействия, то появляется возможность в фоновом исследовании провести предварительную оценку типа холодового реагирования лабораторных животных и исключить животных резистентной группы из участия в исследованиях, направленных на оценку специфической фригопротекторной активности фармакологических средств.

В рассмотренной модели воздушной гипотермии, судя по тому, что не была выявлена группа низкоустойчивых животных, степень холодового воздействия не является экстремальной. Для выявления низкоустойчивых животных необходимо усиление воздействия, что может быть сделано за счет снижения теплоизоляционных свойств шерсти животных. Так, Застенская И.А. [4] для усиления воздушного холодового воздействия использовала периодическое орошение животных водой с температурой 5°C.

Количественными характеристиками описанной модели воздушной гипотермии могут быть: доля животных с резистентным типом реагирования на холодовую нагрузку (D, %), длительность первой фазы компенсаторно-приспособительных реакций (L1, мин), максимальный прирост ректальной температуры (T1, град), средняя скорость теплопотерь во второй фазе компенсаторно-приспособительных реакций (CT, град/час), длительность второй фазы (до достижения ректальной температуры 35°C, фактически или расчетно по результатам регрессионного анализа, мин). Проведенный статистический анализ этих показателей на нормальность их распределения показал, что даже для предварительно сформированной группы со стандартным типом реагирования животных на холодовое воздействие они *не соответствуют* критериям распределения случайной величины, и, следовательно, результаты этой модели не подлежат популяционному переносу и могут анализироваться только в рамках конкретного исследования. В исследованиях с применением фармакологических средств достоверность различий между группами должна определяться непараметрическими методами.

Во время пребывания животных во второй фазе гипотермии (прогрессирующее снижение температуры) в зависимости от конкретных целей исследования допускается кратковременное (до 5 мин) извлечение животных из климатической камеры для выполнения с ними экспериментальных методик (например, тест «Открытое поле»). Как показали наши исследования, за такой интервал времени тепловое состояние животных не успевает измениться, и с

ними может быть продолжено исследование с воздушной гипотермией. При этом, в целях максимальной стандартизации исследований, это желательно делать при достижении показателей ректальной температуры значения 36°C. Данные, характеризующие особенности поведенческой активности животных в тесте «Открытое поле» при гипотермии, представлены в табл. 1.

В условиях выраженной гипотермии (при достижении фиксированных значений ректальной температуры 36°C) поведение животных характеризуется резким угнетением двигательной и поисково-исследовательской активности, повышением агрессивности и эмоциональной лабильности. Такое резкое

(в 9 раз) снижение двигательной активности животных в условиях выраженной гипотермии свидетельствует о невозможности проведения с ними каких-либо нагрузочных двигательных тестов, как маркеров функционального состояния и работоспособности.

Для оценки фригопротекторной активности препаратов и их влияния на работоспособность была разработана модель острой иммерсионной гипотермии (плавание крыс в воде 10-12°C с грузом 5% от массы тела). Выбор температуры воды и отягощения был сделан на основании результатов предварительной серии экспериментов (рис. 2, табл. 2). Главными критериями выбора служили достижение умеренной ги-

Таблица 1  
**Влияние гипотермии на поведенческие характеристики крыс в тесте «Открытое поле» (средние по группе,  $M \pm m$ ,  $n=40$ )**

Условия измерения	Общая двигательная активность, с	Поисково-исследовательская активность, с	Агрессивность, балл	Эмоциональная лабильность, балл
Термокомфортные	109,3±4,1	14,1±0,9	0,9±0,2	1,7±0,2
Гипотермия	13,1±2,1*	1,7±0,4*	3,1±0,4*	3,6±0,3*

Примечание: \* – отличия от термокомфортных условий достоверны,  $p < 0,001$ .

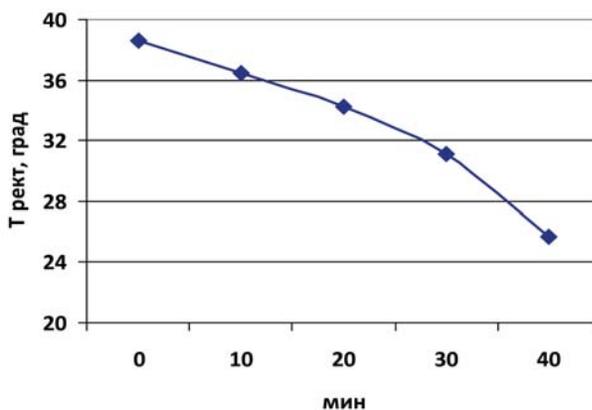


Рис. 2. Динамика ректальной температуры крыс при плавании в воде температурой 12-14°C.

## Отработка методики воздействия (данные предварительных серий экспериментов)

Номер серии	Масса груза, %	Температура воды, °С	Предельная продолжительность плавания, мин
1	0	13-14	103±24
2	2,5	13-14	80±15
3	4	13-14	50±11
4	5	13-14	22±6
5	5	10-12	17±2
6	8	10-12	6±4
7	10	10-12	3±2

потерии, оптимальная продолжительность плавания животных и минимальный разброс показателей в группе. Время плавания животных измерялось от начала погружения до полного прекращения двигательной активности (гибели). Таким образом, время плавания характеризует одновременно как уровень работоспособности, так и холодовую резистентность животных.

Представленные на рис. 2 данные показывают, что для формирования умеренной иммерсионной гипотермии достаточно пребывания в воде температурой 12-14°C (свободное плавание без груза) на протяжении 10-20 мин. Однако для оценки работоспособности животных при этом необходимо использование дополнительного утяжеления, обеспечивающего отрицательную плавучесть и вынуждающего животных активно работать для сохранения своей жизни. Возникающее при этом перемешивание воды рядом с телом усиливает теплоотведение, что способствует более четкому формированию состояния гипотермии.

Данные табл. 2 позволили выбрать в качестве оптимального следующий режим иммерсионной гипотермии: темпе-

ратура воды 10-12°C, груз 5% от массы тела животных. Использование более тяжелых грузов не целесообразно, т.к. при применении фармакологических средств стимулирующего действия в силу «эффекта малой базы» преобладать будут эффекты в отношении работоспособности животных (выраженная гипотермия еще не успеет развиваться), а исследования с использованием более малых грузов становятся не оптимальными в силу высокой продолжительности исследования.

Предварительные серии исследования показали также необходимость четкого выполнения процедуры десатурации при подготовке воды (при низкой температуре ее способность удерживать воздух выше, и во время плавания животных в воде без десатурации на их шерсти начинают скапливаться пузырьки воздуха, что обеспечивает животным как дополнительную плавучесть, так и теплоизоляцию).

Количественными параметрами данной методики являются время плавания животных с грузом, а также индекс устойчивости животных к холодовому воздействию. Статистический анализ показал, что в заданных условиях им-

мерсионной гипотермии (температура воды 10-12°C, груз 5% от массы тела) показатель времени плавания животных имеет параметры распределения, близкие к нормальному. Следовательно, полученные с использованием данной модели результаты могут подвергаться популяционному переносу, а при проведении исследований фригопротекторной активности лекарственных средств могут применяться как параметрические, так и непараметрические методы статистических оценок и моделирования.

Для определения индекса устойчивости строилась кумулятивная кривая (рис. 3) распределения предельного времени плавания, точки перегиба которой, в соответствии с принципом S-шкалирования, являются границами диапазонов устойчивости животных. График кумулятивной кривой, построенной

на результатах тестирования животных контрольной группы (n=40), показывает временные интервалы плавания, характеризующие уровень устойчивости животных к острой иммерсионной гипотермии (до 5 мин – низкая, 5-10 мин – средняя, более 10 мин – высокая).

Индекс устойчивости (IU) вычислялся по формуле:

$$IU = \frac{a + 2b}{2(a + b + c)},$$

где a – количество среднеустойчивых, b – высокоустойчивых и c – низкоустойчивых животных в группе.

В фармакологических исследованиях индекс устойчивости, близкий к «единице», указывает на максимальную активность введенной дозы препарата, обеспечивающей максимальное повышение холодовой устойчивости животных (максимальная продолжительность

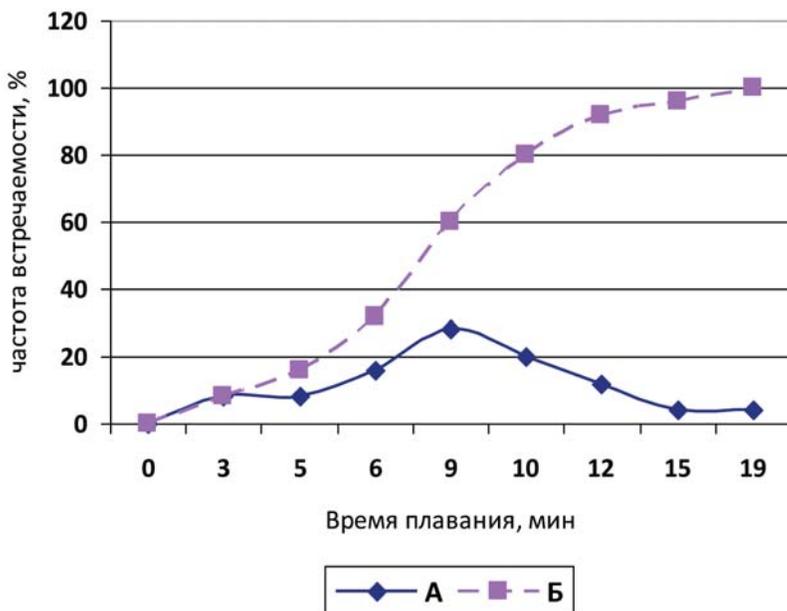


Рис. 3. Частотные кривые распределения времени предельного плавания животных в воде температурой 10-12°C и грузом 5% от массы тела. А – кривая распределения, Б – кумулятивная кривая.

плавания всех животных экспериментальной группы).

В качестве примера применения разработанной модели иммерсионной гипотермии в фармакологических исследованиях приведем результаты оценки фригопротекторной активности одного из стандартных (референсных) препаратов для этого вида фармакологической активности – сиднокарба. Фрагмент исследования спланирован как определение зависимости «доза-эффект». Препарат исследовался в широком диапазоне доз (от 0,15 до 1,5 мг/кг) при внутрижелудочном зондовом введении в 0,5 мл р-ра. Введение препарата осуществлялось за 1 ч до начала холодового воздействия. Контрольной группе вводили физ. р-р в эквивалентном количестве. Иммерсионная гипотермия создавалась погружением животных в предварительно десатурированную воду температурой 10-12°C. Регистрировалось время предельного плавания животных с грузом 5% от массы тела, зафиксированным на корне хвоста.

Зависимость «доза-эффект» для сиднокарба в графическом виде представлена на рис. 4.

Анализ зависимости «доза-фригопротекторный эффект» показывает, что сиднокарб положительно влияет на работоспособность животных в условиях гипотермии в относительно узком диапазоне доз (от 0,075 до 0,90 мг/кг). Наибольшая продолжительность плавания отмечается при введении препарата в дозах 0,15 мг/кг (177%) и 0,75 мг/кг (163%). Индекс устойчивости составил 0,92 и 0,83 ед. соответственно. Вероятно, высокий защитный эффект сиднокарба в отношении физической работоспособности животных в условиях гипотермии связан как с его непосредственным влиянием на физическую работоспособность, так и со способностью стабилизировать на определенное время тепловой статус организма.

Механизмы, приводящие к повышению теплопродукции на фоне сиднокарба, хорошо изучены. Это повышение

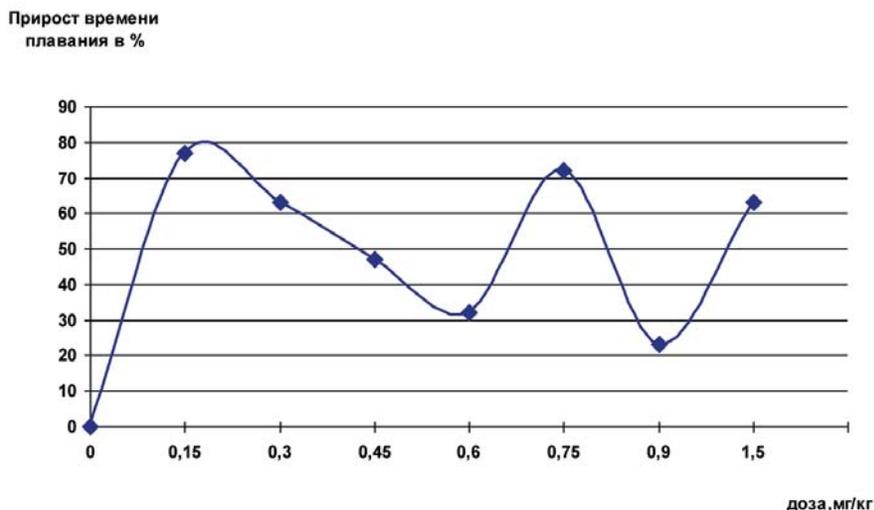


Рис. 4. Кривая «доза-эффект» для фригопротекторного действия сиднокарба.

тонуса симпатoadреналовой системы, активация липолиза, нарастание уровня свободных жирных кислот, которые обладают разобщающим действием на уровне митохондрий, прямое действие на терморегуляторный центр [2].

Для проверки специфичности модели было выполнено аналогичное исследование другого известного психомоторного стимулятора – кофеина, который вводился лабораторным животным в дозах 1-100 мг/кг. Исходя из известной способности кофеина, кроме возбуждения ЦНС, стимулировать периферический кровоток и устранять спазм мелких мышечных сосудов, можно предположить, что, в отличие от сиднокарба, кофеин будет усиливать теплопотери организма в холодной воде и, следовательно, не оказывать защитного эффекта в тесте плавания животных в холодной воде. Графически выявленные закономерности зависимости «доза-фригопротекторный эффект» для кофеина отражены на рис. 5.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что кофеин в исследованной экспериментальной модели только в одной, самой низкой, дозе 1 мг/кг проявляет слабый позитивный эффект, связанный с умеренной стимуляцией ЦНС лабораторных животных. Увеличение дозы препарата ведет не только к повышению его возбуждающего действия, но и к усилению периферических эффектов препарата, сопровождающихся, предположительно, усилением теплоотдачи организма и ухудшением переносимости гипотермии. В максимально эффективной дозе 1 мг/кг индекс защиты для кофеина составил 0,6 ед. (в контроле – 0,5 ед.), что является статистически недостоверным. Сопоставление эффектов, выявленных с помощью разработанной экспериментальной модели для сиднокарба и кофеина, позволяет считать модель специфичной для оценки работоспособности животных в условиях гипотермии.

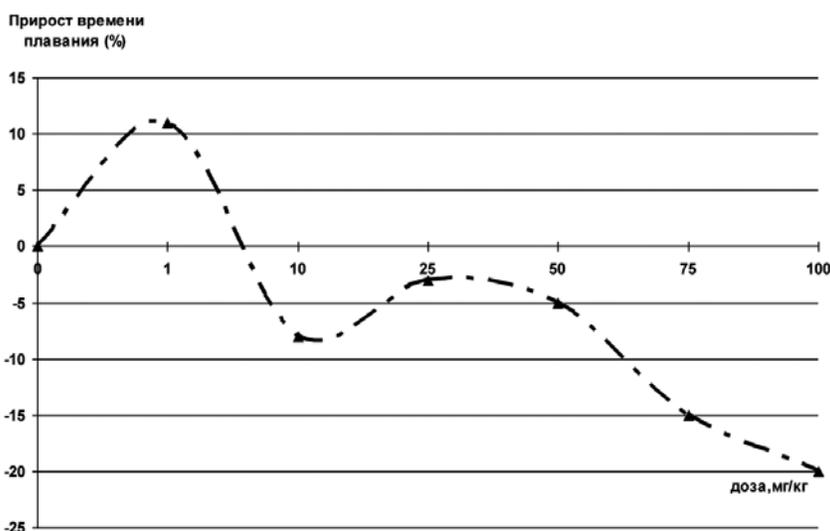


Рис. 5. Кривая «доза-фригопротекторный эффект» для кофеина.

## Заключение

Проведенный анализ методов формирования и оценки гипотермических состояний у лабораторных животных (белые крысы) показал, что в интересах доклинического изучения специфической фригопротекторной активности новых лекарственных средств наиболее перспективным может считаться метод иммерсионной гипотермии – плавание животных с грузом 5% от массы тела в предварительно десатурированной воде температурой 10-12°C. Такая масса утяжеления обеспечивает длительность плавания животных, достаточную для формирования умеренной гипотермии.

Применение разработанной модели иммерсионной гипотермии в фармакологических исследованиях для выявления специфической фригопротекторной активности лекарственных средств продемонстрировано в исследованиях с применением широко используемых референсных препаратов психостимулирующего действия – сиднокарба и кофеина. Показано, что способность кофеина интенсифицировать периферический кровоток полностью устраняет его фригопротекторное действие в описанной модели, что может свидетельствовать о ее специфичности.

## Список литературы

1. *Абуладзе Г.В.* Изучение эмоциональности крыс и мышей в поведенческих и фармакологических экспериментах методом «открытое поле» // Известия АН ГрССР. Серия «Биология». 1983. Т. 9. № 3. С. 156-165.
2. *Барер А.С., Лакота М.Г., Островская Г.З., Шаиков В.С.* Фармакологическая коррекция холодовых воздействий на человека // Косм. биол. и мед. 1988. № 6. С. 66-73.
3. *Гулиева С.А.* О методах охлаждения, применяемых в условиях эксперимента // Азерб. мед. журнал. 1979. № 3. С. 44-50.

4. *Застенская И.А.* Метаболизм миокарда у крыс в условиях гипотермии // Здоровоохранение Беларуси. 1989. № 2. С. 28-31.
5. *Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б.* Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции. - М., СПб.: Айсинг. 2013. 288 с.
6. *Маркель А.Л.* К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте «открытого поля» // Журнал высшей нервной деятельности. 1981. Т. 31. № 4. С. 301-306.
7. *Новиков В.С., Сороко С.И.* Физиологические основы жизнедеятельности человека в экстремальных условиях. - СПб.: Политехника-принт. 2017. 476 с.
8. *Новиков В.С., Шанин В.Ю., Козлов К.Л.* Общая патофизиология. - СПб.: Профессора медицинских академий. 2000. 288 с.
9. *Северина Т.Г., Кубарко А.И.* Влияние острой иммерсионной гипотермии на температуру тела и активность лизосомальных ферментов печени у устойчивых и неустойчивых к холоду крыс // Мед. журнал. 2009. Т. 28. № 2. С. 112-115.
10. *Слепчук Н.А., Иванов К.П.* Температурные изменения в различных органах при иммерсионной гипотермии // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1992. Т. 28. № 12. С. 127-131.
11. *Тимочко М.Ф., Алексеева Я.К., Бобков Ю.Г.* О некоторых биохимических механизмах жизнеобеспечения высокорезистентных животных // Пат. физиол. и эксп. терапия. 1991. № 2. С. 28-29.

## References

1. *Abuladze G.V.* Izuchenie ehmcional&apos;nosti kryс i myshej v povedencheskih i farmakologicheskikh ehksperimentah metodom «otkrytoe pole» // Izvestiya AN GrSSR. Seriya «Biologiya». 1983. T. 9. № 3. S. 156-165.
2. *Barer A.S., Lakota M.G., Ostrovskaya G.Z., Shashkov V.S.* Farmakologicheskaya korrekciya holodovyh vozdeystvij na cheloveka // Kosm. biol. i med. 1988. № 6. S. 66-73.
3. *Gulieva S.A.* O metodah ohlazhdeniya, primenyaemyh v usloviyah ehksperimenta // Azerb. med. zhurnal. 1979. № 3. S. 44-50.
4. *Zastenskaya I.A.* Metabolizm miokarda u kryс v usloviyah gipotermii // Zdravooхранenie Belarusii. 1989. № 2. S. 28-31.
5. *Karkischenko N.N., Ujba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B.* Ocherki sportivnoj

- farmakologii. T. 1. Vektory ehkstrapolyacii. - M., SPb.: Ajsing, 2013. 288 s.
6. **Markel' A.L.** K ocenke osnovnyh harakteristik povedeniya krysa v teste «otkrytogo polya» // Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti. 1981. T.31. № 4. S. 301-306.
  7. **Novikov V.S., Soroko S.I.** Fiziologicheskie osnovy zhiznedeyatel'nosti cheloveka v ehkstremal'nyh usloviyah. - SPb.: Politehnika-print. 2017. 476 s.
  8. **Novikov V.S., Shanin V.Yu., Kozlov K.L.** Obshchaya patofiziologiya. - SPb.: Professora medicinskih akademij. 2000. 288 s.
  9. **Severina T.G., Kubarko A.I.** Vliyanie ostroj immersionnoj gipotermii na temperaturu tela i aktivnost' lizosomal'nyh fermentov pecheni u ustojchivyh i neustojchivyh k holodu krysa // Med. zhurnal. 2009. T. 28. № 2. S. 112-115.
  10. **Slepchuk N.A., Ivanov K.P.** Temperaturnye izmeneniya v razlichnyh organah pri immersionnoj gipotermii // Fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova. 1992. T. 28. № 12. S. 127-131.
  11. **Timochko M.F., Alekseeva Ya.K., Bobkov Yu.G.** O nekotoryh biohimicheskikh mekhanizmah zhizneobespecheniya vysokorezistentnyh zhivotnyh // Pat. fiziol. i ehksp. terapiya. 1991. № 2. S. 28-29.

## **Methodical features of biomedical research of the influence of pharmacological agents on the resistance of the organism to acute general hypothermia**

**E.B. Shustov, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, E.L. Matveyenko**

Methodical features of the formation and study of acute general hypothermia in laboratory animals – white rats are considered. It was revealed that the initial animal population is not homogeneous by the level of resistance of animals to hypothermia, and “resistant” and low resistant to animals are distinguished in it. Indicators reflecting the dynamics of the thermal state of animals (the rate of heat accumulation or heat loss), by the features of their statistical distribution are far from normal and cannot be used for population transfer and interpretation of the data. The indices, based on the performance characteristics of animals under immersion cold exposure, more correctly reflect the dynamics of compensatory-adaptive processes and may be considered preferable in studies on the specific frigoprotective activity of new drugs. In studies using reference psychomotor stimulators (sydnokarb, caffeine), the specificity of the developed experimental model was confirmed.

**Key words:** biomedical research, hypothermia, sydnokarb, caffeine, frigoprotectors.

## Конвергентная валидация интрацентральных отношений головного мозга животных

Н.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, Ю.В. Фокин<sup>1</sup>, В.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, Л.А. Таболякова<sup>1</sup>,  
М.И. Мокроусов<sup>2</sup>, О.В. Алимкина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – ФГБУН Институт космических исследований РАН, Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, [fokin-yuri@yandex.ru](mailto:fokin-yuri@yandex.ru)

---

Конвергентная валидация интрацентральных отношений основана на общности результатов, получаемых с помощью различных методов и критериев оценки работы головного мозга и высшей нервной деятельности исследуемых животных-биомоделей. Разработан программно-аппаратный комплекс (нейромодуль), необходимый для изучения психофизиологического, электрофизиологического и психофармакологического аспектов интрацентральных отношений головного мозга. В статье описаны методики и подходы, заложенные в структуру нейромодуля. В хроническом эксперименте вживлены изготовленные электродные конструкции в информативные области головного мозга кошек. Посредством локальной электрической активации головного мозга осуществлена регистрация вызванных потенциалов, а также параметров электроэнцефалографии, для интерпретации результатов которой разработано программное обеспечение на основе современных математических приемов. Составляется единая база и банк данных по всем исследуемым с помощью указанных методик животным, способствующие объективизации результатов анализа интрацентральных отношений головного мозга.

**Ключевые слова:** интрацентральные отношения, головной мозг, конвергентная валидация, нейромодуль, электроды, электрическая активация, вызванные потенциалы, электроэнцефалография, кошки.

---

### **Интрацентральная регуляция как система контроля работы мозга**

В настоящее время понимание устройства и принципов работы головного мозга человека является важной проблемой всей мировой науки. В понимании нуждается не анатомическое строение и нейрофизиологические процессы, происходящие в головном мозге, – эти аспекты мозга не вызывают вопросов и сомнений, – а не решена фундаментальная проблема понимания базовых принципов работы головного мозга и физических и биохимических основ его устройства. Несмотря

на применение инновационных высокотехнологичных компьютерно-диагностических методов в исследованиях мозга и использование фундаментальных подходов математики и теоретической физики, научные представления об устройстве и принципах работы мозга – по сути, существу и содержанию – практически не изменились на протяжении последних 100 лет.

Мозг человека можно определить как высокоорганизованное многоуровневое полисистемное и полифункциональное образование со множеством взаимодействующих локальных и об-

щечеребральных элементов. Общий контроль, координацию и регуляцию режимов работы мозга осуществляет система интрацентральной регуляции [2, 3], включающая различные необходимые механизмы и системы мозга, благодаря чему достигается согласованность работы мозга и обеспечивается, в конечном итоге, целостная церебральная и психическая деятельность.

В рамках одной, даже самой универсальной, методики нельзя ответить на поставленные вопросы, касающиеся анализа такого обширного процесса, как интрацентральные отношения головного мозга.

Различные сигналы и импульсы, координирующие работу нервной системы, модулируют изменения нейрональной активности, интрацентральных отношений, нейрохимические процессы и т.д. с целью реализовать функциональные реакции, которые приводят к быстро развивающимся и кратковременным адаптивным реакциям (поведенческие реакции организма, изменения параметров функционирования какой-либо физиологической системы).

**Конвергентная валидность** (от лат. «*convergo*» – сходить в одну точку, сближаться и «*validus*» – сильный, здоровый, достойный) – это проверка ожидаемой связи результатов конкретной методики с показателями других методик, измеряющих сходные характеристики. Например, если для измерения какой-либо черты существует несколько методик, целесообразным было бы провести эксперименты по хотя бы двум, и тогда при обнаружении высокой положительной корреляции их результатов

между собой можно говорить о валидности. Основной целью конвергентной валидации является определение того, будут ли оценки теста варьироваться в соответствии с ожиданиями. Противоположный подход – дивергентная валидация.

Таким образом, анализ интрацентральных отношений проводится на основе общности результатов, получаемых с помощью различных методов и критериев оценки работы головного мозга и высшей нервной деятельности исследуемых биомоделей [9, 10, 11, 12].

### **Регуляция интрацентральных отношений различными отделами головного мозга**

Для оптимизации дальнейшего изложения мы приведем основные данные об анатомо-физиологических особенностях отделов головного мозга, но в ключе их роли в конвергентно-валидационных интрацентральных отношениях. Хотя анатомия мозга не изменилась, но за последние годы значительно обогатились наши представления о роли его отделов в системной деятельности и интрацентральных взаимодействиях и взаимовлияниях.

У предков млекопитающих основным отделом мозга был мозжечок, затем главную роль взял на себя разросшийся конечный мозг, образующий большие полушария.

На рис. 1 представлена наша концептуальная схема участия различных отделов головного мозга в регуляции интрацентральных отношений, конвергентных процессов и регуляторных механизмах системной деятельности организма.

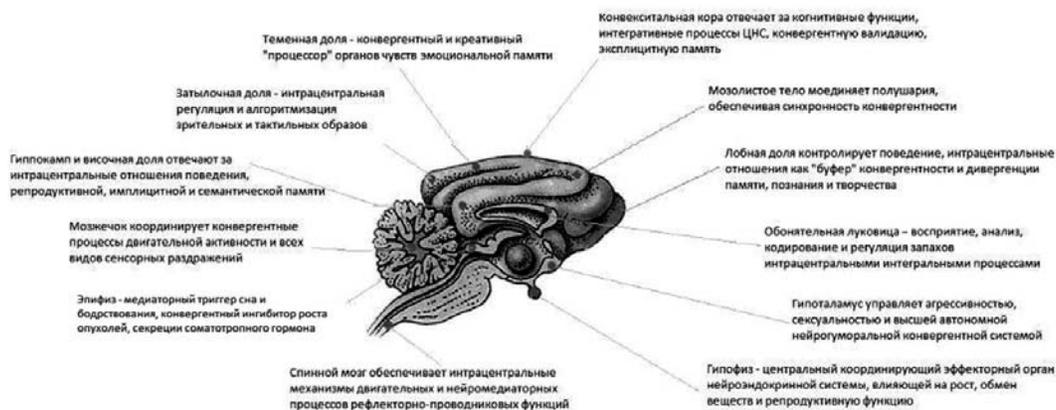


Рис. 1. Схема участия различных отделов головного мозга в регуляции интрацентральных отношений, конвергентных процессов и регуляторных механизмов системной деятельности организма.

В задней части каждого полушария располагается затылочная доля, внизу сбоку, в районе уха – височная, вверху – теменная, а спереди – лобная. Каждая из четырех долей обрабатывает свою информацию. Затылочная доля состоит почти исключительно из отделов, осуществляющих интрацентральную регуляцию и алгоритмизацию зрительных и тактильных образов. Теменная – конвергентный и креативный «процессор» органов чувств – занимается, в основном, функциями, связанными с движением, ориентацией, расчетами и определенными формами узнавания. Височная – занимается звуком, восприятием речи (обычно только в левом полушарии), некоторыми аспектами памяти и когнитивной деятельности. Лобная доля ведает самыми сложными из функций мозга – мышлением, формированием понятий и планированием. Кроме того, лобные доли играют важную роль в сознательном переживании эмоций и в когнитивных процессах как «буфер» конвергенции и дивергенции памяти, познания и творчества (рис. 1).

Самая заметная структура на внутренней поверхности каждой половинки разрезанного мозга – мозолистое тело, соединяющее полушария друг с другом и играющее роль моста, по которому в обе стороны постоянно передается информация, так что обычно полушария работают как единое целое, обеспечивая синхронность механизмов конвергенции интрацентральных процессов.

Совокупность модулей, расположенных под мозолистым телом на медиальной (внутренней) стороне больших полушарий, называют лимбической системой. Она как бы окружает ствол мозга. Эта система в эволюционном плане древнее коры, и ее иногда называют также «мозгом млекопитающих», исходя из представлений о том, что она впервые возникла у древнейших млекопитающих. Работа этой части мозга, как и еще более древних его частей, расположенных под ней, совершается бессознательно, но оказывает сильнейшее воздействие на наши ощущения: лимбическая система тесно связана с расположенной над ней осознающей и конвергирующей

корой и постоянно посылает туда информацию.

Основными структурами лимбической системы являются поясная извилина (которая окаймляет мозолистое тело), гиппокамповая извилина, собственно гиппокамп, миндалевидные ядра, грушевидная извилина, крючковидная извилина. Они участвуют в поддержании постоянства внутренней среды организма, интрацентральной регуляции вегетативных функций и формировании эмоций и мотиваций. Эту систему иначе называют «висцеральным мозгом», т.к. она может рассматриваться как корковое представительство интерорецепторов. Сюда поступает информация от внутренних органов, и здесь осуществляется ее конвергенция и/или дивергенция (рис. 1).

В лимбической системе рождаются эмоции, а также большинство из многочисленных потребностей и побуждений, которые заставляют нас вести себя тем или иным образом, помогая увели-

чивать свои шансы на выживание. Но у модулей лимбической системы есть немало других функций.

В пределах коры больших полушарий к развитию интрацентральной регуляции эмоций имеют отношение несколько структур – поясная извилина, височные доли и лобные доли.

Поясная извилина обладает обширными нервными связями с подкорковыми образованиями и различными областями самой коры. Такое положение поясной извилины позволяет этой структуре осуществлять в пределах ЦНС функцию высшего координатора действий всех участников формирования эмоций [33].

На рис. 2 мы представили анатомо-функциональные отделы головного мозга, отвечающие за исполнительные функции интрацентральных отношений.

Лимбическая система имеет широкие связи со всеми областями головного мозга, ретикулярной формацией и гипо-

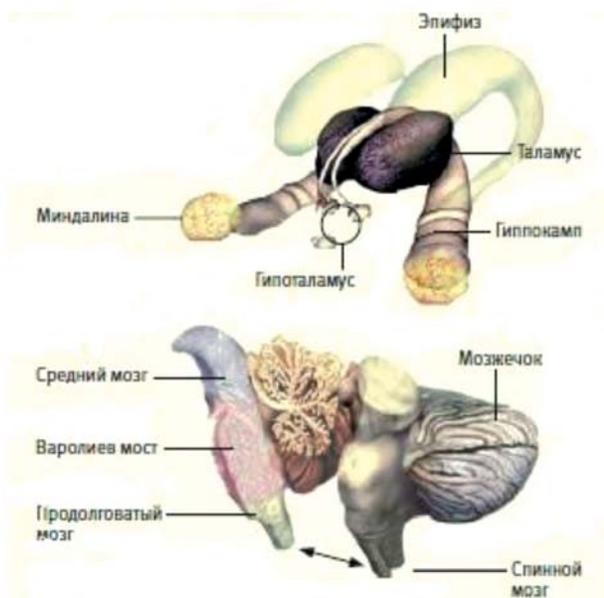


Рис. 2. Некоторые исполнительные элементы конвергентных систем интрацентральных отношений головного мозга.

таламусом. Она обеспечивает высший корковый контроль всех вегетативных функций (сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной, обмена веществ и энергии).

Промежуточный мозг представляет собой часть переднего отдела ствола мозга. Основными образованиями промежуточного мозга являются зрительные бугры (таламус), подбугорная область (гипоталамус) и надбугорье (эпиталамус).

Таламус (зрительный бугор) – ядерный комплекс, в котором происходит обработка и интеграция практически всех сигналов, идущих в кору большого мозга от спинного, среднего мозга, мозжечка, базальных ганглиев головного мозга. Таламус представляет собой нечто вроде ретрансляционной станции, распределяющей поступающую в нее информацию по соответствующим частям мозга для дальнейшей обработки. Основной функциональной единицей специфических таламических ядер являются «релейные» нейроны, у которых мало дендритов и длинный аксон; их функция заключается в переключении информации, идущей в кору большого мозга от кожных, мышечных и других рецепторов [34]. Передне-центральное и вентролатеральное ядра участвуют в регуляции движения.

Под таламусом располагается гипоталамус, который управляет автономной нейрогуморальной системой. Вместе с гипофизом, в т.ч. координирующим работу нейроэндокринной системы, он постоянно поправляет настройки нашего организма, поддерживая его в состоянии наилучшей приспособленности к окружающей среде.

Гиппокамп – отвечает за интрацентральные отношения и поведение, необходим для формирования долговре-

менной памяти. В расположенной перед ним миндалине возникает и поддерживается чувство страха.

Гипоталамус является главным подкорковым центром интеграции висцеральных процессов. Он управляет всеми основными гомеостатическими функциями организма. Интегративная функция гипоталамуса обеспечивается автономными, соматическими и эндокринными механизмами. Интрацентральная регуляция гипоталамуса подобна призме, раскладывающей монохроматические потоки информации от всех органов и систем организма в многоцветие наших эмоций и красочное восприятие жизненных процессов.

Гипоталамус – одна из главных структур, участвующих в формировании поведенческих реакций организма, которые необходимы для постоянства внутренней среды. Ему принадлежит и главная роль в возникновении основных влечений (мотиваций) организма. Задняя область гипоталамуса оказывает тормозящее влияние на половое развитие. Клетки гипоталамуса избирательно чувствительны к содержанию тех или иных веществ в крови и при любом изменении их концентрации приходят в состояние возбуждения, следовательно, выполняют функции рецепторов, воспринимающих изменение гомеостаза (рис. 1).

Базальные, или подкорковые, ядра представляют собой конstellации клеток, расположенных в белом веществе между корой больших полушарий и зрительными буграми. К ним относятся три парных образования – хвостатое ядро, скорлупа и бледный шар. Развитие и клеточное строение у хвостатого ядра и скорлупы одинаковы, поэтому их рассматривают как единое образование – полосатое

тело. Полосатое тело через гипоталамус участвует в регуляции вегетативных функций организма, а также, с ядрами промежуточного мозга, обеспечивает осуществление сложных безусловных рефлексов цепного характера. Синдром поражения полосатого тела (гипотонически-гиперкинетический синдром) вызывает гипотонию мышц, хорею, атетоз, хореоатетоз, лицевой гемиспазм или параспазм, торсионный спазм, гемитремор, миоклонии. Это хорошо моделируется на животных путем прямого электрического раздражения или разрушения его.

Еще ниже располагается ствол головного мозга, представляющий собой протяжённое образование, продолжающее спинной мозг, который обеспечивает интрацентральные механизмы двигательных и нейромедиаторных процессов. Это самая древняя часть мозга, возникшая более полумиллиарда лет назад. Ствол образован нервами, идущими от тела через позвоночник и передающими информацию о разных частях организма в головной мозг. В ствол всегда включают продолговатый мозг, варолиев мост, а также средний мозг. Часто в него включают мозжечок, иногда – промежуточный мозг. Конstellляции клеток в стволе определяют общий уровень настроженности организма и регулируют вегетативные процессы: дыхание, сердцебиение, давление крови и т.д. (рис. 1).

По всему стволу мозга от спинного мозга до гипоталамуса и таламуса включительно протянулась область с огромным количеством сетевидно расположенных нейронов – ретикулярная формация ствола мозга.

Если посмотреть на любой участок мозга при большом увеличении, можно увидеть плотную сеть клеток. Большин-

ство из них – глиальные клетки, сравнительно просто выглядящие структуры, основная функция которых состоит в склеивании всей конструкции и поддержании ее физической целостности. Глиальные клетки играют большую роль в усилении или синхронизации электрической активности в мозге: например, они могут усиливать боль, как при воспалении седалищного нерва, возбуждая нейроны, передающие болевые сигналы. Глиальные клетки рассматриваются как «служба долговременной памяти» всех конвергентных процессов мозга, записанных в их ДНК и РНК.

### **Психофизиологический аспект интрацентральных отношений (взаимосвязь структур головного мозга и формирование механизмов поведенческих реакций)**

Вопрос о структурно-функциональной организации элементарной рассудочной деятельности животных, как функции мозга, эволюционно предшествующей мышлению человека, занимает одно из центральных мест среди проблем высшей нервной деятельности.

Ассоциативные структуры мозга представляют собой такие уровни интеграции, которые обеспечивают в первую очередь анализ и синтез разномодальных возбуждений. К ассоциативным структурам мозга у субприматов относят – из корковых образований – префронтальную и теменную кору, а из подкорковых – хвостатое ядро и некоторые таламические ядра (медиодорзальное, латеральное дорзальное, латеральное заднее и подушку зрительного бугра) [2, 3, 31].

Не вызывают сомнения связи хвостатого ядра с корой, опосредованные через таламус. Долгое время считали, что

хвостатое ядро является подкорковым центром экстрапирамидной двигательной системы. Но, как показали исследования [4, 24], это образование принимает участие в механизмах высшей интегративной деятельности мозга, в организации сложных форм поведения животных и психических функций человека. В процессе эволюции мозга, по мере возрастания роли новой коры, хвостатое ядро как бы «передает» ей часть своих наиболее сложных функций. По-видимому, это относится к механизмам построения двигательных программ, но полностью от участия в них хвостатое ядро не освобождается даже у приматов. Хвостатое ядро и лобная кора находятся в тесных функциональных взаимоотношениях. Известно, что на разных этапах фило- и онтогенеза степень участия обеих структур в поведении неодинакова. У кошек и взрослых обезьян кортикальный дефицит проявляется сильнее, чем у крыс и детенышей обезьян. У крыс ведущую роль в осуществлении сложных форм поведения играет хвостатое ядро.

Медиодорзальное ядро таламуса по принятой в настоящее время классификации относится к ассоциативным ядрам зрительного бугра. Среди таламических образований медиодорзальное ядро особенно тесно связано прямыми двусторонними и топически организованными волокнами с префронтальной корой. Эти связи явились основой для выделения таламо-фронтальной ассоциативной системы мозга [1, 2, 3], которая особенно интенсивно развивалась в процессе эволюции. Кроме того, хвостатое ядро и медиодорзальное ядро таламуса связаны между собой прямыми двусторонними волокнами. Эти связи выявлены как электрофизиологически-

ми исследованиями, так и морфологическими методами.

С другими отделами подкорки и корой головного мозга гипоталамус находится в непрерывных циклических взаимодействиях. Благодаря тому, что к гипоталамическим ядрам адресуются нервная и гуморальная сигнализация о различных внутренних потребностях, они и приобретают значение пускового механизма мотивационных возбуждений [36].

### **Электрофизиологический аспект интрацентральных отношений**

#### **• Выбор животных-моделей**

В сравнительно-физиологическом ряду млекопитающих (крысы, кошки, собаки, приматы) кошки занимают особое положение в связи с их «трехмерностью», наличием префронтальной коры головного мозга и её большой долей от площади новой коры.

Как показали исследования, именно у кошек архитектура мозга – т.е. общий план строения коры мозга, организации нейронных связей, распределения сосудов и т.д. – максимально близки к человеческим (ближе только у приматов). Мозг кошки биологически ближе к человеческому, чем мозг собаки. За эмоции у кошек отвечают те же самые участки мозга, что и у людей.

Структура мозга у кошки сложнее, чем у собаки. Как было сказано ранее, за высшую нервную деятельность – способность к мышлению и рациональному принятию решений – отвечает кора головного мозга. У человека она состоит из более чем 10 млрд нервных клеток. В коре головного мозга кошки 300 млн нервных клеток, а у собаки – всего 160 млн.

Кошка учится, наблюдая за человеком. В долговременной памяти кошки,

устроенной почти в 2 раза сложнее, чем у собак, может содержаться до 91000 Гб информации, которая обрабатывается со скоростью 6 трлн операций в секунду.

Кратковременная память у кошек также лучше, чем у собак. Экспериментально установлено: память о том, где спрятаны «запасы», сохраняется у кошек в течение 16-ти часов. А собаки забывают это место уже через 5 мин.

По собственному опыту содержания и работы с приматами, имеющемуся в НЦБМТ ФМБА России, обнаружены множество сложностей, которые позволили прийти к выводу о том, что кошки являются оптимальными, в т.ч. и с точки зрения экономической выгоды, биомоделями для исследований интрацентральных отношений головного мозга.

#### • Подготовка и вживление электродов

Для расширения и углубления знаний о работе головного мозга использовались разнообразные «технические методики», среди которых видное место занимает электрофизиологическая техника раздражений и регистрации электрических колебаний в головном мозге.

В большинстве нейрофизиологических исследований на головном мозге животных используются три методических приема: прямая электрическая стимуляция мозговых структур, отведение от них биопотенциалов и локальное выключение (разрушение) участков серого вещества и отрезков проводящих путей.

В работе, проводимой в лаборатории нейротехнологий НЦБМТ ФМБА России в рамках Государственного задания на выполнение прикладной научно-исследовательской работы по теме: «Разработка принципов и методов оценки нейрорпсихоактивных соединений на основе

модулирования интрацентральных отношений головного мозга», использовалась заранее изготовленная конструкция для одномоментного вживления в мозг нескольких электродов, что значительно сокращало время проведения операции и снижало степень травматизации мозговых структур во время подпаивания проводников, которые присоединялись к разъему на специальном макете (фантоме), имитирующем дорсальную поверхность черепной коробки.

Матрица изготавливалась из быстрозастывающей пластмассы «Протакрил» (Россия) путем заливания по дорсальной поверхности черепа (аналогично делалась заготовка для фантома). По матрице в дальнейшем намечались отверстия для электродов на черепе во время операции, а в фантом вклеивались электроды, соединенные с разъемом. На матрице и фантоме прорисовывались ориентиры – сагиттальный и коронарный шов (точка пересечения – брегма). На матрицу наносились точки внедрения электродов, рассчитанные по стереотаксическому атласу.

Сложив матрицу и фантом до совпадения ориентиров, высверливались отверстия под электроды. На фантоме в просверленные отверстия вклеивались электроды, и разъем фиксировался протакрилом. Длина погружных электродов корректировалась в зависимости от глубины исследуемой области мозга и толщины черепа.

Конструкция состояла из собственно электрода, который погружался в исследуемую область мозга, провода, который припаивался одним концом к электроду, а другим – к разъему марки IDC-16-2. Электроды, погружаемые в мозг, изготавливались из нихромовой проволоки толщиной 0,1-0,3 мм (в зависимости от

того, одинарный электрод или парный) и тщательно изолировались полиуретановым лаком УЛ-1 или другими лаками.

Вживление электродов осуществлялось по общим правилам операционной техники, в асептических условиях, под общим наркозом (мы использовали в работе внутривенный способ наркотизирования, через установленный катетер).

Шерсть на голове животного тщательно выбривалась и обрабатывалась р-рами перекиси водорода и йода, после чего проводился разрез кожи и фасций головы по средней линии в продольном направлении от лобных пазух до затылочного бугра. Далее по дуге с двух сторон надрезалась височная мышца в месте крепления ее к черепу вблизи сагиттального шва и отделялась распатором от кости. Удалять мышцы полностью нет необходимости. Поверхность черепа очищалась от соединительной ткани и обрабатывалась р-ром перекиси водорода. Кровотечение мышечной ткани по необходимости останавливалось при помощи кровоостанавливающих зажимов. Остановка небольших костных кровотечений достигалась смачиванием р-ром пергидроля или соскабливанием

скальпелем костной ткани на поврежденном участке.

На обработанную таким образом костную поверхность черепа накладывалась матрица, и через отверстия в матрице бором небольшого диаметра с помощью бормашины наносились точки вживления необходимых электродов.

Операция вживления электродного комплекса проводилась с использованием стереотаксических координат, начиналась с просверливания на операционном костном поле черепа кошки трепанационных отверстий, в которые погружались сразу все электроды, смонтированные на фантоме. Когда все электроды были установлены, конструкцию привинчивали к кости черепа кортикальными винтами через четыре ранее просверленных отверстия по краям фантома.

Затем осуществлялось ушивание раны. Сшивали мышцы, кожу, следя за тем, чтобы края раны были вывернуты вверх. Рана обрабатывалась хирургическим спре-ем. На разъем надевалась закрывающая пластмассовая крышка, предотвращающая механическое повреждение конструкции животным. Животное с установленной конструкцией представлено на рис. 3.



Рис. 3. Установленная на голове кошки конструкция для исследования интрацентральных отношений головного мозга.

В течение недели с животным проводился ряд процедур, в т.ч. с применением на раневую полость дезинфицирующих р-ров и инъекциями антибиотиков широкого спектра действия, после чего начинались экспериментальные исследования.

**• Электрическая стимуляция отдельных участков головного мозга**

Электрическая стимуляция различных областей лимбической системы вызывает изменения вегетативных функций (кровенного давления, дыхания, движений пищеварительного тракта, тонуса матки и мочевого пузыря). Метод активации позволил установить в коре следующие зоны: двигательные (моторные), чувствительные (сенсорные) и немые, которые теперь называют ассоциативными.

Стимуляция ядер гипоталамуса приводит к формированию целенаправленного поведения (пищевого, полового, агрессивного и т.д.). При возбуждении гипоталамических структур нервный компонент сложных реакций обязательно дополняется гормональным.

Исследования показали, что стимуляция задних ядер гипоталамуса сопровождается эффектами, аналогичными стимуляции симпатической нервной системы: расширением зрачков и глазной щели, возрастанием частоты сердечных сокращений, повышением артериального давления крови, тормо-

жением моторной активности желудка и кишечника, возрастанием концентрации в крови адреналина.

Стимуляция ретикулярной формации, не вызывая двигательного эффекта, изменяет имеющуюся деятельность, тормозя ее или усиливая. Если у кошки короткими ритмическими раздражениями чувствительного нерва вызывать защитный рефлекс – сгибание задней лапки, а затем на этом фоне присоединить возбуждение ретикулярной формации, то в зависимости от зоны стимуляции эффект будет различен: спинальные рефлексы либо резко усилятся, либо ослабятся и исчезнут, т.е. затормозятся. Торможение возникает при стимуляции задних отделов ствола мозга, а усиление рефлексов – при стимуляции передних отделов. Соответствующие зоны ретикулярной формации получили название тормозящей и активирующей зон.

Таким образом, данный метод позволяет проводить прямое количественное измерение возбудимости структур мозга при любых состояниях.

В НЦБМТ ФМБА России данные исследования проводятся с помощью генератора электрических импульсов «Hantek-HDG2002B» и собственного программного обеспечения. Некоторые результаты исходных значений и изменения возбудимости после введения 0,1 мг/кг оланзапина представлены в таблице.

Таблица

**Эффекты электростимуляции некоторых областей головного мозга**

Электрод (зона мозга)	Фоновое значение (В)	Оланзапин, 0,1 мг/кг (В)	Реакция
1 электрод (CD)	6,8	3,6	моргание, беспокойство
2 электрод (кора)	5,8	6,7	облизывание
3 электрод (ННР)	3,4	4,2	втягивание подбородка
4 электрод (GC)	4,0	5,6	отведение головы

Примечания: CD – *nucleus caudatus* – хвостатое ядро, кора – кора больших полушарий мозга, ННР – *nucleus hypothalamicus posterior* – заднее ядро гипоталамуса, GC – *gyrus cinguli* – поясная извилина конечного мозга.

Таким образом, при локальной электрической стимуляции головного мозга наблюдаются изменения пороговых значений реакций, характеризующие параметры интрацентральных отношений.

#### • **Регистрация вызванных потенциалов**

При электрической стимуляции в лимбической коре возникают вызванные потенциалы, регистрацию которых используют в качестве метода для исследований функций коры.

Вызванные потенциалы представляют собой регистрируемые с поверхности коры электрические реакции в ответ на раздражение рецепторов, периферических нервов, таламических ядер и других образований, связанных с проведением сенсорных сигналов.

Метод регистрации вызванных потенциалов может быть использован при анализе процессов, связанных с формированием условного рефлекса. Одним из показателей этих процессов является описанная Г. Уолтером волна ожидания, или условное негативное отклонение. Если животные обучаются нажимать кнопку на второй из двух последовательных сигналов, то после ряда сочетаний первый раздражитель (звуковой щелчок) начинает вызывать волну ожидания, которая продолжается до подачи второго раздражителя (вспышка света). Волну ожидания регистрируют от поверхности головы в зоне лобных и теменных долей, она представляет собой медленное негативное колебание с амплитудой порядка 40 мкВ. Волна ожидания предшествует движению, которое должен произвести испытуемый, и, по-видимому, является электрофизиологическим отражением процессов подготовки к целенаправлен-

ному движению. Однако более детально связь волны ожидания с психическими процессами у человека пока не расшифрована [9, 13, 36].

В лаборатории нейротехнологий НЦБМТ ФМБА России этот феномен обозначается как УРВП – условно-рефлекторные вызванные потенциалы.

#### • **Нейровизуализация интрацентральных отношений с помощью электроэнцефалографии (ЭЭГ)**

Вместе с современными интраскопическими методами нейровизуализации (рентгеновская и магнитно-резонансная томография, ультразвуковое сканирование и т.д.) метод оценки функционирования головного мозга по его биоэлектрической активности – электроэнцефалографии (ЭЭГ) – широко используется в исследованиях когнитивных процессов, заболеваний нервной системы, однако клиническое значение ряда выявляемых с помощью нее феноменов продолжает оставаться предметом дискуссий [19, 21, 22, 23].

Результаты многочисленных исследований однозначно свидетельствуют о том, что регистрируемая с помощью стандартной ЭЭГ биоэлектрическая активность головного мозга является производной корковых процессов, в которых находит отражение когнитивная активность [6, 20].

Установлено, что электрограммы, регистрируемые в глубоких образованиях головного мозга и с его поверхности (ЭКоГ, ЭЭГ и т.д.), являются интегральными показателями деятельности разных его образований, отражают синаптические процессы и влияния на них, т.е. достаточно тонкие нюансы различных сторон психической деятельности. Электрограммы мозга представляют

собой стохастический (вероятностный) процесс, протекающий во времени и в пространстве [13].

У крупных животных и человека при закрытых глазах регистрируется основной  $\alpha$ -ритм ( $\alpha$ -волны с частотой 8-12 Гц, в среднем 10 Гц), или синхронизированная ЭЭГ. При открытых глазах или поступлении сигналов от других органов чувств  $\alpha$ -волны исчезают (блокада  $\alpha$ -ритма) и сменяются  $\beta$ -волнами с большей частотой (14-30 Гц; в среднем 20 Гц) и меньшей амплитудой. Это десинхронизированная ЭЭГ. Более медленные и высокоамплитудные колебания:  $\theta$ -волны (тета-ритм: 4-7 Гц, в среднем 6 Гц) и  $\delta$ -волны (дельта-ритм: 0,5-3,5 Гц, в среднем 3 Гц), но в норме у людей, в отличие от животных, они выявляются только во сне. В ЭЭГ детей характерны более медленные и нерегулярные ритмы даже в бодрствующем состоянии. «Созревание» четкого  $\alpha$ -ритма у детей происходит к 5-7 годам. У животных же (обезьяны, мини-свиньи, собаки, кошки, кролики, крысы и т.д.) низкочастотные ритмы присутствуют в бодрствующем состоянии на протяжении всей жизни. При разложении ЭЭГ быстрым преобразованием Фурье спектральные плотности мощности у животных значительно обеднены в высокочастотной области [9, 14].

У человека частотные показатели  $\alpha$ -ритма в лобно-височных отведениях достаточно выражено коррелируют с высшими мозговыми функциями [30]. Мощность  $\beta$ -активности в процессе выполнения нагрузочных проб у здоровых испытуемых достоверно увеличивается. В нормальных условиях мощность  $\beta$ -активности положительно коррелирует с показателями психомоторной скоро-

сти, в патологических условиях наблюдается усиление характеристик этого ритма [21]. Что касается  $\tau$ -активности, которая преобладает в лобно-центральных отведениях, ее частотные показатели обратно пропорциональны интеллекту. Частота  $\delta$ -ритма отрицательно коррелирует с уровнем когнитивных функций, а его мощность – положительно [29].

У животных на кору головного мозга ретикулярная формация оказывает активизирующее воздействие, поддерживая состояние бодрствования и концентрируя внимание. Если у спящей кошки с живленными в промежуточный мозг электродами включить раздражение ретикулярной формации, то кошка просыпается, открывает глаза. На ЭЭГ видно, что исчезают медленные волны, характерные для сна, и появляются быстрые волны, свойственные состоянию бодрствования [38].

В рамках данной работы нами было разработано программное обеспечение для математического анализа результатов.

В основе метода сравнительного анализа лежит методика оценки изменений в частотной области спектра снятых ЭЭГ до воздействия исследуемых факторов (фоновые данные) и после. Метод позволяет увидеть возбуждение или депрессию активности исследуемых областей мозга в определенных ЭЭГ-ритмах.

Метод оценки спектра частотной области ЭЭГ известен давно, но сравнительный анализ спектров с разницей по времени применяется впервые. Основой является преобразование отсчетов оцифрованного сигнала ЭЭГ  $x(t)$  в амплитудный спектр  $f(\omega)$  посредством преобразования Фурье (1).

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)e^{-2\pi i\omega t} dt \quad (1)$$

В реальной практике применен вариант быстрого преобразования Фурье (2), поскольку он обеспечивает высокую скорость работы программного комплекса.

$$X_{TN}(k) = \sum_{n=0}^M x(nT) \omega \left(\frac{n}{M}\right) e^{-2\pi i \frac{kn}{N}},$$

где  $k=0,1\dots N-1$  (2)

Как известно из теоремы Котельникова (Шеннона-Найквиста), максимальная частота оцифровки сигнала должна быть как минимум в два раза выше максимальной частоты исследуемого амплитудного спектра, из чего следует, что при частоте оцифровки ЭЭГ в 500 Гц на используемом оборудовании (электроэнцефалограф «Нейрон-Спектр 1/В», ООО «Нейрософт», г. Иваново, Россия; электроэнцефалограф-анализатор «Энцефалан-131-03», ООО НПКФ «Медиком МТД», г. Таганрог, Россия) максимальная частота исследуемого спектра не может быть выше 250 Гц, что гораздо выше верхней частоты интересующего нас  $\beta$ -диапазона (35 Гц).

Следует отметить, что одного лишь перехода в амплитудно-спектральную область в данном случае недостаточно, поэтому в программном комплексе применен цифровой полосовой фильтр с граничными частотами 0,5-35 Гц. Нижний диапазон фильтрации (до 0,5 Гц) необходим для отсеивания помех низкочастотных составляющих сигнала ЭЭГ, которые очень часто меняются даже в рамках одного измерения, а фильтрация выше 35 Гц позволяет отсеять неисследуемые частоты высшего порядка (высшие  $\gamma$ -ритмы).

Одним из немаловажных вопросов является выбор количества точек квантования амплитудного спектра (точек отображения спектра на Герц), поскольку от этого во многом зависит удобство визуального восприятия спектра и быстрый поиск аномалий, трендов и особенностей спектра во время анализа. Эмпирическим путем было установлено, что оптимальным является диапазон 5-15 точек на Герц. Также нужно отметить, что от выбора точек квантования напрямую зависит длительность снятия ЭЭГ, и минимизация этого временного интервала при работе с животными существенно увеличивает достоверность результата.

Однако основной новизной разработанной программы является возможность математического сравнения двух или более спектров с помощью необходимых математических операций над ними (вычитание, деление и т.д.), которая позволяет четко проследить увеличение или уменьшение спектральной составляющей на конкретной частоте или в диапазоне частот.

На рис. 4 представлен анализ ЭЭГ, полученный с применением программного обеспечения, на примере сравнения фонового спектра и спектра спустя 4 ч после однократного перорального введения 1 мг/кг препарата клозапин (спектр пронормирован по фоновому спектру ЭЭГ) в области CD (*nucleus caudatus*, хвостатое ядро).

Из данного рисунка следует, что действии препарата характеризуется преимущественным повышением значений практически всех ЭЭГ-ритмов по сравнению с фоновыми значениями, однако в некоторых частотных областях  $\delta$ - и  $\beta$ -ритмов отмечается значительная депрессия биоэлектрических импульсов.

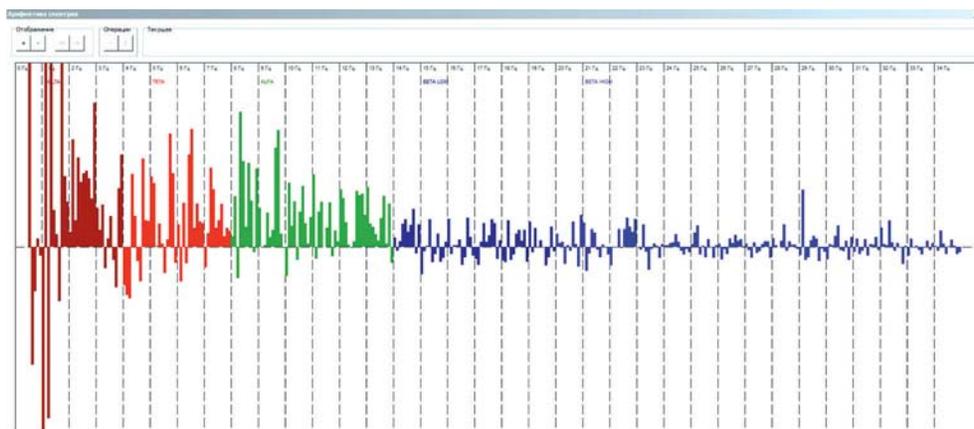


Рис. 4. Сравнительный спектр ЭЭГ при действии клозапина (1 мг/кг).

### Конвергентная и дискриминантная валидность в пространстве когнитивных процессов

Умеренные когнитивные расстройства определяют необходимость поиска новых инструментальных методов исследования, в т.ч. электроэнцефалографических. Значимые различия у больных дисциркуляторной энцефалопатией и здоровых испытуемых имели место в фоновой записи, а также при выполнении тестов на память и речевую активность, причем больше – в передних отведениях (лобных, центральных и височных), преимущественно в области  $\alpha$ - и  $\tau$ -диапазонов [16, 20].

Однако пока отсутствуют высокоинформативные методы дифференциальной диагностики синдромов когнитивных нарушений, сопровождающихся изменением интеллектуальной деятельности.

Современные информационные технологии позволяют количественно установить степень близости прямой и обратной связей (конвергентная валидность) или отсутствие связей (дискриминантная валидность) различных

органов и систем организма, биопотенциалов, поведенческих реакций и т.д.

Исследователями ЭЭГ выявлены корреляции мощности различных ритмов ЭЭГ с уровнем познавательной деятельности, в т.ч. и при выполнении нагрузочных проб [21, 29], когда животным предъявляются сигналы различной модальности (свет, звук, электроток) и вырабатываются простейшие навыки познавательного поведения.

Обнаружены достоверные изменения в различных диапазонах ЭЭГ при интеллектуальной нагрузке, в т.ч. изменения мощности  $\alpha$ -,  $\tau$ - и  $\beta$ -ритмов при запоминании слов в случае их звукового предъявления [1].

Спектральный анализ также показал, что когнитивные нарушения отражались на параметрах  $\alpha$ - и  $\delta$ -ритма. Чем ниже мощность  $\alpha$ -ритма и выше  $\delta$ -ритма, тем более выражены патологические процессы, связанные с когнитивными нарушениями, в головном мозге у больных с энцефалопатиями. Спектральные характеристики  $\alpha$ -активности, по данным литературы, слабо коррелируют с уровнем интеллекта, но сам  $\alpha$ -ритм является

производным когнитивной деятельности, поэтому снижение его мощности по сравнению с контрольной группой можно рассматривать как отражение более низкой когнитивной активности [5, 16].

Таким образом, изменения когнитивной деятельности находят отражения в ЭЭГ, отличающихся у животных, у больных с энцефалопатиями и здоровых лиц. Особенно значимые изменения получены в  $\alpha$ - и  $\delta$ -диапазонах, что может служить одним из критериев когнитивных нарушений и делает возможным расширение экспериментов на животных.

### **Психофармакологический аспект интрацентральных отношений**

Большинство научных исследований в области фармакологии обычно сконцентрировано на оценке характеристик действия различных синтетических препаратов на организм. Но оценка воздействия на мозг эндогенных соединений и выявления сходства между реакциями эндогенных соединений и психотропными веществами приобрела особое значение в связи с тем, что рецепторные и нейрохимические механизмы, которые формировались, а затем использовались в течение миллионов лет эволюции для защиты организма от неблагоприятных воздействий внешней среды, – те же самые, что используются организмом и в настоящее время. Когда мы изучаем качественные и количественные аспекты влияния психотропных средств на мозг человека, мы на самом деле исследуем эволюционные варианты, адаптацию и нюансы, которые использовались мозгом и развивались так, чтобы организм мог приспособиться и выжить в окружении ксенобиотиков.

Безотносительно к тому, в какой форме мозг в ответ на психотропные воздействия восстанавливает свое равновесие, которое можно описать с помощью концепций Г. Спенсера, гомеостаза по В. Кэнону, или же с помощью принципа Ле-Шателье в биологии, общность этой проблемы носит фундаментально термодинамический характер, т.е. несмотря на разнообразие воздействий со стороны различных групп психотропных препаратов, общность их воздействий на мозг стремится к поддержанию высокоупорядоченного, или неэнтропийного, состояния с помощью неспецифических адаптационных механизмов, сформировавшихся в процессе эволюции.

Поэтому характер реакций мозга на воздействие психотропных препаратов может рассматриваться как согласованная адаптация на различных уровнях иерархии мозга, направленная на то, чтобы поддержать поведенческое, нейрохимическое, мембранное и другие состояния, имеющие очень малую вероятность своего появления в обычных условиях (табл., рис. 4).

Таким образом, иерархия психоуниротропизма связана с иерархией неспецифических адаптационных механизмов мозга к внешним и внутренним воздействиям, а общая ответная реакция организма на самые разные психотропные препараты – единая. Просто отдельные вещества вносят свои мазки в многоцветную палитру и спектр психической деятельности, что мы познаем через крупинки знаний, одной из которых является нейровизуализация эффектов психотропных средств [10].

Процессы, происходящие в мозге с клетками и молекулами, лежат в основе нашей психической жизни, и именно за

счет манипуляций с такими процессами работают самые впечатляющие физические методы психотерапии. Так, антидепрессанты воздействуют на нейромедиаторы, обычно усиливая действие тех, которые относятся к группе аминов: серотонина, дофамина и норадреналина. Проводимые в настоящее время исследования микроскопических реакций в мозге помогают разрабатывать препараты для борьбы с приобретенным слабоумием, болезнью Паркинсона и последствиями инсульта. Некоторые ученые полагают, что ключ к тайнам сознания кроется именно в таких реакциях или что его нужно искать на еще более глубоком уровне – в квантовых процессах, происходящих где-то в недрах крошечных клеток нашего мозга [35].

### **Нейровизуализация эффектов психотропных средств на основе фарм-ЭЭГ**

Полученные двумерные распределения потенциалов активности корковых и подкорковых структур мозга по поверхности коры мозга или в той или иной подкорковой нейронной структуре анализируются с помощью методов гармонического спектрального анализа (Фурье-преобразование), кластеризации, нелинейных методов (вейвлет-анализ), корреляционным, когерентным и стохастическим приемами. Эти тесты выявляют функциональные связи разных областей мозга, которые, возможно, лежат в основе высших психических функций.

Двумерное представление биопотенциалов преобразуется в трехмерное путем анализа локализации в мозге эквивалентных токовых диполей или построения динамических картин, на-

пример, при спектральном анализе. Разработка новых математических методов анализа ЭЭГ и ВП, на основе теории хаоса, а также совместные исследования в сопоставимых условиях с другими методами функционального тестирования мозга – например, с фМРТ – открывает широкие горизонты оценки функционально-динамических процессов, фармакодинамики лекарств и токсикодинамики ксенобиотиков.

Использование методов фарм-ЭЭГ позволило выявить сходство ЭЭГ-реакций внутри каждого класса и отличия между разными классами психотропных препаратов – нейролептиками, транквилизаторами, антидепрессантами и психостимуляторами [10, 26]. Фарм-ЭЭГ-исследования с достаточной достоверностью выявляют любые вещества, влияющие на ЦНС, т.к. позволяют нейровизуализировать наличие изменений в ЭЭГ. В то же время отсутствие таких изменений при систематическом изучении вещества свидетельствует об отрицательном функциональном влиянии на ЦНС. Кроме того, при использовании этих методов создается основа для проведения скрининга с целью выявления нейротропных свойств, а, в некоторых случаях, и прогнозирования психотропных свойств препарата [10, 26, 27].

В качестве примера приведем исследование препарата Флафензин – агониста дофаминовых рецепторов мозга, обладающего антидепрессивной активностью с психостимулирующим эффектом. Отведения ЭЭГ осуществлялись от прореальной извилины, медиодорсального ядра таламуса, дорсального отдела гиппокампа и базолатерального отдела миндалевидного комплекса мозга кошек.

Результаты кластерного анализа ди-

намических спектров мощности ЭЭГ после введения Флафензина представлены на рис. 5 и 6. В прореальной извилине в период T1 наблюдалось значительное увеличение вероятности появления (0,85) сегментов ЭЭГ, отнесенных в кластер A1. Амплитудно-частотные характеристики фрагментов ЭЭГ кластера A1 были характерны для процессов десинхронизации биоэлектрической активности. Одновременно отмечалось некоторое увеличение (0,715) вероятности появления сегментов ЭЭГ, принадлежащих к кластеру A3 и имеющих пик спектральных составляющих в диапазоне 10-13 Гц. Подобные изменения структуры наблюдались в отведениях ЭЭГ от дорсального отдела гиппокампа и медиодорсального ядра таламуса, т.е. значительно увеличивалась вероятность появления сегментов ЭЭГ со стохастической

низкоамплитудной активностью за счет уменьшения вероятности и появления сегментов с высокоамплитудной ритмической активностью.

В миндалевидном комплексе в период T1 наблюдалось повышение вероятности появления сегментов ЭЭГ с низкоамплитудной ритмической активностью в диапазоне 1-6 Гц. В период T2 наиболее существенные изменения структуры ЭЭГ происходили в медиодорсальном ядре таламуса и, в меньшей степени, в дорсальном отделе гиппокампа. Основные изменения динамической структуры ЭЭГ в этих отведениях происходили за счет увеличения вероятности появления сегментов ЭЭГ из кластеров Г2 и Б2. Спектр мощности этих сегментов имел два пика составляющих в диапазонах 10-13 и 1-4 Гц.

Таким образом, Флафензин вызывал

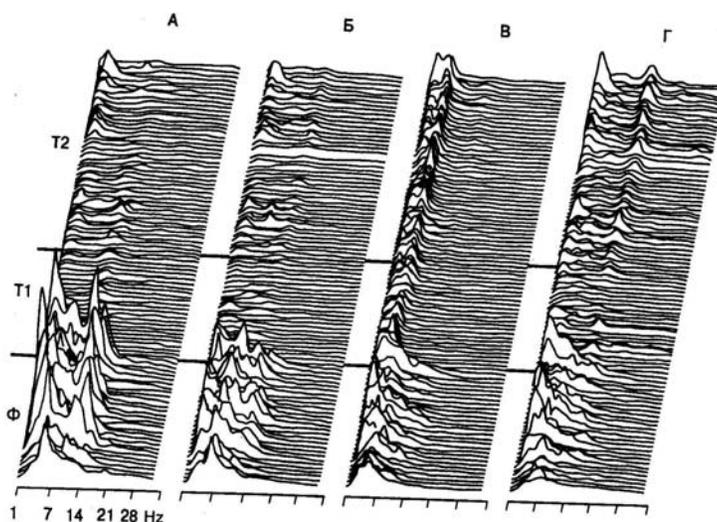


Рис. 5. Влияние Флафензина в дозе 1 мг/кг на динамические спектры мощности фарм-ЭЭГ. А – прореальная извилина; Б – дорсальный отдел гиппокампа; В – базолатеральные отделы миндалевидного комплекса; Г – медиодорсальное ядро гипоталамуса; Ф (фон) – время анализа ЭЭГ до введения препарата (60 мин); T1=40 мин и T2=140 мин после введения препарата.

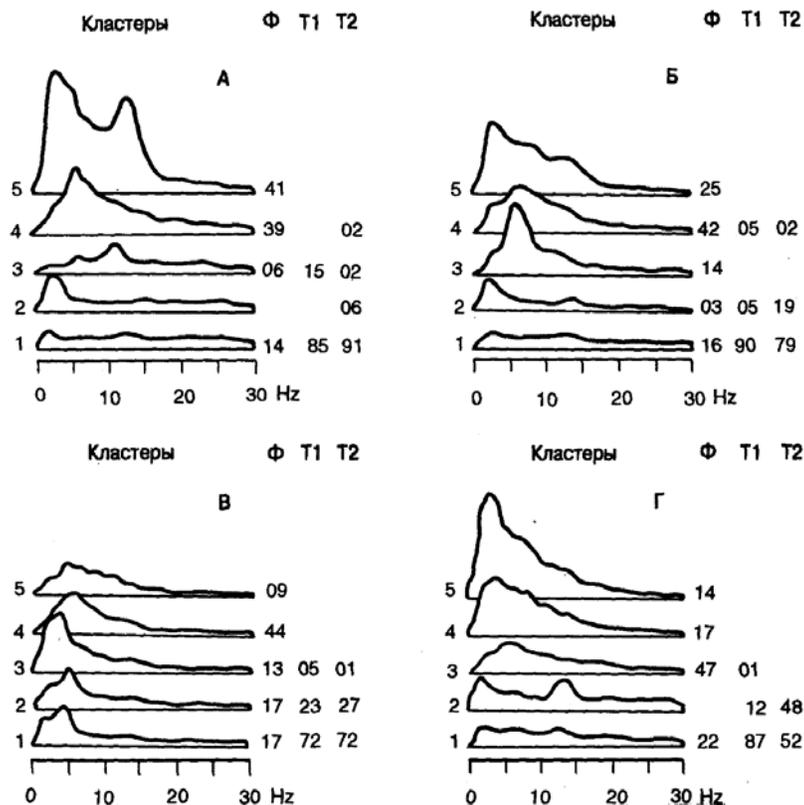


Рис. 6. Влияние Флафензина в дозе 1 мг/кг на кластерную структуру фарм-ЭЭГ. Области мозга те же, что и на рис. 5. Φ (фон) – вероятность появления каждого кластера в течение 60 мин до введения препарата; T1=40 мин и T2=140 мин после введения препарата.

следующие основные изменения в динамической структуре ЭЭГ: значительно снижалась мощность спектральных составляющих в диапазоне 1-21 Гц; увеличивался вклад в структуру ЭЭГ частот в диапазоне 21-32 Гц; на ЭЭГ, регистрируемой в миндалевидном комплексе, появлялся пик спектральной мощности в диапазоне 1-4 Гц; на ЭЭГ медиодорсального ядра таламуса спустя примерно 50 мин после введения препарата появлялся пик спектральных составляющих в диапазоне 10-13 Гц.

Известно, что в ЦНС действует метод

анalogии: чем сильнее воздействие, тем мощнее электрический импульс в нейроне. В нейроэлектрохимических процессах природа предусмотрела альтернативный путь передачи интенсивности сигнала за счет изменения его частоты, а не интенсивности. Иными словами, расширение диапазона интенсивности ощущений и предотвращение сбоев в ЦНС достигается более мощными стимулами за счет генерации умеренной мощности сигналов, но с более высокой частотой. Это в конечном итоге обеспечивает выброс тех или иных трансмис-

теров, в пространстве которых действуют психотропные средства.

### **Нелинейный анализ интрацентральных отношений как детерминированного хаоса**

Анализ ЭЭГ методами описания нелинейных динамических систем приобретает все более широкое распространение. В этом плане исследуемые процессы ЭЭГ скорее являются хаотическими, или содержат в себе детерминированный хаос [8]. С точки зрения линейных методов анализа, эти процессы, действительно, стохастические. Однако нелинейный анализ показывает, что хоть их и нельзя причислить к детерминированным, абсолютно случайными они тоже не являются [28]. Существуют различные формальные характеристики хаотических процессов, показывающие, насколько они стохастичны [25], причем, в этом случае важны только прогнозируемые значения изучаемого временного ряда, который, в свою очередь, является изменяющейся во времени характеристикой данного объекта.

При использовании этого подхода исследователь получает не конкретные значения нелинейных характеристик ЭЭГ, а их изменения под влиянием внешних или внутренних факторов [7]. Численные значения нелинейных характеристик ЭЭГ пока трудны для интерпретации [18, 31]. Хаотичный процесс располагается в пространстве и представляет собой нечто среднее между шумом и детерминированным процессом.

Из вышесказанного следует, что для представителей основных классов психотропных средств существуют информативные диапазоны фарм-ЭЭГ в области 9-12 Гц и информативные

зоны, находящиеся в лобном полюсе мозга человека, а у животных – в прореальной извилине. Выявить некоторые признаки психоунитропизма по фарм-ЭЭГ возможно, воспользовавшись подходом применения нелинейного анализа динамических систем на основе анализа процесса как детерминированного хаоса [8, 17, 18] и его нейровизуализации.

Несмотря на отсутствие системы уравнений, моделирующих биоэлектрическую активность мозга, можно изучать поведение системы по выходным данным ЭЭГ, когда под понятием динамической системы подразумевается информация, необходимая для определения всего будущего поведения системы. Применение методов теории детерминированного хаоса для анализа ЭЭГ обусловлено тем, что мозг как нестатическая система является чувствительной к начальным условиям, а значит, следует выделять такие динамические инварианты системы как фрактальная размерность траектории, совпадающая с корреляционной размерностью [15].

Анализ нелинейных систем связан с расчетом ее аттракторов (to attract – тянуть, притягивать). При любых начальных условиях виртуальные перемещения системы приводят ее в определенную область фазового пространства в соответствии с ее фазовой траекторией. Эту функцию фазовой траектории потому и называют аттрактором системы, что все траектории ее состояния стягиваются к ее аттрактору.

Хаотический процесс в пределах аттрактора зависит от начальных условий, но как бы далеки системы не оказались, сходясь, они, в силу гамильтонианы, никогда не пересекутся. Поэтому раз-

мерность хаотической системы всегда меньше, чем размерность фазового пространства. Аттракторы имеют целочисленные значения размерностей, а системы с нецелочисленной размерностью называются фракталами. Однако существуют системы с детерминированным периодическим процессом, относимые к аттракторам, хотя их размерность целочисленна. Аттракторы хаотических процессов, или странные аттракторы, следует отнести к фракталам, но математически это не доказано.

### **Программно-аппаратный комплекс (нейромодуль) для оценки интрацентральных отношений головного мозга**

В результате проведенной прикладной научно-исследовательской работы разработан программно-аппаратный комплекс (нейромодуль), в структуре которого заложены методики и подходы, необходимые для оценки интрацентральных отношений головного мозга. Схема нейромодуля представлена на рис. 7.

### **Заключение**

В рамках Государственного задания на выполнение прикладной научно-исследовательской работы по теме: «Разработка принципов и методов оценки нейрпсихоактивных соединений на основе модулирования интрацентральных отношений головного мозга», согласно техническому заданию на 2017 г., разработаны методы и критерии оценки интрацентральных отношений головного мозга животных.

Описана конвергентная валидация интрацентральных отношений, основанная на общности результатов, полу-

чаемых с помощью различных методов и критериев оценки работы головного мозга и высшей нервной деятельности исследуемых животных-биомоделей.

Изучены психофизиологический, электрофизиологический и психофармакологический аспекты интрацентральных отношений головного мозга.

Разработан программно-аппаратный комплекс (нейромодуль) для анализа интрацентральных отношений головного мозга и их конвергентной валидации.

В хроническом эксперименте вживлены изготовленные электродные конструкции в информативные области головного мозга кошек.

Осуществлена регистрация параметров ЭЭГ и вызванных потенциалов на основе локальной электрической активации головного мозга крупных лабораторных животных.

Разработано программное обеспечение для проведения электрической активации информативных областей головного мозга и анализа результатов ЭЭГ.

Составляется база и банк данных по исследуемым с помощью указанных методик животным.

Сопоставление аттракторов фарм-ЭЭГ и показателей психофизиологического тестирования позволяет выделить психоактивирующие и психонормализующие компоненты фармакологических средств.

Установлено, что конвергентные психоактивирующие влияния характеризуются уплотнением ядра аттрактора в диапазоне 9-11 Гц, смещением к большим значениям по оси Z и подъемом трех «хвостов» по оси Y, а психогармонизирующие проявления сопровождаются значительным расширением ядра преимущественно в низкочастотный ди-

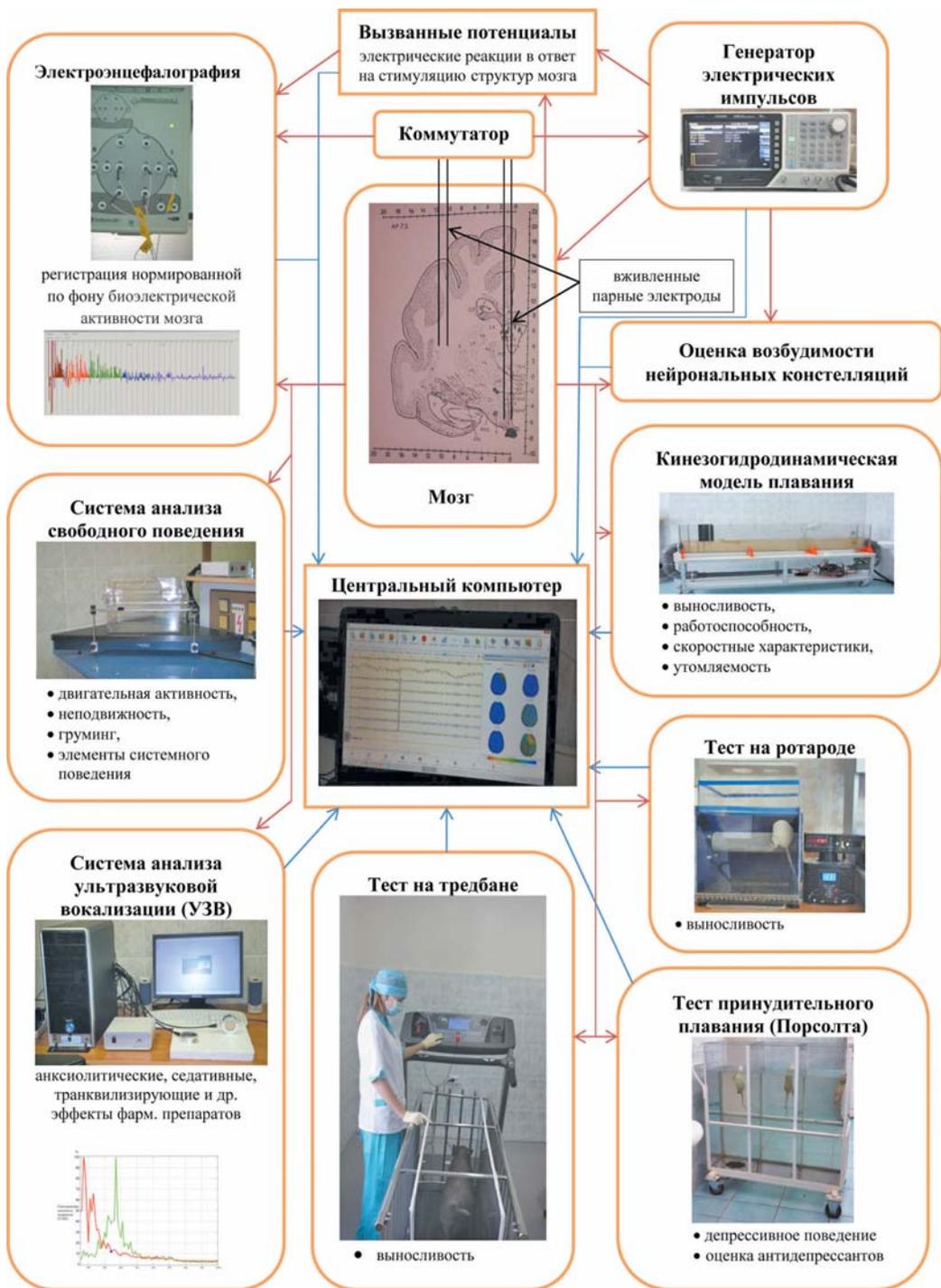


Рис. 7. Нейромодуль – программно-аппаратный комплекс для конвергентной валидации интрацентральных отношений головного мозга животных.

апазон и снижением «хвостов» по оси Y.

Все психотропные средства действуют в едином рецепторном пространстве ацетилхолина, серотонина, ГАМК и т.д., а сами нейротрансмиттеры активно взаимодействуют между собой. Выделить рациональное ядро, характеризующее именно «психотропность» лекарств в настоящем хаосе данных, является малореальной задачей, поэтому новые математические взгляды, в т.ч. теории хаоса и их современный математический аппарат, дают надежду на прогресс в направлении биомоделирования интрацентральных отношений.

Работа по данной теме продолжается.

### Список литературы

1. *Адрианов О.С., Молодкина Л.Н.* К вопросу о влиянии лобэктомии на способность кошек решать электрополяционную задачу // Журн. высш. нервн. деятельн., 1969, т. 19, вып. 4, с. 593-601.
2. *Бакузова Д.В., Кижеватова Е.А., Ефремов В.В., Омельченко В.П.* Возможности дискриминантного анализа электроэнцефалограммы в диагностике сосудистых умеренных когнитивных расстройств // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии, 2015, № 8, с. 41-45.
3. *Батуев А.С.* Высшие интегративные системы мозга. - Л.: Наука, 1981. 255 с.
4. *Батуев А.С.* Эволюция лобных долей и интегративная деятельность мозга. - Л.: Медицина, 1973, 128 с.
5. *Бехтерева Н.П.* Нейрофизиологические аспекты психической деятельности человека. Изд. 2-ое, перераб. и доп. - Л.: Медицина, 1974. 151 с.
6. *Вейсман М.* Скрытые возможности нашего мозга. - СПб.: Вектор, 2012, 325 с.
7. *Гнездицкий В.В.* Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография. - Таганрог: Изд-во ТРТУ, 2000, 268 с.
8. *Ефремова Т.Н., Куликов М.А.* Хаотическая составляющая высокочастотной ЭЭГ человека в состоянии спокойного бодрствования // Журн. высш. нервн. деятельности, 2002, т. 52, № 3, с. 283-291.
9. *Кануников И.Е., Антонова Е.В., Белов Д.Р., Марков Ю.Г.* Применение теории динамического хаоса для анализа энцефалограмм // Вестник СПбГУ, серия 3 (биология), 1998, вып. 1, № 3, с. 55-61.
10. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. - М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 2004.
11. *Каркищенко Н.Н.* Психонитропизм лекарственных средств. - М.: Медицина, 1993.
12. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т.1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. - М.: Изд-во ВПК, 2007, 320 с.
13. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. - М.: Изд-во ВПК, 2007, 448 с.
14. *Каркищенко Н.Н.* Фармакология системной деятельности мозга. - Ростов: Ростиздат, 1975, 152 с.
15. *Каркищенко Н.Н., Омельченко В.П.* Критерии стационарности электрограмм как показатели функционального состояния мозга человека и животных // Тез. докл. Всесоюз. конф. по нейрокибернетике, Ростов-на-Дону, 1972, с. 132.
16. *Каркищенко Н.Н., Омельченко В.П.* Сравнительная оценка стационарности дисперсии электрограмм мозга при действии нейролептиков и антидепрессантов // В сб. Некоторые вопросы современной нейрофармакологии. - Ростов-на-Дону, 1972, с. 14.
17. *Кижеватова Е.А., Омельченко В.П.* Информационные технологии в исследовании когнитивных функций // Фундаментальные исследования, 2015, № 2, с. 3768-3772.
18. *Меклер А.А.* Обработка ЭЭГ методами фрактального анализа // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова, 2004, т. 90, № 8, с. 77.
19. *Меклер А.А.* Применение аппарата нелинейного анализа динамических систем для обработки сигналов ЭЭГ // В сб.: Актуальные проблемы современной математики: ученые записки. Т. 13 (вып. 2) / Под ред. проф. Калашникова Е.В. - СПб.: Изд-во ЛГУ, 2004, с. 112-140.
20. *Михальчик И.О., Омельченко В.П.* Нелинейный анализ ритмических составляющих электроэнцефалограммы человека в норме // Известия Южного федерального университета. Технические науки, 2014, № 10 (159), с. 52-59.
21. *Омельченко В.П., Тимошенко Е.А.* Применение дискриминантного анализа для классификации ЭЭГ больных диабетической энцефалопатией // Инженерный вестник Дона, 2012, т. 22, № 4-1(22), с. 16.
22. *Полунина А.Г.* Показатели электроэнцефалограммы при оценке когнитивных функций // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2012, № 7, с. 74-82.

23. *Смычков А.С.* Прогнозирование функционального восстановления и исхода острого периода полушарного ишемического инсульта по данным электроэнцефалографии: автореф. дис. ... к.м.н. - М., 2011, 27 с.
24. *Цыган В.Н., Боголюбовский М.М., Миролюбов А.В.* Электроэнцефалография / Под ред. М.М. Дьяконова. - СПб.: Наука, 2008, с. 19-23.
25. *Adrianov O.S., Molodkina L.I., Mukhin E.I., Shugalev N.P., Yamshikova N.G.* Participation of caudate nucleus in different forms of voluntary activity in cats // *Acta neurobiol. exp.*, 1980. V. 4-0. P. 729-70.
26. *Essex C., Nerenberg M.A.H.* Comment on «Deterministic Chaos: The Science and the Fiction» by D. Ruelle. - *Proc. R. Soc. Lond. A*, 1991, 435, pp. 287-292.
27. *Herrman W.N.* Pharmac EEG // *Meth. and. find. exp. clin. pharmacol.*, 1981. Vol. 3. Pp. 55-76.
28. *Itil T.M.* Short pharmac EEG analysis by measure. - Oxford Press, 2005, 314 p.
29. *Lutzenberger W., Birbaumer N., Flor H., et al.* Dimensional analysis of the human EEG and intelligence // *Neurosci Lett.*, 1992. Vol. 143. No. 1-2. Pp.10-40.
30. *Marosi E., Rodriguez H., Harmony T., Yanez G., Rodriguez M., Bernal J., Fernandez T., Silva J., Reyes A., Guerrero V.* Broad band spectral EEG parameters correlated with different IQ. Measurements // *Int. J. Neuroscience*. 1999. No. 97. P. 17-27.
31. *Polunina A.G., Davydov D.M.* EEG correlates of Wechsler Adult Intelligence Scale // *Int. J. Neurosci*. 2006. No. 116(10). P. 1231-1248.
32. *Pribram K.* Languages of the brain: Experimental paradoxes and principles in neuropsychology. - N.Y.: Prentice Hall/Brandon house, 1971.
33. <http://www.activestudy.info/emocii-kak-faktor-povedeniya-zhivotnyx/>
34. <http://biofile.ru/bio/4686.html>
35. [https://elementy.ru/bookclub/chapters/432272/Kak\\_rabotaet\\_mozg\\_Glava\\_iz\\_knigi](https://elementy.ru/bookclub/chapters/432272/Kak_rabotaet_mozg_Glava_iz_knigi)
36. <http://medimet.info/gipotalamus.html>
37. <http://odn.org.ua>
38. <https://psychneuro.wordpress.com/2014/02/21/money-the-reticular-formation/>
3. *Batuev A.S.* Vysshie integrativnye sistemy mozga. - L.: Nauka, 1981, 255 s.
4. *Batuev A.S.* Ehvoluyuciya lobnyh dolej i integrativnaya deyatel'nost' mozga. - L.: Medicina. 1973. 128 s.
5. *Bekhtereva N.P.* Nejrofiziologicheskie aspekty psicheskoy deyatel'nosti cheloveka. Izd. 2-oe, pererab. i dop. - L.: Medicina. 1974. 151 s.
6. *Vejsman M.* Skrytye vozmozhnosti nashego mozga. - SPb.: Vektor. 2012. 325 s.
7. *Gnezdickij V.V.* Obratnaya zadacha EhEhG i klinicheskaya ehlektroehcefalografiya. - Taganrog: Izd-vo TRTU. 2000. 268 s.
8. *Efremova T.N., Kulikov M.A.* Haoticheskaya sostavlyayushchaya vysokochastotnoj EhEhG cheloveka v sostoyanii spokojnogo bodrstvovaniya // *Zhurn. vyssh. nervn. deyatel'nosti*, 2002, t. 52, № 3, s. 283-291.
9. *Kanunikov I.E., Antonova E.V., Belov D.R., Markov YU.G.* Primenenie teorii dinamicheskogo haosa dlya analiza ehncefalogramm // *Vestnik SPbGU, seriya 3 (biologiya)*. 1998, vyp. 1, № 3, s. 55-61.
10. *Karkischenko N.N.* Osnovy biomodelirovaniya. - M.: Mezhakademicheskoe izd-vo VPK. 2004.
11. *Karkischenko N.N.* Psihounitropizm lekarstvennyh sredstv. - M.: Medicina. 1993.
12. *Karkischenko N.N.* Al'ternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodelirovaniya. - M.: Izd-vo VPK. 2007. 320 s.
13. *Karkischenko N.N.* Al'ternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i al'ternativy farmakotoksikologii. - M.: Izd-vo VPK. 2007. 448 s.
14. *Karkischenko N.N.* Farmakologiya sistemnoj deyatel'nosti mozga. - Rostov: Rostizdat. 1975. 152 s.
15. *Karkischenko N.N., Omel'chenko V.P.* Kriterii stacionarnosti ehlektrogramm kak pokazateli funkcional'nogo sostoyaniya mozga cheloveka i zhivotnyh // *Tez. dokl. Vsesoyuzn. konf. po nejro kibernetike*, Rostov-na-Donu, 1972, s. 132.
16. *Karkischenko N.N., Omel'chenko V.P.* Sravnitel'naya ocenka stacionarnosti dispersii ehlektrogramm mozga pri dejstvii nejroleptikov i antidepressantov // *V sb. Nekotorye voprosy sovremennoj nejrofarmakologii*. - Rostov-na-Donu, 1972, s. 14.
17. *Kizhevatoeva E.A., Omel'chenko V.P.* Informacionnye tekhnologii v issledovanii kognitivnyh funkciy // *Fundamental'nye issledovaniya*, 2015, № 2, s. 3768-3772.
18. *Mekler A.A.* Obrabotka EhEhG metodami fraktal'nogo analiza // *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova*, 2004, t. 90, № 8, s. 77.
19. *Mekler A.A.* Primenenie apparata nelinejnogo analiza dinamicheskikh sistem dlya obrabotki signalov EhEhG // *V sb.: Aktual'nye problemy sovremennoj matematiki: uchenye zapiski*. T. 13 (vyp. 2) / Pod red. prof. Ka-

## References

1. *Adrianov O.S., Molodkina L.N.* K voprosu o vliyaniy lobekhtomii na sposobnost' koshek reshat' ehlektropolyacionnyu zadachu // *Zhurn. vyssh. nervn. deyatel'n.*, 1969, t. 19, vyp. 4, s. 593-601.
2. *Bakuzova D.V., Kizhevatoeva E.A., Efremov V.V., Omel'chenko V.P.* Vozmozhnosti diskriminantnogo analiza ehlektroehncefalogrammy v diagnostike sosudistyh umerennyh kognitivnyh rasstrojstv // *Vestnik nevrologii, psichiatrii i nejrohirurgii*, 2015, № 8, s. 41-45.

- lashnikova E.V. - SPb.: Izd-vo LGU, 2004, s. 112-140.
20. *Mihal'chich I.O., Omel'chenko V.P.* Nelinejnyj analiz ritmicheskikh sostavlyayushchih ehlektroehncefalogrammy cheloveka v norme // *Izvestiya Yuzhnogo federal'nogo universiteta. Tekhnicheskie nauki*, 2014, № 10 (159), s. 52-59.
  21. *Omel'chenko V.P., Timoshenko E.A.* Primenenie diskriminantnogo analiza dlya klassifikatsii EhEhG bol'nyh diabeticheskoy ehncefalopatiej // *Inzhenernyj vestnik Dona*, 2012, t. 22, № 4-1(22), s. 16.
  22. *Polunina A.G.* Pokazateli ehlektroehncefalogrammy pri ocenke kognitivnyh funkcij // *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova*, 2012, № 7, S. 74-82.
  23. *Smychkov A.S.* Prognozirovaniye funktsional'nogo vosstanovleniya i iskhoda ostrogo perioda polusharnogo ishemicheskogo insul'ta po dannym ehlektroehncefalografii: avtoref. dis. ... k.m.n. - M., 2011, 27 s.
  24. *Cygan V.N., Bogolovskij M.M., Mirolyubov A.V.* Ehlektroehncefalografiya / Pod red. M.M. D'yakonova. - SPb.: Nauka, 2008, s. 19-23.
  25. *Adrianov O.S., Molodkina L.I., Mukhin E.I., Shugalev N.P., Yamshikova N.G.* Participation of caudate nucleus in different forms of voluntary activity in cats // *Acta neurobiol. exp.*, 1980. V. 4-0. P. 729-70.
  26. *Essex C., Nerenberg M.A.H.* Coment on «Deterministic Chaos: The Science and the Fiction» by D. Ruelle. – *Proc. R. Soc. Lond. A*, 1991, 435, pp. 287-292.
  27. *Herrman W.N.* PharmacoeEG // *Meth. and. find. exp. clin. pharmacol.*, 1981. Vol. 3. Pp. 55-76.
  28. *Itil T.M.* Short pharmacoeEG analysis by measure. Oxford Press. 2005. 314 p.
  29. *Lutzenberger W., Birbaumer N., Flor H., et al.* Dimensional analysis of the human EEG and intelligence // *Neurosci Lett.*, 1992. Vol. 143. No. 1-2. Pp. 10-40.
  30. *Marosi E., Rodriguez N., Harmony T., Yanez G., Rodriguez M., Bernal J., Fernandez T., Silva J., Reyes A., Guerrero V.* Broad band spectral EEG parameters correlated with different IQ. Measurements // *Int. J. Neuroscience*. 1999. No. 97. P. 17-27.
  31. *Polunina A.G., Davydov D.M.* EEG correlates of Wechsler Adult Intelligence Scale // *Int. J. Neurosc.* 2006. No. 116(10). P. 1231-1248.
  32. *Pribram K.* Languages of the brain: Experimental paradoxes and principles in neuropsychology. - N.Y.: Prentice Hall/Brandon house, 1971.
  33. <http://www.activestudy.info/emocii-kak-faktor-povedeniya-zhivotnyx/>
  34. <http://biofile.ru/bio/4686.html>
  35. [https://elementy.ru/bookclub/chapters/432272/Kak\\_rabotaet\\_mozg\\_Glava\\_iz\\_knigi](https://elementy.ru/bookclub/chapters/432272/Kak_rabotaet_mozg_Glava_iz_knigi)
  36. <http://medimet.info/gipotalamus.html>
  37. <http://odn.org.ua>
  38. <https://psychneuro.wordpress.com/2014/02/21/money-the-reticular-formation/>

## Convergent validation of intracentral animals brain relations

N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, V.N. Karkischenko, L.A. Taboyakova, M.I. Mokrousov, O.V. Alimkina

Convergent validation of intracentral relations is based on the generality of the results obtained with the help of various methods and criteria for evaluating the work of the brain and higher nervous activity of the studied animal biomodels. A software-hardware complex (neuromodule) is developed, which is necessary for studying the psychophysiological, electrophysiological and psychopharmacological aspects of intracentral brain relations. The methods and approaches laid down in the structure of the neuromodule are described in the article. In the chronic experiment, the make electrode constructions were implanted into informative regions of the brain of cats. By means of local electrical activation of the brain, the evoked potentials and the parameters of the electroencephalography were recorded, for the interpretation of the results of which software was developed on the basis of modern mathematical techniques. A unified database and a data bank are compiled for all animals that are studied with the help of these techniques, which facilitate the objectification of the results of the analysis of intracentral relationships of the brain.

**Key words:** intracentral relations, brain, convergent validation, neuromodule, electrode, electrical activation, evoked potentials, electroencephalography, cats



## Оценка риска формирования промежуточного синдрома при отравлениях фосфорорганическими соединениями с использованием молекулярного докинга

Н.И. Бурцева, М.А. Тюнин, А.С. Гоголевский, С.В. Чепур

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург

Контактная информация: Бурцева Надежда Игоревна, [nadyn.baranova@gmail.com](mailto:nadyn.baranova@gmail.com)

В исследовании проведен молекулярный докинг взаимодействия фосфорорганических пестицидов с ацетилхолинэстеразой и нервно-мышечным N-холинорецептором. Установлена корреляция между величинами скоринг-функции и физико-химическими параметрами веществ с вероятностью развития промежуточного синдрома. Показано, что сродство фосфорорганических соединений к активному центру  $\alpha$ -субъединицы постсинаптического N-холинорецептора нервно-мышечного синапса определяет вероятность развития промежуточного синдрома.

**Ключевые слова:** фосфорорганические соединения, молекулярный докинг, промежуточный синдром, математическое моделирование, корреляционно-регрессионный анализ.

### Введение

Фосфорорганические соединения (ФОС) до настоящего времени широко применяются в сельском хозяйстве в качестве инсектицидов. В некоторых зарубежных странах ФОС продолжают оставаться одной из основных причин острых отравлений как среди работников сельского хозяйства, так и среди населения, использующего данные препараты в быту в качестве инсектицидов, а также при случайном или преднамеренном приёме внутрь [1]. В настоящее время в клиническом течении отравлений ФОС выделяют три фазы: холинэргический криз, промежуточный синдром и отдалённая полинейропа-

тия [2]. Под промежуточным синдромом (ПС) подразумевают совокупность клинических проявлений в виде слабости и параличей мышц шеи, мышц, иннервируемых черепными нервами, проксимальных мышц конечностей и дыхательных мышц, в т.ч. диафрагмы. Наиболее тяжелое течение ПС характеризуется параличом дыхательных мышц и, как следствие, прогрессированием дыхательной недостаточности [6]. Актуальность исследования механизмов ПС определяется тем, что наряду с холинэргическим кризом он остается одной из основных причин смертности при острых отравлениях ФОС. По данным различных клинических исследований,

ПС проявляется в 10-68% отравлений ФОС в зависимости от вида токсиканта [1, 2, 4, 6].

Патогенез ПС остается до конца не ясным. В качестве основного патогенетического механизма ПС рассматривается развитие деполяризующего нервно-мышечного блока с десенситизацией постсинаптических Н-холинорецепторов, предположительно вызванного воздействием избыточного количества ацетилхолина в результате блокады ацетилхолинэстеразы, или прямого Н-холиномиметического действия ФОС [3].

**Цель** данной работы состояла в изучении связи «структура ФОС – активность» в отношении развития ПС с использованием современных хемоинформатических инструментов, включающем определение корреляционных отношений между основными физико-химическими дескрипторами и вероятностью развития ПС.

### **Материалы и методы**

Для достижения цели исследования был проведен молекулярный докинг взаимодействия 15-ти коммерческих пестицидов из группы ФОС, для которых известны клинические данные о развитии ПС: диметоат, фентион, метамидофос, метилпаратион, монокротофос, паратион, малатион, хлорпирифос, оксидеметон-S-метил, параксон, ометоат, фенитротрион, деметон, дисульфотон. Молекулярный докинг включал оценку взаимодействия выбранных ФОС с ацетилхолинэстеразой (АХЭ) человека (4PQE) и нервно-мышечным Н-холинорецептором *Torpedo marmorata* (2BG9), структуры которых были взяты из базы

данных rcsb.org и загружены в формате pdb. Для проведения докинга в качестве инструмента был использован электронный сервис mcule.com. Структуры исследуемых соединений загружали с помощью InChI-кода или вводили графически с помощью Marvin-апплета. На основании справочных данных перед проведением докинга были определены активные центры белков: Ser203 для АХЭ [7] и Thr119 для  $\alpha$ -субъединицы Н-холинорецептора [5]. Выбранные активные центры АХЭ и  $\alpha$ -субъединицы Н-холинорецептора были оптимизированы под ацетилхолин. По результатам докинга определяли значение оценочной функции для четырех наиболее энергоэффективных состояний комплекса лиганд-белок.

Значения коэффициента распределения «н-октанол-вода» ( $\log P$ ) и среднелетальных доз у крыс при пероральном введении ( $LD_{50}$ ) для исследованных ФОС были взяты из базы ChemIDplus, доступной с помощью сайта toxnet.nlm.nih.gov. Значения молярных масс пестицидов были рассчитаны с помощью программного продукта ACD Labs 10.0. Математический анализ проводили с помощью автоматического онлайн-калькулятора (<http://math.semestr.ru>).

### **Результаты и их обсуждение**

Результаты молекулярного докинга показали, что взаимодействие всех исследованных ФОС с АХЭ происходит одинаково: вещества взаимодействуют с ключевыми аминокислотами активного центра фермента, и величина оценочной функции (ОФ) связывания с АХЭ практически не отличается.

Напротив, характер взаимодействия с Н-холинорецептором для исследован-

ных органофосфатов различался. Ряд веществ – в частности, хлорпирифос, фенитроцион, паратион, метилпаратион – отличало большое сродство к  $\alpha$ -субъединице Н-холинорецептора, что проявлялось образованием устойчивого комплекса с активным центром подобно ацетилхолину. Для других веществ

– например, метамидофос, оксидеметон-S-метил, деметон – взаимодействие с рецептором было энергетически неэффективным или связывание осуществлялось вне активного центра (рис. 1-3).

Сводные данные по результатам молекулярного докинга и их анализ представлены в таблице.

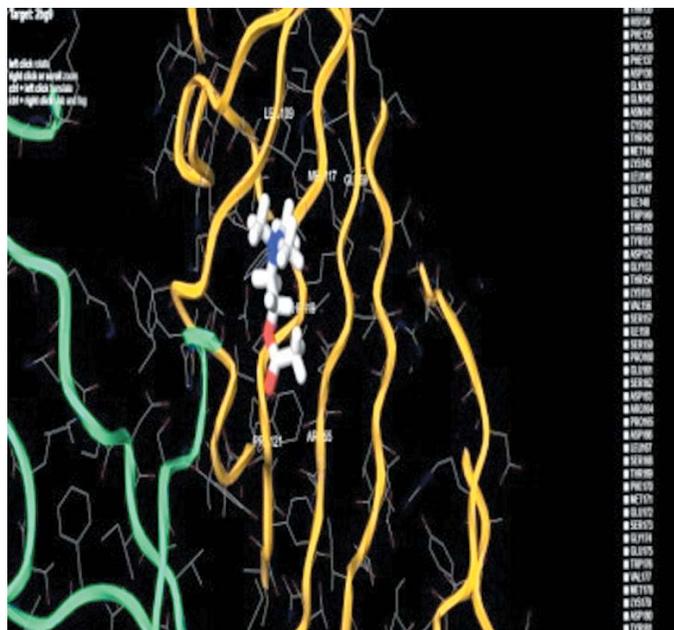


Рис. 1. Оптимизация связывания ацетилхолина с активным центром  $\alpha$ -субъединицы Н-холинорецептора.

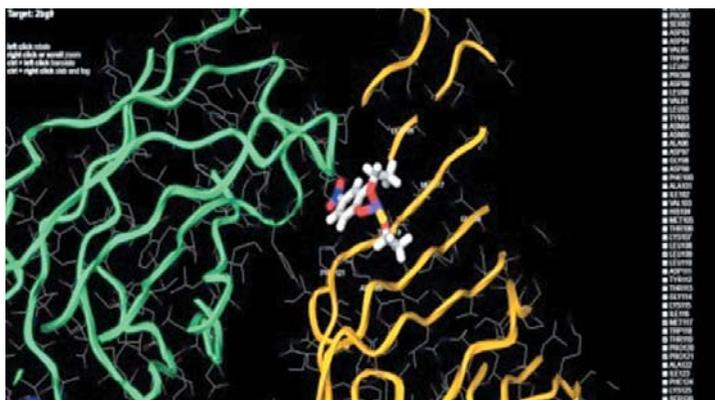


Рис. 2. Эффективное связывание паратиона с  $\alpha$ -субъединицей Н-холинорецептора.



Рис. 3. Слабое связывание деметона с  $\alpha$ -субъединицей Н-холинорецептора.

Таблица

Сводные данные по антихолинэстеразным пестицидам

№ п/п	Название вещества	Характеристики ФОС					
		Оценочная функция связывания с Н-холинорецептором, Дж/моль	Оценочная функция связывания с АХЭ, Дж/моль	Коэффициент распределения «н-октанол-вода» (logP)	Молярная масса, г/моль	LD50 для крыс при пероральном введении, мг/кг	Вероятность формирования ПС*
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$y$
1.	Диметоат	-3,4 – -4,1	-4,2 – -4,8	0,78	229,3	60	1
2.	Фентион	-3,9 – -4,1	-3,2 – -3,8	4,09	278,3	180	1
3.	Метамидофос	-2,8 – -3,5	-3,3 – -3,5	-0,82	141,1	7,5	1
4.	Метилпаратион	-4,0 – -4,4	-3,3 – -4,6	2,86	263,2	6,01	1
5.	Монокротофос	-3,6 – -4,2	-4,7 – -5,0	-0,2	223,2	8	1
6.	Паратион	-4,1 – -4,4	-3,9 – -4,9	3,83	291,3	2	1
7.	Малатион	-3,5 – -4,1	-3,9 – -5,1	2,36	330,4	290	0
8.	Хлорпирифос	-4,0 – -4,8	-5,9 – -6,5	4,96	350,6	82	1
9.	Оксидеметон-S-метил	-3,3 – -3,6	-3,8 – -4,3	0,67**	262,4	48	0
10.	Параоксон	-4,0 – -4,4	-3,6 – -5,1	1,98	275,2	1,8	1
11.	Ометоат	-3,6 – -4,1	-4,0 – -4,8	-0,74	213,2	30	1
12.	Фенитроотион	-4,1 – -5,0	-2,9 – -3,4	3,3	277,2	250	1
13.	Деметон	-2,9 – -4,0	-4,3 – -4,8	3,21	258,3	1,7	0
14.	Дисульфотон	-2,9 – -3,7	-3,7 – -4,4	4,02	274,4	2,6	0
15.	Мевинфос	-2,4 – -3,8	-4,8 – -5,3	0,13	224,1	3	0

Примечания: \* – на основании опубликованных данных о клинических случаях развития ПС для конкретного пестицида, наличие фактов развития ПС принимали за «единицу», отсутствие – как «ноль»;

\*\* – предсказанное значение (ACD Labs 10.0).

На основании характеристик пестицидов была сформирована база данных, содержащая следующие параметры: наиболее энергоэффективные (максимальные по модулю) скоринг-функции для комплексов с Н-холинорецептором ( $x_1$ ) и ацетилхолинэстеразой ( $x_2$ ), коэффициент распределения «н-октанол-вода» -  $\log P$  ( $x_3$ ), молярные массы ( $x_4$ ) и ЛД<sub>50</sub> ( $x_5$ ). Наличие клинических данных о развитии ПС для конкретного пестицида принимали за «единицу», отсутствие обозначали как «ноль».

Для исследования влияния факторов ( $x_{1-5}$ ) на развитие ПС ( $y$ ) был проведён многомерный корреляционно-регрессионный анализ при  $p=0,05$ . В результате было получено уравнение регрессии  $y = -1,98 - 1,08x_1 - 0,013x_2 + 0,0364x_3 - 0,00759x_4 - 0,000261x_5$ . Для уравнения величина множественного коэффициента корреляции  $R$  составила 0,784, что свидетельствовало о сильной связи между эффектом ( $y$ ) и факторами ( $x_i$ ) по шкале Чеддока. Качество уравнения множественной регрессии оценивали, рассчитывая  $F$ -критерий и сравнивая его с табличным значением распределения Фишера-Снедекора. Поскольку фактическое значение  $F < F_{кр}$ , то коэффициент детерминации был статистически не значим, а уравнение регрессии статистически ненадежно.

Из исследованных факторов ( $x_{1-5}$ ) наибольший вклад вносила величина ОФ связывания с Н-холинорецептором ( $x_1$ ) (значение частного коэффициента корреляции  $r=-0,54$ , средняя ошибка аппроксимации  $A=14,41\%$ ). При анализе коллинеарности факторов было установлено, что парные коэффициенты корреляции  $r_{24}=-0,569$ , что свидетельствовало о наличии средней связи, и

$r_{34}=-0,809$ , что свидетельствовало о сильной связи между факторами. Таким образом, полученное уравнение характеризовалось мультиколлинеарностью, что подтверждалось расчётами критерия  $\chi^2$  и  $F$ -критерия Фишера. Расчёт частных коэффициентов эластичности показал, что существенное влияние на вероятность развития ПС оказывают факторы  $x_1$  и  $x_2$ , тогда как по результатам расчёта  $t$ -критерия Стьюдента была выявлена существенная связь только между  $y$  и  $x_1$ .

На основании вышеизложенного был сделан вывод о наличии связи между развитием ПС и величиной ОФ связывания ФОС с Н-холинорецептором, а остальные параметры не определяли развитие эффекта. Вследствие этого было принято решение о проведении корреляционного анализа между вероятностью наступления ПС и величиной скоринг-функции связывания ФОС с Н-холинорецептором по методу наименьших квадратов. Гомоскедатичность была доказана при помощи теста ранговой корреляции Спирмэна и теста Голдфелда-Квандта. В результате было получено уравнение регрессии  $y = -0,6343x - 1,9636$  ( $r=-0,54$  – связь средняя обратная;  $R^2=0,29$ ). Расчёт критерия Стьюдента позволил сделать вывод о том, что коэффициент корреляции статистически значим. Существенное влияние  $x$  на  $y$  подтверждалось также значением коэффициента эластичности  $E=3,95$ . Статистическая достоверность подтверждалась  $t$ - и  $F$ -статистикой. Средняя ошибка аппроксимации  $A=19,59\%$ .

Анализируя полученное уравнение, можно предположить наличие порогового значения оценочной функции связыва-

вания ФОС с Н-холинорецептором, которое может быть использовано в качестве маркера развития ПС. Так, решив уравнение для  $p < 0,05$ , т.е. вероятности развития эффекта более 95%, получается, что величина скоринг-функции для комплексов органофосфатов с Н-холинорецептором, при которых развивается ПС, должна составлять не менее 4,6 Дж/моль.

### Выводы

В результате проведённых исследований было подтверждено прямое Н-холинотропное действие некоторых пестицидов из группы ФОС методом молекулярного докинга. Была установлена прямая зависимость между величиной рассчитанной скоринг-функции и вероятностью формирования промежуточного синдрома. Данный *in silico* анализ может быть использован для оценки риска возникновения ПС при отравлении различными по структуре ФОС.

### Список литературы

1. *Прозоровский В.Б., Ченур С.В.* Новые данные о несинаптических (дистантных) эффектах фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы // Токсикологический вестник. 2001. № 4. С. 2-7.
2. *Ченур С.В.* Отдалённые органофосфатные нейропатии: патогенез, профилактика и лечение // Токсикологический вестник. 2010. № 3. С. 42-43.
3. *De Wilde V., Vogelaers D., Colardyn F., Vanderstraeten G., Van der Neucker K., De Blucker J.* Postsynaptic neuromuscular dysfunction in organophosphate induced intermediate syndrome // Klin. Wochenschr. 1991. Vol. 69. No. 4. P. 177-183.
4. *Karalliedde L., Wheeler H., Maclehorse R., Murray V.* Possible immediate and long-term health effects following exposure to chemical warfare agents // Public Health. 2000. Vol. 114. No. 4. P. 238-248.

5. *Lena C., Changeux J.P.* Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor // Trends Neurosci. 1993. Vol. 16. No. 5. P. 181-186.
6. *Senanyake N., Karalliedde L.* Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome // N. Engl. J. Med. 1987. Vol. 316. No. 13. P. 761-763.
7. *Shen T., Tai K., Henchman R.H., McCammon J.A.* Molecular dynamics of acetylcholinesterase // Acc. Chem. Res. 2003. Vol. 35. No. 6. P. 332-340.

### References

1. *Prozorovskij V.B., Chpur S.V.* Novye dannye o nesinapticheskikh (distantnyh) ehffektah fosfororganicheskikh ingibitorov holinehsterazy // Toksikologicheskij vestnik. 2001. № 4. S. 2-7.
2. *Chpur S.V.* Otdalyonnye organofosfatnye nejropatii: patogenez, profilaktika i lechenie // Toksikologicheskij vestnik. 2010. № 3. S. 42-43.
3. *De Wilde V., Vogelaers D., Colardyn F., Vanderstraeten G., Van der Neucker K., De Blucker J.* Postsynaptic neuromuscular dysfunction in organophosphate induced intermediate syndrome // Klin. Wochenschr. 1991. Vol. 69. No. 4. P. 177-183.
4. *Karalliedde L., Wheeler H., Maclehorse R., Murray V.* Possible immediate and long-term health effects following exposure to chemical warfare agents // Public Health. 2000. Vol. 114. No. 4. P. 238-248.
5. *Lena C., Changeux J.P.* Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor // Trends Neurosci. 1993. Vol. 16. No. 5. P. 181-186.
6. *Senanyake N., Karalliedde L.* Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome // N. Engl. J. Med. 1987. Vol. 316. No. 13. P. 761-763.
7. *Shen T., Tai K., Henchman R.H., McCammon J.A.* Molecular dynamics of acetylcholinesterase // Acc. Chem. Res. 2003. Vol. 35. No. 6. P. 332-340.

## **Assessment of risk of formation of the intermediate syndrome in poisonings with organophosphates using molecular docking**

**N.I. Burtseva, M.A. Tyunin, A.S. Gogolevskiy, S.V. Chepur**

The molecular docking of interaction of organophosphorus pesticides with acetylcholinesterase and neuromuscular N-cholinergic receptors was conducted. The correlation between the values of the scoring function and physicochemical parameters of substances with a probability of intermediate syndrome was set. It was shown that the affinity of organophosphates to the active center of the alpha-subunit of the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor N-neuromuscular synapse determines the probability of intermediate syndrome.

**Key words:** organophosphates, molecular docking, intermediate syndrome, mathematical modelling, correlation and regression analysis.

## Поведенческий фенотипический анализ животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Я.В. Горина<sup>1</sup>, Ю.К. Комлева<sup>1</sup>, О.Л. Лопатина<sup>1</sup>, А.И. Черных<sup>2</sup>,  
А.Б. Салмина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

<sup>2</sup> – Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 им. И.С. Берзона, Красноярск

Контактная информация: к.ф.н. Горина Яна Валерьевна, [уапа\\_20@bk.ru](mailto:уапа_20@bk.ru)

Цель исследования – изучение развития социальных и когнитивных нарушений в процессе онтогенеза у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера.

Объект исследования – генетическая модель болезни Альцгеймера – мыши линии B6SLJ-Tg(APP SwF10n,PSEN1\*M146L\*L286V)6799Vas, самцы в возрасте 4 мес. Контрольная группа – мыши линии C57BL/6 x SJL, самцы в возрасте 4 мес. Нейроповеденческое тестирование включало в себя тест «Открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт, тест «Черно-белая камера», трехкамерный социальный тест, социальный пятипопыточный тест, тест «Fear conditioning».

В результате проведения нейроповеденческого тестирования у животных линии Tg6799 по мере развития болезни Альцгеймера выявлены повышение уровня тревожности и заторможенности, нарушение социальных контактов и взаимодействий, а также пространственного, социального и ассоциативного обучения и запоминания. В совокупности это указывает на расстройство эмоционального поведения, а также долговременной, социальной, пространственной и эмоциональной памяти.

**Ключевые слова:** генетическая модель на животных, болезнь Альцгеймера, память, поведение.

### Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным типом нейродегенеративных заболеваний, клинически характеризующимся необратимым прогрессирующим снижением когнитивных функций и потерей памяти [13].

Нейропатологические признаки нейродегенерации, такие как отложение нейрофибриллярных клубков и гибель нейронов, обнаружены в медиальной височной доле, в т.ч. гиппокампе, энторинальной коре и миндалине, еще на ранних стадиях развития заболевания до появления характерных симптомов [16]. При этом нейропатологические изменения в гиппокампе, вероятно связан-

ные с нарушением декларативной памяти [3], что является одним из первых симптомов БА, присутствуют на стадии умеренных когнитивных нарушений [11]. Стоит отметить и тот факт, что постепенно прогрессирующее нарушение взаимосвязи гиппокампа с другими областями мозга при БА находится в фокусе исследования многих зарубежных ученых [5, 8], тогда как взаимосвязь гиппокампа с миндалиной, которая участвует в формировании эмоциональных поведенческих реакций [10], мало изучена.

Кроме того, несмотря на десятилетние исследования, этиология БА неизвестна, и многие фундаментальные вопросы остаются без ответа. В связи

с этим решающее значение имеет использование животных с генетической моделью БА в качестве ключевого инструмента исследования как с целью определения патологических путей заболевания, так и выявления новых терапевтических подходов [2, 12].

Поскольку наиболее значимыми изменениями, к которым приводит БА, являются прогрессирующая потеря памяти и нарушение когнитивных функций, что вызвано массовой гибелью нейронов и синапсов, необходимо сконцентрировать внимание на изучении поведенческого фенотипа животных с генетической моделью БА с использованием батареи нейроповеденческих тестов для оценки когнитивных функций и различных видов памяти как гиппокамп-, так и миндалина зависящих.

**Цель исследования** – изучение развития социальных и когнитивных нарушений в процессе онтогенеза у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера.

### **Материалы и методы**

#### **Экспериментальные группы**

Генетическая модель болезни Альцгеймера – мыши линии B6SLJ-Tg (APP<sup>SwFlon</sup>, PSEN1\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>)6799Vas, самцы в возрасте 4 мес. массой 39-41 г (n=10). Контрольная группа – мыши линии C57BL/6 x SJL, самцы в возрасте 4 мес. массой 40-41 г (n=10). Данные линии мышей получены из The Jackson Laboratory.

Животных содержали в клетках со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре 21±1°C и регулируемом световом цикле 12/12 ч.

#### **Соответствие нормам законодательства**

Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/EC).

#### **Нейроповеденческое тестирование**

Для фенотипического исследования животных применялись следующие поведенческие тесты: тест «Открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт, тест «Черно-белая камера», трехкамерный социальный тест, социальный пятипопыточный тест и тест «Fear conditioning».

*Открытое поле* – тест оценивает как двигательную активность, так и эмоциональную реактивность в условиях стресса, которые создаются за счет помещения животного в специальную установку – круглую арену диаметром 63 см с высотой стенок 32 см [14]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [1]. На каждом этапе тестирования оценивали двигательную активность по пройденному расстоянию (в метрах), время в наружной зоне «открытого поля», время во внутренней зоне «открытого поля», количество входов во внутреннюю зону «открытого поля».

*Приподнятый крестообразный лабиринт* – позволяет оценить степень тревожности, эмоциональное состояние, исследовательскую и двигательную активность животных, помещенных в лабиринт [6], состоящий из перпендикулярно расположенных друг относительно друга на высоте 1 м двух открытых и двух закрытых рукавов. Для оценки поведения животных использовали следующие показатели: время пребывания в закрытых

и открытых «рукавах», количество входов в закрытые и открытые «рукава», длительность нахождения в центре.

*Черно-белая камера* – тест использовали для изучения эмоциональной реактивности животного (склонности к тревоге, страху, депрессии [15]) при помещении в специальную установку – ящик, состоящий из светлого и темного отсеков, разделенных перегородкой. В ходе сессии регистрировали следующие показатели: латентное время первого входа в темный отсек, время нахождения в светлом и темном отсеке, число входов в темный отсек.

*Трехкамерный социальный тест* – использовали для оценки социального взаимодействия и социальной памяти у животных [9]. Устройство представляет собой прямоугольный ящик из жесткого поливинилхлорида серого цвета, имеет две боковые и одну центральную камеру с квадратными переходами между отсеками. Тестирование выполняли в три этапа с перерывом в 10 мин: на первом этапе в две боковые камеры устанавливали несоциальный объект (цилиндр), животное помещали в центральную камеру и проводили видеорегистрацию в течение 10 мин; на втором этапе в левую камеру помещали социальный объект 1 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 мес., находящаяся в цилиндре) и проводили тестирование животного в течение 10 мин; на третьем этапе в правую камеру помещали новый социальный объект 2 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 мес., находящаяся в цилиндре), оставляя в левой камере ранее помещенный социальный объект 1, и проводили тестирование животного в течение 10 мин. В каждой сессии оценивали двигательную активность по пройденному расстоянию (в метрах),

время нахождения в правой, левой и центральной камерах, количество входов в левую и правую камеры, время нахождения около социального объекта 1 и 2, количество входов в зону нахождения социального объекта 1 и 2.

*Социальный пятипопыточный тест* – позволяет оценить социальное распознавание новой особи: в результате повторных взаимодействий грызуны привыкают друг к другу и, как следствие, теряют исследовательский интерес, что проявляется в снижении времени контакта. Однако последующее появление незнакомой особи (самки в возрасте 8 недель) увеличивает социальный интерес и время социального контакта [4]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [1]. Оценивали социальное взаимодействие по принципу фиксации времени (в сек) следования «голова-хвост».

*Fear conditioning* – тест использовали для исследования консолидации памяти страха и способности животных к ассоциативному обучению [7]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [1]. В каждой сессии оценивали количество эпизодов замирания.

#### Статистический анализ

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна-Уитни, сравнение зависимых выборок осуществляли с помощью критерия Уилкоксона. Различия принимали значимыми при  $p \leq 0,05$ . Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее

значение,  $m$  – ошибка среднего,  $p$  – уровень значимости.

### Результаты и их обсуждение

При изучении тревожности в тесте «Открытое поле» на первом этапе отмечено, что животные с генетической моделью БА (линия Tg6799) в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,001$ ) меньше времени (здесь и далее время представлено в сек) проводили в наружной части поля (на периферии) –  $279,14 \pm 16,52$  по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) в аналогичном возрасте –  $361,32 \pm 10,65$ .

Однако с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 количество времени, проведенного в наружной части поля, статистически значимо ( $p \leq 0,001$ ) возрастало по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ( $433,98 \pm 32,94$  и  $279,14 \pm 16,52$  соответственно) (рис. 1А). Это свидетельствовало о проявлении повышенной тревожности в группе животных с генетической моделью БА на последней стадии развития заболевания.

Выявлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени про-

водили в центре поля при появлении несоциального объекта (цилиндра) по сравнению с животными контрольной группы ( $306,52 \pm 44,30$  и  $180,27 \pm 15,35$  соответственно). При этом количество входов в центральную зону у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. составляло  $71,14 \pm 3,92$ , тогда как у животных линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. –  $57,38 \pm 3,16$ , при  $p \leq 0,05$ .

Таким образом, животные линии Tg6799 чаще заходили в центральную зону с несоциальным объектом, контактируя с ним коротким промежутком времени, и выбегали из центральной зоны. В совокупности это указывало на проявление тревоги у животных с генетической моделью БА на начальных стадиях развития заболевания при появлении несоциального объекта.

Однако с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) снижалось время нахождения в центре поля при появлении цилиндра – как по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ( $93,88 \pm 11,47$  и  $306,52 \pm 44,30$  соответственно), так и с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ( $135,71 \pm 12,19$  соответственно) (рис. 1Б). Данный факт указывает на проявление

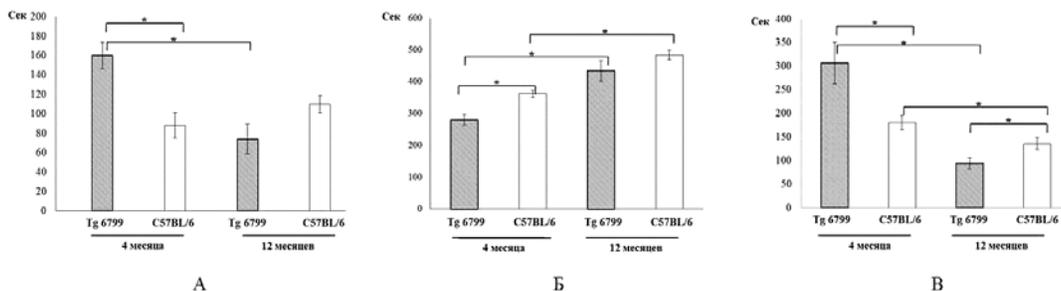


Рис. 1. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Открытое поле»: А – время в наружном круге (первый этап), Б – время в зоне с несоциальным объектом (второй этап), В – время в зоне с социальным объектом (третий этап); \* –  $p \leq 0,05$ .

тревоги (боязни) по отношению к несоциальному объекту у животных с генетической моделью БА на последней стадии заболевания.

На третьем этапе тестирования установлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени проводили в центре поля при появлении социального объекта (самца) по сравнению с животными линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. ( $159,90 \pm 13,59$  и  $87,86 \pm 13,24$  соответственно). Тогда как с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) снижалось время нахождения в центре поля при появлении самца по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ( $73,73 \pm 11,85$  и  $159,90 \pm 13,59$  соответственно) (рис. 1B). Это свидетельствовало о проявлении тревоги по отношению к социальному объекту у животных с генетической моделью БА в процессе развития заболевания.

При изучении тревожности с помощью теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. наблюдалась тенденция ( $p = 0,069$ ) к уменьшению времени проведения в закрытых «рука-

вах» ( $362,80 \pm 47,46$  сек) по сравнению с животными линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. ( $473,68 \pm 24,56$  сек). Также выявлено, что с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) снижалось время нахождения в закрытых «рукавах» – как по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ( $245,7 \pm 31,25$  и  $362,80 \pm 47,46$  соответственно), так и с животными линии C57BL/6 в возрасте 12 мес. ( $245,7 \pm 31,25$  и  $491,22 \pm 20,88$  соответственно). Это обусловлено тем, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,001$ ) больше времени замирали, находясь в открытых «рукавах» ( $75,38 \pm 14,62$ ), по сравнению с животными линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. ( $12,47 \pm 1,19$ ) (рис. 2). Аналогичная ситуация (увеличение времени замирания в открытых «рукавах») наблюдалась с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 – как по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ( $98,17 \pm 29,09$  и  $73,10 \pm 14,54$  соответственно, при  $p \leq 0,05$ ), так и с животными линии C57BL/6 в возрасте 12 мес. ( $98,17 \pm 29,09$  и  $6,92 \pm 2,40$  соответственно, при  $p \leq 0,001$ ) (рис. 2).

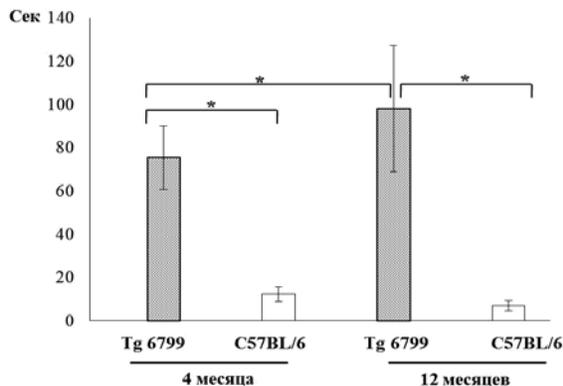


Рис. 2. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: время замирания в открытых «рукавах»; \* –  $p \leq 0,05$ .

Увеличение времени замирания, являющегося одним из показательных элементов поведения и вызванного страхом, беспокойством, тревогой, может свидетельствовать об увеличении уровня тревожности у животных линии Tg6799 по мере развития заболевания.

В ходе исследования тревожности в тесте «Черно-белая камера» у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. наблюдалась тенденция ( $p=0,333$ ) больше времени проводить в черной камере –  $457,45 \pm 34,76$  сек – по сравнению с животными контрольной группы –  $417,73 \pm 19,63$  сек. Аналогичная ситуация наблюдалась и в возрасте 12 мес. у животных линии Tg6799: количество времени, проведенного в черной камере, изменилось незначительно ( $p=0,287$ ) и составило  $392,35 \pm 22,55$  по сравнению с животными линии Tg 6799 в возрасте 4 мес. –  $457,45 \pm 34,76$  (рис. 3).

Также выявлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) быстрее забегали в черную камеру ( $6,04 \pm 2,36$ ) по сравнению с животными контрольной группы ( $14,04 \pm 3,17$ ). Однако с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция к увеличению латентного времени до входа в черную камеру – как по сравнению с

животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ( $8,17 \pm 1,29$  и  $6,04 \pm 2,36$  соответственно, при  $p=0,556$ ), так и с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ( $8,17 \pm 1,29$  и  $4,89 \pm 0,95$  соответственно, при  $p=0,08$ ).

В совокупности это указывало на проявление тревоги и заторможенности у животных линии Tg6799 по мере развития заболевания.

В результате проведения трехкамерного социального теста выявлено, что на первом этапе тестирования у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. время, проведенное как в правой ( $219,51 \pm 16,82$ ), так и левой камерах ( $265,97 \pm 17,98$ ), статистически значимо не отличалось ( $p=0,084$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы сходного возраста: время, проведенное в правой ( $207,77 \pm 10,63$ ) и левой ( $225,76 \pm 7,41$ ) камерах, статистически значимо не отличалось ( $p=0,182$ ). В дополнение к этому, у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. время, проведенное в зоне с не-социальным объектом в правой камере, статистически значимо не отличалось ( $p=0,861$ ) по сравнению с животными контрольной группы ( $121,66 \pm 13,42$  и  $118,79 \pm 9,66$  соответственно). Подобное выявлено и по времени, проведенном в

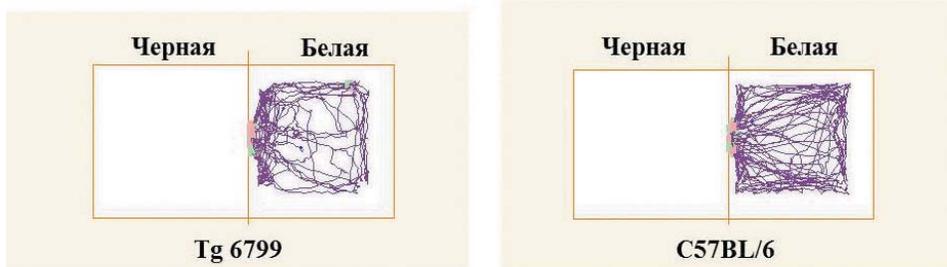


Рис. 3. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Черно-белая камера»: образцы треков животных.

зоне с несоциальным объектом в левой камере – как у опытной, так и у контрольной группы ( $173,44 \pm 21,11$  и  $130,79 \pm 9,49$  соответственно, при  $p=0,059$ ). Это свидетельствовало об отсутствии боязни (тревоги) по отношению к несоциальному объекту у животных линии Tg 6799 в возрасте 4 мес.

На втором этапе тестирования, когда в левую камеру помещали социальный объект 1, животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,001$ ) больше времени проводили в левой ( $296,54 \pm 16,43$ ), чем в правой камере ( $138,83 \pm 24,25$ ). Тогда как у животных контрольной группы в возрасте 4 мес. время, проведенное в правой ( $179,09 \pm 21,56$ ) и левой ( $225,93 \pm 14,54$ ) камере, статистически значимо не отличалось ( $p=0,116$ ). К тому же животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени проводили в зоне с социальным объектом 1 в левой камере по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 4 мес. ( $211,64 \pm 24,79$  и  $111,41 \pm 12,98$  соответственно). Это свидетельствовало о распознавании и проявлении интереса к появившемуся социальному объекту у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес.

Однако на третьем этапе тестирования, когда в правую камеру помещали новый социальный объект 2, оставляя в левой камере ранее помещенный социальный объект 1, животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени проводили в левой камере ( $239,93 \pm 19,12$ ), чем в правой ( $133,41 \pm 29,49$ ). Тогда как животные контрольной группы в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени проводили в правой,

чем в левой камере ( $249,37 \pm 15,57$  и  $168,66 \pm 17,84$  соответственно). Следует подчеркнуть, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени проводили в зоне с социальным объектом 1 в левой камере ( $137,60 \pm 16,44$ ), чем в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ( $62,35 \pm 16,95$ ). При этом животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) меньше времени проводили в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ( $62,35 \pm 16,95$ ) по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 4 мес. ( $124,31 \pm 12,19$ ).

Таким образом, животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. предпочитали взаимодействовать с уже знакомым, а не с новым социальным объектом. Это указывало на нарушение социальной памяти и, как следствие, на затруднение в распознавании нового социального объекта, проявляющееся на начальных стадиях развития БА.

С возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 на первом этапе тестирования время, проведенное как в правой ( $207,90 \pm 75,34$ ), так и в левой камере ( $219,98 \pm 65,11$ ), статистически значимо не отличалось ( $p=0,803$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы в возрасте 12 мес.: время, проведенное в правой ( $183,51 \pm 24,59$ ) и левой ( $188,26 \pm 51,85$ ) камере, статистически значимо не отличалось ( $p=0,829$ ). Кроме того, у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. время, проведенное в зоне с несоциальным объектом в правой камере, статистически значимо не отличалось ( $p=0,289$ ) по сравнению с животными контрольной группы ( $79,73 \pm 25,00$  и  $95,13 \pm 18,26$  со-

ответственно). Подобный эффект выявлен и в отношении времени, проведенного в зоне с несоциальным объектом в левой камере – как у опытной, так и у контрольной группы в возрасте 12 мес. ( $84,58 \pm 26,44$  и  $107,28 \pm 23,17$  соответственно, при  $p=0,163$ ). Это указывало на отсутствие боязни (тревоги) по отношению к несоциальному объекту у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес.

На втором этапе тестирования животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени проводили в левой ( $328,53 \pm 84,00$ ), чем в правой камере ( $179,90 \pm 50,85$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы в возрасте 12 мес.: время, проведенное в левой ( $230,48 \pm 36,67$ ) камере, статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени, проведенного в правой камере ( $166,10 \pm 55,26$ ). В дополнение к этому, у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. время, проведенное в зоне с социальным объектом 1 в левой камере, по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. статистически значимо не отличалось ( $119,02 \pm 35,23$  и  $99,33 \pm 42,57$  соответственно, при  $p=0,398$ ). Однако у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. наблюдалось более длительное время замирания ( $62,68 \pm 21,33$ ) (статистически значимо, при  $p \leq 0,05$ ), находясь в зоне с социальным объектом 1, по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ( $35,44 \pm 16,26$ ). Это свидетельствовало о распознавании появившегося социального объекта с одновременным проявлением тревоги (боязни).

На третьем этапе тестирования животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ )

больше времени проводили в левой камере ( $252,68 \pm 33,42$ ), чем в правой ( $177,58 \pm 73,52$ ). Тогда как животные контрольной группы в возрасте 12 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше времени проводили в правой камере, куда был помещен новый социальный объект 2, чем в левой камере ( $242,05 \pm 76,79$  и  $158,04 \pm 43,41$  соответственно). Важно отметить, что у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. наблюдалась тенденция ( $p=0,250$ ) больше времени проводить в зоне с социальным объектом 1 в левой камере ( $71,57 \pm 18,84$ ), чем в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ( $62,08 \pm 21,57$ ). При этом у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. отмечалось статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) более длительное время замирания ( $41,18 \pm 9,53$ ), находясь в зоне с социальным объектом 1, по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ( $21,06 \pm 5,77$ ). Кроме того, животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) меньше времени проводили в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ( $62,08 \pm 21,57$ ) по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ( $113,14 \pm 35,65$ ).

Таким образом, животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. охотнее взаимодействовали с уже знакомым, чем с новым социальным объектом, проявляя при этом повышенную тревожность (страх). Данный факт указывал на нарушение социальной памяти и, как следствие, на затруднение в распознавании нового социального объекта, проявляющееся по мере развития заболевания.

Анализ результатов социального пятипопыточного теста показал, что у животных линии Tg6799 в возрасте

4 мес. происходило статистически значимое снижение времени взаимодействия по принципу «голова-хвост» при сравнении первой ( $33,00 \pm 4,14$ ) и четвертой попыток ( $2,20 \pm 1,03$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и в контрольной группе (рис. 4А). Стоит отметить, что у животных линии Tg6799 уже ко второй попытке наблюдалось статистически значимое ( $p \leq 0,001$ ) уменьшение времени взаимодействия ( $8,10 \pm 2,40$ ) по сравнению с первой попыткой ( $33,00 \pm 4,14$ ), что свидетельствовало о быстром снижении заинтересованности особью противоположного пола (рис. 4А).

При подсадке новой самки в пятой попытке у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция к меньшей заинтересованности ( $23,40 \pm 3,73$ ), чем у животных контрольной группы ( $28,50 \pm 1,30$ ) ( $p = 0,097$ ).

Таким образом, у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. и контрольной группы наблюдался процесс запоминания и, как следствие, распознавания новой особи, однако у животных линии Tg6799 выявлена быстрая потеря интереса к знакомому социальному объекту.

С возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 наблюдалось статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) снижение времени взаимодействия при сравнении первой ( $37,17 \pm 3,38$ ) и четвертой попыток ( $17,17 \pm 4,37$ ) (рис. 4Б). Сходная ситуация наблюдалась и в контрольной группе в возрасте 12 мес.: статистически значимое ( $p \leq 0,001$ ) снижение времени при сравнении первой ( $41,80 \pm 2,52$ ) и четвертой попыток ( $8,80 \pm 1,74$ ). Однако у животных линии Tg6799 в четвертой попытке теста время взаимодействия с уже знакомой особью противоположного пола статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) больше ( $17,17 \pm 4,37$ ) по сравнению с животными контрольной группы аналогичного возраста ( $8,80 \pm 1,74$ ), что указывало на нарушение процесса запоминания у животных линии Tg6799.

При подсадке новой самки в пятой попытке у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция ( $p = 0,096$ ) к большей заинтересованности ( $29,50 \pm 4,56$ ) по сравнению с четвертой попыткой ( $17,17 \pm 4,37$ ). Тогда как у животных контрольной группы в возрасте 12 мес.

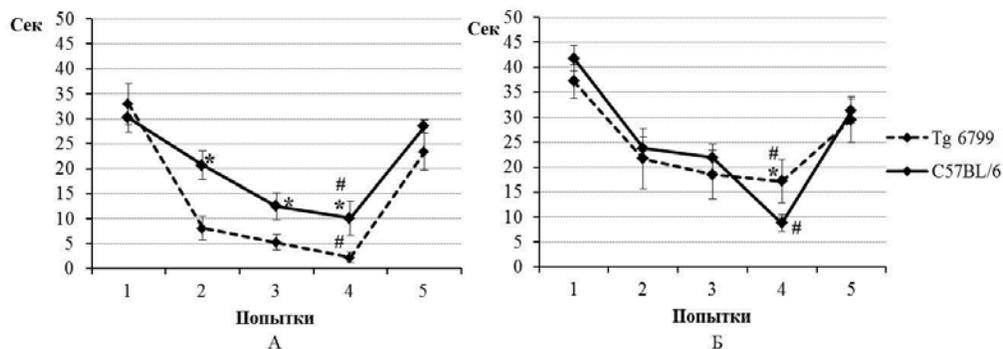


Рис. 4. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Социальный пятипопыточный»: А – время взаимодействия по принципу «голова-хвост» в возрасте 4 мес., Б – время взаимодействия по принципу «голова-хвост» в возрасте 12 мес.; \* –  $p \leq 0,05$ ; # – сравнение группы в 1-й и 4-й попытках ( $p \leq 0,05$ ).

при подсадке новой самки в пятой попытке выявлено статистически значимое ( $p < 0,001$ ) увеличение заинтересованности ( $31,30 \pm 2,38$ ) по сравнению с четвертой попыткой ( $8,80 \pm 1,74$ ).

Таким образом, в опытной группе по мере развития БА отмечалась тенденция к нарушению процесса запоминания и, как следствие, распознавания новой особи, что указывало на расстройство социальной памяти.

В результате проведения теста «Fear conditioning» выявлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. демонстрировали меньше эпизодов замиранья по сравнению с животными контрольной группы аналогичного возраста (рис. 5А). При этом на протяжении периода тестирования у животных линии Tg6799 наблюдалось формирование условного рефлекса: в частности, количество эпизодов замиранья от 1-го дня ( $66,14 \pm 4,65$ ) (подавался белый шум в сочетании с электрическим сигналом) к 7-му дню ( $48,11 \pm 5,30$ ) (отсутствовал звуковой и электрический сигнал) статистически значительно снизилось ( $p \leq 0,05$ ). В дополнение к этому, на 8-й день тестирования, когда мышь помещали в другую испытательную камеру с черным полом, черно-белыми стенами и освещенностью 30 люкс с подачей звукового, но отсутствующим электрического сигнала, у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция ( $p = 0,136$ ) к увеличению количества эпизодов замиранья ( $58,13 \pm 5,30$ ) в ответ на смену обстановки и присутствие звукового стимула по сравнению с 7-м днем ( $48,11 \pm 5,30$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы (рис. 5А).

Таким образом, у животных линии Tg6799 формировался условный рефлекс в ответ на неприятный (условный) стимул, что свидетельствовало об отсутствии видимых нарушений ассоциативного обучения и запоминания на начальной стадии развития БА.

С возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 на протяжении периода тестирования количество эпизодов замиранья от 1-го дня ( $95,80 \pm 9,62$ ) к 7-му дню ( $56,33 \pm 10,57$ ) статистически значительно снизилось ( $p \leq 0,05$ ). Подобный эффект наблюдался и у животных контрольной группы (рис. 5Б). Однако на 8-й день тестирования у животных линии Tg6799 количество эпизодов

тельную камеру с черным полом, черно-белыми стенами и освещенностью 30 люкс с подачей звукового, но отсутствующим электрического сигнала, у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция ( $p = 0,136$ ) к увеличению количества эпизодов замиранья ( $58,13 \pm 5,30$ ) в ответ на смену обстановки и присутствие звукового стимула по сравнению с 7-м днем ( $48,11 \pm 5,30$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы (рис. 5А).

Таким образом, у животных линии Tg6799 формировался условный рефлекс в ответ на неприятный (условный) стимул, что свидетельствовало об отсутствии видимых нарушений ассоциативного обучения и запоминания на начальной стадии развития БА.

С возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 на протяжении периода тестирования количество эпизодов замиранья от 1-го дня ( $95,80 \pm 9,62$ ) к 7-му дню ( $56,33 \pm 10,57$ ) статистически значительно снизилось ( $p \leq 0,05$ ). Подобный эффект наблюдался и у животных контрольной группы (рис. 5Б). Однако на 8-й день тестирования у животных линии Tg6799 количество эпизодов

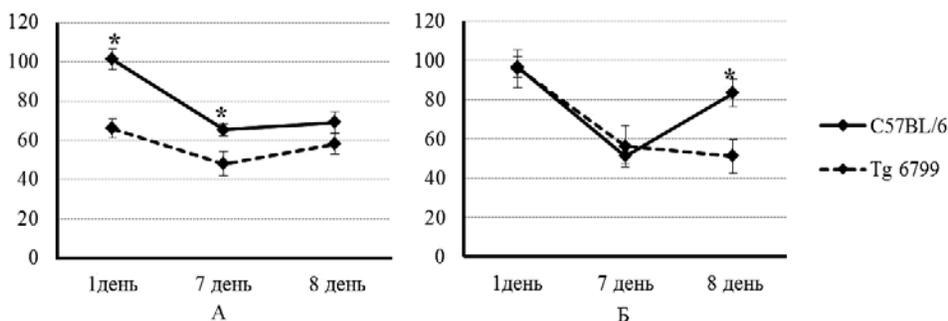


Рис. 5. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Fear conditioning»: А – эпизоды замиранья в возрасте 4 мес., Б – эпизоды замиранья в возрасте 12 мес.; \* –  $p \leq 0,05$ .

замирания ( $51,00 \pm 8,50$ ) статистически значимо не изменилось ( $p=0,758$ ) по сравнению с 7-м днем тестирования ( $56,33 \pm 10,57$ ) (рис. 5Б). Противоположная ситуация наблюдалась у животных контрольной группы. Так, количество эпизодов замирания в ответ на смену обстановки и присутствие звукового стимула статистически значимо увеличилось ( $p \leq 0,001$ ) при сравнении 8-го и 7-го дня тестирования ( $83,00 \pm 6,87$  и  $51,00 \pm 3,93$  соответственно) (рис. 5Б).

Показано, что у животных линии Tg6799 по мере развития заболевания наблюдалось нарушение ассоциативного обучения и запоминания (в частности, существенно подавлялся процесс консолидации памяти страха).

### Выводы

На основании проведенной батареи нейроповеденческих тестирований можно заключить, что у животных линии Tg6799 по мере развития БА выявлены такие векторы поведения, как: повышение уровня тревожности и заторможенности, нарушение социальных контактов и взаимодействий, а также социального и ассоциативного обучения и запоминания. Все это указывает на расстройство эмоционального поведения, а также долговременной, социальной и эмоциональной памяти. В совокупности полученные данные свидетельствуют о нарушении механизмов, связанных с активностью гиппокампа и миндалины головного мозга, при экспериментальной БА.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10241.2016.7).

### Список литературы

1. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Черных А.И., Шабалова А.А., Семенчиков А.А., Оловяникова Р.Я., Салмина А.Б. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте // Успехи геронтологии. 2017. Т. 1. С. 49-56.
2. Cubinková V., Valachová B., Brezovaková V., Szabó R., Zimová I., Kostecká Z., Jadhav S. Next generation tau models in Alzheimer's disease research - virus based gene delivery systems // Acta Virol. 2017. No. 61(1). doi: 10.4149/av.2017.01.13. [Epub ahead of print].
3. Guillozet A.L., Weintraub S., Mash D.C., Mesulam M.M. Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment // Arch Neurol. 2003. No. 60(5). P. 729-736. doi:10.1001/archneur.60.5.729.
4. Jacobs S.A., Huang F., Tsien J.Z., Wei W. Social Recognition Memory Test in Rodents // Neuroscience. 2016. No. 6(9). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1804.
5. Leal S.L., Landau S.M., Bell R.K., Jagust W.J. Hippocampal activation is associated with longitudinal amyloid accumulation and cognitive decline // Elife. 2017. No. 6. pii: e22978. doi: 10.7554/eLife.22978. [Epub ahead of print].
6. Leo L.M., Pamplona F.A. Elevated Plus Maze Test to Assess Anxiety-like Behavior in the Mouse // Neuroscience. 2014. No. 4(16). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1211.
7. Lugo J.N., Smith G.D., Holley A.J. Trace fear conditioning in mice // J. Vis. Exp. 2014. No. 85. doi: 10.3791/51180.
8. Mak E., Gabel S., Su L., Williams G.B., Arnold R., Passamonti L., Vazquez Rodríguez P., Surendranathan A., Bevan-Jones W.R., Rowe J.B., O'Brien J.T. Multi-modal MRI investigation of volumetric and microstructural changes in the hippocampus and its subfields in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and dementia with Lewy bodies // Int. Psychogeriatr. 2017. P. 1-11. doi: 10.1017/s1041610216002143. [Epub ahead of print].
9. Martin L., Iceberg E. Quantifying social motivation in mice using operant conditioning // J. Vis. Exp. 2015. No. 102. e53009. doi: 10.3791/53009.
10. Morland R.H., Novejarque A., Spicer C., Pheby T., Rice A.S. Enhanced c-Fos expression in the central amygdala correlates with increased

- thigmotaxis inrats with peripheral nerve injury // Eur. J. Pain (Lond. Engl.). 2016. No. 20(7). P. 1140-1154. doi: 10.1002/ejp.839.
11. **Nesteruk M., Nesteruk T., Styczyńska M., Mandecka M., Barczak A., Barcikowska M.** Combined use of biochemical and volumetric biomarkers to assess the risk of conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease // *Folia Neuropathol.* 2016. No. 54(4). P. 369-374. doi: 10.5114/fn.2016.64815.
  12. **Prieto G.A., Trieu B.H., Dang C.T., Bilousova T., Gyls K.H., Berchtold N.C., Lynch G., Cotman C.W.** Pharmacological rescue of long-term potentiation in alzheimer diseased synapses // *J. Neurosci.* 2017. No. 37(5). P. 1197-1212. doi: 10.1523/jneurosci.2774-16.2016.
  13. **Robinson M., Lee B.Y., Hane F.T.** Recent progress in Alzheimer's disease research, Part 2: Genetics and Epidemiology // *J. Alzheimers Dis.* 2017. doi: 10.3233/jad-161149. [Epub ahead of print].
  14. **Seibenhener M.L., Wooten M.C.** Use of the Open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice // *J. Vis. Exp.* 2015. No. 96. e52434. doi:10.3791/52434.
  15. **Takao K., Miyakawa T.** Light/dark transition test for mice // *J. Vis. Exp.* 2006. No. 1. e104. doi:10.3791/104.
  16. **Thangavel R., Van Hoesen G.W., Zaheer A.** Posterior parahippocampal gyrus pathology in Alzheimer's disease // *Neuroscience.* 2008. No. 154(2). P. 667-676. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.03.077.
  4. **Jacobs S.A., Huang F., Tsien J.Z., Wei W.** Social Recognition Memory Test in Rodents // *Neuroscience.* 2016. No. 6(9). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1804.
  5. **Leal S.L., Landau S.M., Bell R.K., Jagust W.J.** Hippocampal activation is associated with longitudinal amyloid accumulation and cognitive decline // *Elife.* 2017. No. 6. pii: e22978. doi: 10.7554/eLife.22978. [Epub ahead of print].
  6. **Leo L.M., Pamplona F.A.** Elevated Plus Maze Test to Assess Anxiety-like Behavior in the Mouse // *Neuroscience.* 2014. No. 4(16). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1211.
  7. **Lugo J.N., Smith G.D., Holley A.J.** Trace fear conditioning in mice // *J. Vis. Exp.* 2014. No. 85. doi: 10.3791/51180.
  8. **Mak E., Gabel S., Su L., Williams G.B., Arnold R., Passamonti L., Vazquez Rodríguez P., Surendranathan A., Bevan-Jones W.R., Rowe J.B., O'Brien J.T.** Multi-modal MRI investigation of volumetric and microstructural changes in the hippocampus and its subfields in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and dementia with Lewy bodies // *Int. Psychogeriatr.* 2017. P. 1-11. doi: 10.1017/s1041610216002143. [Epub ahead of print].
  9. **Martin L., Iceberg E.** Quantifying social motivation in mice using operant conditioning // *J. Vis. Exp.* 2015. No. 102. e53009. doi: 10.3791/53009.
  10. **Morland R.H., Novejarque A., Spicer C., Pheby T., Rice A.S.** Enhanced c-Fosexpression in the central amygdala correlates with increased thigmotaxis inrats with peripheral nerve injury // *Eur. J. Pain (Lond. Engl.).* 2016. No. 20(7). P. 1140-1154. doi: 10.1002/ejp.839.
  11. **Nesteruk M., Nesteruk T., Styczyńska M., Mandecka M., Barczak A., Barcikowska M.** Combined use of biochemical and volumetric biomarkers to assess the risk of conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease // *Folia Neuropathol.* 2016. No. 54(4). P. 369-374. doi: 10.5114/fn.2016.64815.
  12. **Prieto G.A., Trieu B.H., Dang C.T., Bilousova T., Gyls K.H., Berchtold N.C., Lynch G., Cotman C.W.** Pharmacological rescue of long-term potentiation in alzheimer diseased synapses // *J. Neurosci.* 2017. No. 37(5). P. 1197-1212. doi: 10.1523/jneurosci.2774-16.2016.
  13. **Robinson M., Lee B.Y., Hane F.T.** Recent progress in Alzheimer's disease research, Part 2: Genetics and Epidemiology // *J. Alzheimers Dis.* 2017. doi: 10.3233/jad-161149. [Epub ahead of print].

## References

1. **Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Volkova V.V., Chernyh A.I., Shabalova A.A., Semenchukov A.A., Olovyannikova R.Ya., Salmina A.B.** Batareya testov dlya povedencheskogo fenotipirovaniya stareyushchih zhivotnyh v ehksperimente // *Uspekhi gerontologii.* 2017. T. 1. S. 49-56.
2. **Cubinková V., Valachová B., Brezovaková V., Szabó R., Zimová I., Kostecká Z., Jadhav S.** Next generation tau models in Alzheimer's disease research - virus based gene delivery systems // *Acta Virol.* 2017. No. 61(1). doi: 10.4149/av. 2017. 01. 13. [Epub ahead of print].
3. **Guillozet A.L., Weintraub S., Mash D.C., Mesulam M.M.** Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment // *Arch Neurol.* 2003. No. 60(5). P. 729-736. doi:10.1001/archneur.60.5.729.

14. *Seibenhener M.L., Wooten M.C.* Use of the Open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice // *J. Vis. Exp.* 2015. No. 96. e52434. doi:10.3791/52434.
15. *Takao K., Miyakawa T.* Light/dark transition test for mice // *J. Vis. Exp.* 2006. No. 1. e104. doi:10.3791/104.
16. *Thangavel R., Van Hoesen G.W., Zaheer A.* Posterior parahippocampal gyrus pathology in Alzheimer's disease // *Neuroscience.* 2008. No. 154(2). P. 667-676. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.03.077.

## Behavioral phenotypic analysis of animals with a genetic model of Alzheimer's disease

Ya.V. Gorina, Yu.K. Komleva, O.L. Lopatina, A.I. Chernykh, A.B. Salmina

The aim of the study was to research the development of social and cognitive impairments in the process of ontogenesis in animals with a genetic model of Alzheimer's disease.

The object of the study is a genetic model of Alzheimer's disease is the B6SLJ-Tg line mice (APP<sup>Swe</sup>/FILon, PSEN1 \* M146L \* L286V) 6799Vas, males aged 4 months. Control group – C57BL/6 x SJL mice, males aged 4 months. Neurobehavioral testing included the test «Open field», elevated plus maze, Light/dark transition test, a Three-chamber social test, Social recognition memory test in rodents, test «Fear conditioning».

We identified features of behavioral in animals Tg6799 line with the development of Alzheimer's disease. It increased the level of anxiety and lethargy, impaired social contacts and interactions, as well as spatial, social and associative learning and memory. Together, this indicates a disorder of emotional behavior, as well as long-term, social, spatial and emotional memory.

**Key words:** genetic animal model, Alzheimer's disease, memory, behavior.



## Измерение включения изотопной метки в выдыхаемый CO<sub>2</sub>

П.П. Золин, В.Д. Конвай

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск

Контактная информация: Золин Петр Петрович, zolin\_petr@mail.ru

В работе описан простой дыхательный тест на крысах с использованием изотопа <sup>14</sup>C. После внутривенного введения <sup>14</sup>C-глюкозы углекислый газ, выдыхаемый в камере, собирали при помощи воздухозаборной системы с насосом. Уровень <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> в выдыхаемом воздухе измеряли в течение 30 мин через 10-минутные интервалы. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод может применяться в медицинских и биологических исследованиях с использованием меченых веществ.

**Ключевые слова:** дыхательные тесты, изотопная метка, углекислый газ, глюкоза.

### Введение

Методы, связанные с использованием газоаналитического оборудования, находят в медико-биологических исследованиях все более широкое применение, прежде всего благодаря своей неинвазивности. Иногда объектом изучения является орган или кусочек (срез) ткани, но чаще такие исследования выполняются на целом организме человека или животного, когда анализируется выдыхаемый воздух.

В настоящее время известно, что в воздухе, выдыхаемом человеком и животными, может содержаться более 2000 разнообразных веществ [4, 9, 10, 14, 15, 18]; несколько десятков из них уже сейчас используется в эксперименте и в клинической диагностике в качестве биомаркеров, позволяющих судить о протекании физиологических и патологических процессов в организме.

Так, например, в ряде работ, выполненных на животных и людях, изучалась интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов, происходящих в организме, по содержанию в выдыхаемом воздухе различных алканов [4, 12, 13].

Еще более интересный пример. Считается, что молекулярный водород H<sub>2</sub> в животных тканях продуцируется только в процессе анаэробного метаболизма [14]. В состоянии покоя в организме здорового человека анаэробного обмена веществ не происходит, поэтому в выдыхаемом воздухе натошак H<sub>2</sub> должен отсутствовать; в случае же выделения H<sub>2</sub> через легкие в покое натошак его источником является жизнедеятельность анаэробных бактерий в кишечнике, что используется для диагностики ряда заболеваний [10, 14].

Кроме измерения количеств веществ в выдыхаемом воздухе, широко исследуется также включение в них изотопных меток, прежде всего углеродных, вводимых в составе метаболических предшественников: <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-глюкозы [16], <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-ксилозы [1, 5, 19], <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-лактозы [14], <sup>13</sup>C-фенилаланина [17], <sup>14</sup>C-лизина [11], <sup>13</sup>C-ацетата [21], <sup>13</sup>C-мочевины [7], <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-гликолевой кислоты [1, 5, 19], и т.д. При применении в качестве метки изотопов углерода (<sup>13</sup>C или <sup>14</sup>C) наиболее часто изучают включение метки в углекислый газ, реже – в другие компоненты выдыхаемого воздуха. Количество CO<sub>2</sub>, выделяемое организмом (выражаемое обычно в пересчете на единицу массы тела и на единицу времени дыхания), само по себе является рутинным показателем, но оно необходимо, чтобы вычислить удельную радиоактивность CO<sub>2</sub>, представляющую собой отношение включения радиоактивной метки в CO<sub>2</sub> к количеству CO<sub>2</sub>.

Согласно литературным данным, суммированным в работе [7], анализ состава выдыхаемого воздуха в реальном масштабе времени требует быстродействия измерений на уровне 0,1 с, анализ с усреднением по нескольким выдохам – около 5-10 с, анализ с накоплением пробы выдыхаемого воздуха и концентрированием – до 10-30 мин, анализ изотопного содержания выдыхаемого воздуха – 1-3 мин на исследуемую пробу. Отсюда следует, что одним из факторов, снижающих эффективность изучения выдыхаемого воздуха, является инерционность методов анализа, при оценке которой следует ориентироваться на вышеуказанные цифры и, кроме того, учитывать специфику исследования.

Инерционность изотопных исследований во многом определяется скоростью вовлечения в метаболизм введенного в организм меченого вещества и образования из него газообразных продуктов, выделяющихся через легкие. Кроме того, инерционность измерения всех компонентов выдыхаемого воздуха (меченых и немеченых) увеличивается из-за влияния приборного “мертвого” пространства, представляющего собой совокупный объем рабочих полостей аппаратуры, соединительных трубок и т.д. В начале сеанса измерения требуется некоторое время, зависящее от конструкции аппаратуры, в течение которого обычный атмосферный воздух в “мертвом” пространстве будет полностью вытеснен выдыхаемым воздухом. В дыхательных тестах на людях приходится пользоваться специальными приспособлениями и приемами, уменьшающими влияние “мертвого” пространства [16, 20]. При выполнении же работ на мелких лабораторных животных относительный объем “мертвого” пространства еще больше, чем при исследованиях на крупных животных и человеке, поскольку вместо использования маски или дыхательной трубки (мундштука) мелкое животное, как правило, сажают для измерений в дыхательную камеру, объем которой превышает размеры самого животного [17, 21].

Инерционность метода приводит к ложно заниженным результатам в начальном периоде измерения, так что эти начальные цифры обычно приходится отбрасывать до того временного периода, когда атмосферный воздух в “мертвом” пространстве будет полностью замещен выдыхаемым воздухом, и когда введенная в организм изотопная метка

в достаточной мере начнет включаться в  $\text{CO}_2$ . Но в некоторых видах исследований именно результаты начального периода представляют наибольшую ценность, поэтому актуальна разработка методических подходов, позволяющих уменьшить или устранить влияние инерционности измерений. Так, наши исследования постреанимационных метаболических нарушений [3, 22] показали, что в процессе реанимации следует как можно раньше вводить в организм изотопные метки для измерения их включения в продукты метаболизма, т.к. патологические сдвиги в самом раннем постреанимационном периоде очень интересны.

**Целью** настоящей работы является отработка на крысах метода измерения выделяемого ими  $\text{CO}_2$  и включения в  $\text{CO}_2$  изотопной метки, с учетом влияния инерционности анализа.

### **Материалы и методы**

Эксперименты выполнены на 29-ти нелинейных белых крысах-самцах массой 180-220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ЦНИЛ ОмГМУ и получавших стандартный лабораторный рацион при свободном доступе к воде и пище в соответствии с нормами содержания [2]. Все опыты выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes (ETS № 123, Strasbourg, 1986)).

Дизайн исследования включал применение плана параллельных групп и простой рандомизации. Известно, что

метод простой рандомизации в достаточной мере обеспечивает случайное разделение животных на группы, хотя и не приводит к равной численности групп [6]. Из 29-ти задействованных в опытах крыс 21 животное подвергли клинической смерти и реанимации. Для воспроизведения клинической смерти и постреанимационной болезни нами была избрана модель механической асфиксии: она технически не сложна и не сопряжена с использованием никаких, за исключением диэтилового эфира, фармакологических средств. При ее использовании моделируются нередко встречающиеся в клинической практике состояния: аспирация рвотных масс, спазм дыхательных путей, повешение, асфиксия новорожденных, утопление, внезапная остановка дыхания, попадание в бескислородную атмосферу и т.д.

Крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, фиксировали в положении на спине, интубировали полиэтиленовой трубкой диаметром 2 мм. Трубку фиксировали к верхней губе и полость рта тампонируют увлажненной салфеткой. После установления ритмичного дыхания трубку перекрывали на 6,5 мин, после чего животное реанимировали при помощи непрямого массажа сердца и искусственного дыхания. Из подвергнутых асфиксии крыс ( $n=21$ ) 8 реанимировать не удалось, а 13 успешно реанимированных животных разделили на опытные группы: 1-ую (6 крыс) и 2-ую (7 крыс). Остальные 8 крыс составили контрольную группу: их подвергали не асфиксии, а лишь «контрольным» манипуляциям – наркозу, фиксации, интубации.

Животным 1-ой опытной группы сразу же после появления у них сердечбие-

ния в ходе реанимации в предварительно отпрепарированную бедренную вену вводили <sup>14</sup>C-глюкозу в дозе 740 кБк\*кг<sup>-1</sup>, растворенную в 0,9% NaCl, который брали из расчета 2,5 мл\*кг<sup>-1</sup> массы тела крысы. Животным 2-ой опытной группы вводили по вышеописанной схеме <sup>14</sup>C-глюкозу через 60 мин после реанимации, а крысам контрольной группы – сразу после проведения «контрольных» манипуляций. В течение 30 мин после введения <sup>14</sup>C-глюкозы у животных всех групп измеряли выделение легкими углекислого газа, а затем всех крыс забивали под эфирным наркозом для исследования включения изотопной метки в метаболиты внутренних органов.

Для измерения выделения крысами CO<sub>2</sub> и включения в него глюкозной метки животных всех групп сразу после введения <sup>14</sup>C-глюкозы помещали в герметически закрываемую стеклянную дыхательную камеру объемом 1 л, через входную трубку в которую подавался воздух, очищенный от атмосферного CO<sub>2</sub> пропусканием через насыщенный р-р NaOH и освобожденный от следов NaOH продуванием через марлевый тампон. Эффективность очистки поступающего в камеру воздуха от атмосферного CO<sub>2</sub> проверяли, поместив в воздухопроводную систему перед камерой контрольную склянку с р-ром Ва(ОН)<sub>2</sub>. При пропускании через нее воздуха даже в течение 1 ч р-р не должен мутнеть: это доказывает, что воздух, поступающий в камеру, полностью очищен от CO<sub>2</sub>. Освобождение атмосферного воздуха от CO<sub>2</sub> необходимо для стандартизации дыхательного теста, поскольку содержание в воздухе CO<sub>2</sub> может существенно различаться в разных помещениях и в разные дни.

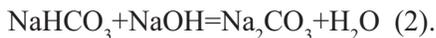
Выходная трубка располагалась с противоположной стороны дыхательной камеры от места подачи воздуха через входную трубку. Выходящий из камеры с крысой воздух, содержащий выдыхаемый ею углекислый газ, пропускали с целью его улавливания через 30 мл 10% р-ра NaOH, залитого в три последовательно соединенные сосуда Дрекслея (по 10 мл в каждом) с внутренним диаметром 1,5 см. Прокачивание воздуха через описанную систему осуществлялось насосом “Unipan 335 A” со скоростью 80 мл\*мин<sup>-1</sup>. Эта скорость, а также время нахождения крысы в дыхательной камере, объем и концентрации р-ров были определены нами в отдельной серии пробных измерений, выполненных на здоровых крысах. Дистиллированную воду, на которой готовили р-ры NaOH, предварительно освобождали от растворенного атмосферного CO<sub>2</sub> кипячением в течение 40 мин.

Через 10 мин, а затем через 20 мин после посадки крысы в дыхательную камеру 10% р-р NaOH, залитый по 10 мл в три последовательно соединенные сосуда Дрекслея, заменяли на свежий. Таким образом, получали три периода измерения: 0-10, 10-20 и 20-30 мин после посадки крысы в дыхательную камеру.

Р-р NaOH после каждого 10-минутного периода улавливания CO<sub>2</sub> сливали из трех сосудов Дрекслея в стеклянные флаконы объемом 30 мл, так что уровень жидкости доходил до пробки, и воздуха над жидкостью практически не было. Флаконы хранили при комнатной температуре для определения количества CO<sub>2</sub> и включения в CO<sub>2</sub> изотопной метки.

При пропускании CO<sub>2</sub> через р-р NaOH протекают реакции:



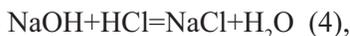


Суммарное уравнение этих реакций следующее:



Таким образом, соотношение между  $\text{CO}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – эквимолярное.

Для определения количества  $\text{CO}_2$ , выдыхаемого крысами, из 30 мл 10% р-ра  $\text{NaOH}$ , слитого из сосудов Дрекслея, отбирали аликвоты по 2 мл и титровали на рН-метре р-рами  $\text{HCl}$ . На первом этапе методики титрование проводили сначала 2М-ным, затем 0,025 М-ным р-рами  $\text{HCl}$  до рН 8,35. При этом титруется весь  $\text{NaOH}$ , содержащийся в пробе, по уравнению:



и половинное количество  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , содержащегося в пробе, по уравнению:



Объем  $\text{HCl}$ , пошедший на титрование на первом этапе, и ее концентрацию можно не учитывать (они не нужны для расчетов).

На втором этапе методики титруется оставшееся половинное количество  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , содержащееся в пробе, по уравнению:



Это состояние достигается при рН=3,9. Для титрования в данном случае используется 0,025 М-ная  $\text{HCl}$ ; ее объем, пошедший на титрование (в мл), протоколируется и используется для расчетов.

Количество выделенного крысой  $\text{CO}_2$  рассчитывали по формуле:

$$Q\text{CO}_2 = V * 25 * 2 * 15 / m * 600 \quad (7),$$

где: V – объем 0,025 М-ной  $\text{HCl}$ , пошедший на титрование, в мл;

25 – количество мкмоль  $\text{NaHCO}_3$ , титруемое одним миллилитром 0,025 М-ной  $\text{HCl}$ : поскольку в 1 мл 0,025 М-

ной  $\text{HCl}$  содержится 25 мкмоль  $\text{HCl}$ , а соотношение между  $\text{HCl}$  и  $\text{NaHCO}_3$  – эквимолярное (уравнение 6), то 1 мл 0,025 М-ной  $\text{HCl}$  будет расходоваться на 25 мкмоль  $\text{NaHCO}_3$ ;

2 – коэффициент пересчета количества  $\text{NaHCO}_3$  в количество  $\text{CO}_2$ : поскольку соотношение между количествами  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  равно 1:2 (уравнения 5 и 6), а соотношение между  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{CO}_2$  – эквимолярное (уравнение 3), то соотношение между количествами  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{CO}_2$  равно 1:2;

15 – коэффициент пересчета на полный объем  $\text{NaOH}$  с поглощенным углекислым газом в трех сосудах Дрекслея, поскольку титровали 2 мл из 30 мл;

m – масса крысы, выраженная в кг;

600 – время нахождения крысы в дыхательной камере, выраженное в секундах (с).

После сокращений в формуле 7 получаем итоговую формулу:

$$Q\text{CO}_2 = 1,25 * V / m \quad (8).$$

Выделение крысами углекислого газа  $Q\text{CO}_2$ , полученное по формуле 8, выражается в мкмоль  $\text{CO}_2 * \text{с}^{-1} * \text{кг}^{-1}$  массы тела крысы, где секунды означают время нахождения крысы в дыхательной камере.

Для определения радиоактивности углекислого газа, выдыхаемого крысами после введения им  $^{14}\text{C}$ -глюкозы, из 30 мл 10% р-ра  $\text{NaOH}$ , слитого из сосудов Дрекслея, отбирали аликвоты по 2 мл, нейтрализовали насыщенным р-ром лимонной кислоты до рН=7, и 0,2 мл нейтрализованного р-ра смешивали с 10 мл сцинтиллятора Брея. Радиоактивность измеряли методом жидкостной сцинтилляционной радиометрии в счетчике СБС-2 при времени счета 120 с. Результаты включения метки в  $\text{CO}_2$  выражали в  $\text{имп} * \text{с}^{-1} * \text{кг}^{-1}$  массы

тела крысы, где секунды означают время счета пробы в счетчике радиоактивности (а не время нахождения крысы в дыхательной камере).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США): для каждой группы вычисляли среднюю арифметическую и ошибку средней.

### Результаты и их обсуждение

Выделение углекислого газа (QCO<sub>2</sub>) крысами контрольной группы в течение 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин после посадки крыс в дыхательную камеру составило соответственно: 15,9±1,1; 22,1±0,9 и 28,4±1,1 мкмоль CO<sub>2</sub>\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы тела крыс (здесь и далее приводятся средняя арифметическая ± ошибка средней). Включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub> в течение 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин после посадки крыс в дыхательную камеру равнялось в контрольной группе соответственно 444±120, 1066±172 и 1566±257 имп\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы тела.

Из приведенных цифровых данных видно, что оба изучаемых нами показателя с течением времени измерения нарастают и достигают максимума в интервал времени 20-30 мин. Мы приняли этот максимальный уровень за 100%, чтобы сравнить между собой динамику нарастания двух изучаемых показателей: оказалось, что выделение CO<sub>2</sub> крысами контрольной группы в периоды 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин после посадки крыс в дыхательную камеру равно в среднем 56%, 78% и 100% соответственно, а включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub> – соответственно, 28%, 68% и 100%.

Обращает на себя внимание отставание второго показателя от первого в

течение периода 10-20 мин и, особенно, в период 0-10 мин после начала измерений. Причина выявленного отставания, как мы полагаем, заключается в следующем.

Величина QCO<sub>2</sub> нарастает в интервалы времени 0-10 мин и 10-20 мин из-за вытеснения обычного атмосферного воздуха в измерительной системе выдыхаемым воздухом – это инерционность измерений, обусловленная приборным “мертвым” пространством. Благодаря тому, что за первые 20 мин нахождения крысы в дыхательной камере заполнение ее выдыхаемым воздухом завершается, выделение CO<sub>2</sub> в последующие интервалы времени зависит уже не от инерционности метода, а только от интенсивности обмена веществ: QCO<sub>2</sub> определяется суммарным образованием CO<sub>2</sub> во всех реакциях декарбоксилирования в организме за вычетом суммарного потребления в метаболизме некоторой части образовавшегося CO<sub>2</sub>. Известно, что наибольшее количество CO<sub>2</sub> образуется в реакциях окислительного декарбоксилирования, катализируемых изоцитратдегидрогеназой и α-кетоглутаратдегидрогеназным комплексом цикла трикарбоновых кислот, а также пируватдегидрогеназным комплексом. Цикл трикарбоновых кислот, являющийся общим конечным этапом катаболизма углеводов, липидов и белков, генерирует примерно две трети всего CO<sub>2</sub>, образующегося в организме [8].

А на включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub>, во-первых, влияет точно так же, как и на QCO<sub>2</sub>, “мертвое” пространство измерительной системы, а, во-вторых, на него дополнительно влияет скорость вовлечения в метаболизм внутривенно введенной меченой глюкозы. Молеку-

лам  $^{14}\text{C}$ -глюкозы требуется время, чтобы проникнуть из кровеносного русла внутрь клеток, затем большая часть этих молекул постепенно превращается в  $^{14}\text{CO}_2$  в реакциях гексозобисфосфатного и гексозомонофосфатного путей метаболизма. Наиболее интенсивно гексозомонофосфатный цикл протекает в эритроцитах, клетках печени, жировой ткани, надпочечников и половых желез; но даже в перечисленных клетках на долю гексозомонофосфатного пути приходится не более 25-30% от всего количества метаболизируемой в них глюкозы, а остальная глюкоза во всем организме окисляется преимущественно в гексозобисфосфатном пути [8]. Небольшая часть  $^{14}\text{C}$ -глюкозы и ее метаболитов, не окислившись сразу до  $^{14}\text{CO}_2$ , вовлекается в более долгие превращения через гликоген, липиды, пентозы, белки и т.д.

Допустимая величина инерционности изотопных исследований определяется тематикой и задачами выполняемой работы, от них же зависит и способ введения метки в организм. Например, в работе по диетологии [17], чтобы исключить влияние инерционности, начинали собирать выдыхаемый воздух для измерения включения изотопной метки в  $\text{CO}_2$  только через 30 мин после орального введения крысе метки и посадки ее в дыхательную камеру. Т.е. первые 30 мин после введения изотопной метки тратились только на то, чтобы заполнить “мертвое” пространство измерительной системы выдыхаемым воздухом, а выделение крысой  $\text{CO}_2$  в этот период не учитывалось. Однако в реаниматологии крайне важен начальный временной период после клинической смерти. Наши предыдущие работы [3, 22], выполнен-

ные на такой же модели, что и сейчас (6,5-минутная асфиксия и реанимация у крыс), показали, что именно в первые 30 мин постреанимационного периода можно ожидать выраженных изменений показателей энергетического обмена. Поэтому необходимо было скорректировать влияние инерционности измерений на результаты нашего исследования.

Способы борьбы с влиянием инерционности в исследованиях выдыхаемого воздуха можно разделить на две группы: 1 – технические (физические) и 2 – математические.

К первой группе относится способ снижения инерционности метода путем увеличения скорости пропускания воздуха через систему. Нам таким образом удавалось ускорить на несколько минут время полного вытеснения атмосферного воздуха в измерительной системе выдыхаемым воздухом. В работе [21] подробно изучено влияние трех скоростей прокачивания воздуха через дыхательную камеру (75, 150 и 300 мл\*мин<sup>-1</sup>) на включение метки в  $\text{CO}_2$ . Однако мы отказались от увеличения скорости прокачивания, поскольку быстрое движение воздуха через дыхательную камеру само по себе является стресс-фактором для животного, способным повлиять на результаты, причем оно может влиять по-разному на контрольную крысу и на крысу, недавно реанимированную, которая еще слабо реагирует на внешние воздействия. Еще один технический способ заключается в том, чтобы уменьшить объем “мертвого” пространства, – например, посадку животного в дыхательную камеру заменить его интубацией. Но длительное присутствие интубационной трубки в трахее может нарушить физиологичность дыхания,

а также привести к отеку слизистой. Можно изменить режим введения животному <sup>14</sup>C-глюкозы, применив вместо болюсной инъекции непрерывную инфузию, но это также не является радикальным решением проблемы инерционности. Таким образом, технические способы борьбы с влиянием инерционности измерений чреваты усложнением методики и недостаточно эффективны.

Математические способы позволяют, не уменьшая физически “мертвое” пространство и другие слагаемые инерционности метода, скорректировать их влияние на конечный результат. Тем самым уменьшается систематическая ошибка, порождаемая растянутостью во времени процесса вовлечения <sup>14</sup>C-глюкозы в метаболизм и обновления воздуха в газоаналитической системе. Этот подход помогает устранять и другие систематические ошибки, в частности, ошибку, связанную с тем, что животное при посадке в дыхательную камеру испытывает стресс (что может влиять на изучаемые показатели в начале измерений) и лишь через некоторое время успокаивается.

Наличие большого количества (порядка 10-20) интервалов времени в процессе измерения включения метки в CO<sub>2</sub> дает возможность установить вид математической зависимости изучаемых показателей от времени [11, 16, 20, 21]. Получив таким образом математическое описание влияния инерционности на изучаемые показатели для контрольной группы, можно затем использовать его для корректировки результатов опытных групп. Но, как констатирует Е.В. Степанов [7], в настоящее время при исследованиях выдыхаемого воздуха ни один из существующих методических подходов не

может обеспечить всей совокупности необходимых аналитических характеристик, поэтому на практике для повышения, например, чувствительности анализа приходится жертвовать другими характеристиками – как правило, быстродействием и/или точностью. Мы не могли разделить процесс улавливания CO<sub>2</sub> на множество коротких интервалов времени, т.е. увеличить быстродействие анализа, поскольку при имеющейся чувствительности метода необходимо время порядка 10 мин, чтобы накопилось достаточное количество <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> для измерения его радиоактивности с приемлемой точностью. В итоге у нас оказалось всего три интервала времени, и мы применили простой способ корректировки влияния инерционности: для каждой крысы контрольной группы значение изучаемого показателя за интервал времени 0-30 мин после посадки в дыхательную камеру делили на значение этого показателя за интервалы 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин, и на полученные поправочные коэффициенты умножали результаты реанимированных животных из 1-ой и 2-ой опытных групп, полученные в те же интервалы времени.

Скорректированные результаты в 1-ой опытной группе (6 крыс), сформированной сразу после клинической смерти и реанимации, имеют следующую динамику: после посадки крыс в дыхательную камеру в первые 0-10 мин QCO<sub>2</sub> равно 13,1±1,0; в период 10-20 мин – 9,9±1,0; в период 20-30 мин – 12,6±1,9 мкмоль CO<sub>2</sub>\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы крысы. Включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub> в те же интервалы времени составляло соответственно 113±28; 129±24 и 284±56 имп\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы крысы.

В 2-ой опытной группе, где измерения начинали через 60 мин после реанимации, до этого момента не дожила одна крыса из семи, таким образом, выборка состояла из шести животных. В этой группе величина  $\text{QCO}_2$  в первые 10 мин после посадки крыс в дыхательную камеру составила  $26,4 \pm 2,7$ ; в период 10-20 мин –  $28,8 \pm 2,7$ ; в период 20-30 мин –  $21,1 \pm 1,3$   $\text{мкмоль CO}_2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$  массы крысы. Включение  $^{14}\text{C}$ -глюкозы в  $\text{CO}_2$  в указанные временные промежутки равнялось соответственно  $1363 \pm 275$ ;  $1399 \pm 372$  и  $1009 \pm 177$   $\text{имп} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$  массы крысы.

Из приведенных данных видно, что, как мы и ожидали, в первые 30 мин после реанимации происходят более выраженные изменения обоих изучавшихся показателей, чем спустя час-полтора. Детальная биохимическая интерпретация полученных результатов выходит за рамки настоящей работы, поскольку предполагает сопоставление включения  $^{14}\text{C}$ -глюкозы в  $\text{CO}_2$  с ее включением в липиды, гликоген и другие метаболиты внутренних органов.

Описанные нами методические приемы могут быть использованы при изучении различных показателей выдыхаемого воздуха, прежде всего – для измерения включения изотопных меток в  $\text{CO}_2$ .

### Выводы

1. Оработана методика измерения количества выделенного крысами  $\text{CO}_2$  и включения в  $\text{CO}_2$  изотопной метки из  $^{14}\text{C}$ -глюкозы.

2. С целью корректировки влияния инерционности на результаты измерений цифровые данные контрольной группы были использованы для вычи-

сления поправочных коэффициентов, на которые затем умножались данные опытных групп. Это позволило получить результаты измерений изучаемых показателей, начиная с самого первого интервала времени после введения крысам изотопной метки и посадки в дыхательную камеру.

### Список литературы

1. *Денисенко Т.Л., Перфилова К.М., Неумоина Н.В., Шутова И.В., Неумоина М.В., Ефимова Е.И.* Диагностика СИБР у больных хеликобактер-ассоциированной гастродуоденальной патологией // Вестник ННГУ. 2012. № 2-3. С. 41-44.
2. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В.* Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. - Киев: Вища школа. 1983. 383 с.
3. *Золин П.П., Лебедев В.М., Конвай В.Д.* Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа: монография. - Омск: Изд-во Омского гос. ун-та. 2009. 344 с.
4. *Копылов Ф.Ю., Сыркин А.Л., Чомахидзе П.Ш., Быкова А.А., Шалтаева Ю.Р., Беляков В.В., Першенков В.С., Самотаев Н.Н., Головин А.В., Васильев В.К., Малкин Е.К., Громов Е.А., Иванов И.А., Липатов Д.Ю., Яковлев Д.Ю.* Перспективы диагностики различных заболеваний по составу выдыхаемого воздуха // Клиническая медицина. 2013. № 10. С. 16-21.
5. *Немцов Л.М.* Синдром избыточного бактериального роста: актуальные вопросы диагностики и менеджмента // Вестник ВГМУ. 2015. Т. 14. № 2. С. 5-15.
6. *Сергиенко В.И., Бондарева И.Б.* Математическая статистика в клинических исследованиях. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2006. 304 с.
7. *Степанов Е.В.* Методы высокочувствительного газового анализа молекул-биомаркеров в исследованиях выдыхаемого воздуха // Труды ИОФАН. 2005. Т. 61. С. 5-47.
8. *Щербак И.Г.* Биологическая химия. - СПб: Изд-во СПбГМУ. 2005. 480 с.
9. *Saio W., Duan Y.* Breath analysis: potential for clinical diagnosis and exposure assessment // Clin. Chem. 2006. V. 52. P. 800-811.

10. Eisenmann A., Amann A., Said M., Datta B., Ledochowski M. Implementation and interpretation of hydrogen breath tests // *J. Breath Res.* 2008. V. 2. No. 4. 046002 (9 pp) doi:10.1088/1752-7155/2/4/046002. Epub 2008 Jul 24. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7155/2/4/046002/pdf>.
11. Gahl M.J., Benevenga N.J., Crenshaw T.D. Rates of lysine catabolism are inversely related to rates of protein synthesis when measured concurrently in adult female rats induced to grow at different rates // *J. Nutr.* 1998. V. 128. No. 9. P. 1503-1511.
12. Kivits G.A.A., Ganguli-Swarttouw M.A.C.R., Christ E.J. The composition of alkanes in exhaled air of rats as a result of lipid peroxidation *in vivo*. Effects of dietary fatty acids, vitamin E and selenium // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 665. No. 3. P. 559-570.
13. Kneepkens C.M., Lepage G., Roy C.C. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. V. 17. No. 2. P. 127-160.
14. Ledochowski M. Hydrogen breath tests. - Innsbruck: Verlag Ledochowski, 2008. 64 p.
15. Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F. Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds // *Clin. Chim. Acta.* 2004. V. 347. P. 25-39.
16. Moseley L., Jentjens R.L.P.G., Waring R.H., Harris R.M., Harding L.K., Jeukendrup A.E. Measurement of exogenous carbohydrate oxidation: a comparison of [U-14C]glucose and [U-13C]glucose tracers // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 288. No. 2. P. E206-E211.
17. Ogawa A., Murayama H., Hayamizu K., Kobayashi Y., Kuwahata M., Kido Y. A Simple evaluation method for the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation technique // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2015. V. 61. No. 2. P. 123-130.
18. Phillips M., Herrera J., Krishnan S., Zain M., Greenberg J., Cataneo R.N. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999. V. 729. No. 1-2. P. 75-88.
19. Quera R.P., Quigley E.M., Madrid A.M. Sobrecrecimiento bacteriano intestinal // *Rev. Med. Chil.* 2005. V. 133. P. 1361-1370.
20. Raj T., Kuriyan R., Kurpad A.V. Bicarbonate kinetics in Indian males // *J. Biosci.* 2006. V. 31. P. 273-280.
21. Uchida M., Endo N., Shimizu K. Simple and noninvasive breath test using <sup>13</sup>C-acetic acid to evaluate gastric emptying in conscious rats and its validation by metoclopramide // *J. Pharmacol. Sci.* 2005. V. 98. No. 4. P. 388-395.
22. Zolin P.P., Conway V.D. Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats // *Bul. Exper. Biol.* 1997. V. 124. No. 6. P. 1180-1182.

## References

1. Denisenko T.L., Perfilova K.M., Neumoina N.V., Shutova I.V., Neumoina M.V., Efimova E.I. Diagnostika SIBR u bol'nyh helikobakter-associrovannoj gastroduodenal'noj patologiej // *Vestnik NNGU.* 2012. № 2-3. S. 41-44.
2. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zahariya E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержание, ispol'zovanie v ehksperimente. - Kiev: Vishcha shkola. 1983. 383 s.
3. Zolin P.P., Lebedev V.M., Konvaj V.D. Matematicheskoe modelirovanie biokhimicheskikh processov s primeneniem regressionnogo analiza: monografiya. - Omsk: Izd-vo Omskogo gos. un-ta. 2009. 344 s.
4. Kopylov F.Yu., Syrkin A.L., Chomahidze P.Sh., Bykova A.A., Shaltaeva Yu.R., Belyakov V.V., Pershenkov V.S., Samotaev N.N., Golovin A.V., Vasil'ev V.K., Malkin E.K., Gromov E.A., Ivanov I.A., Lipatov D.Yu., Yakovlev D.Yu. Perspektivy diagnostiki razlichnyh zaboлевaniy po sostavu vydyhaemogo vozduha // *Klinicheskaya medicina.* 2013. № 10. S. 16-21.
5. Nemcov L.M. Sindrom izbytochnogo bakterial'nogo rosta: aktual'nye voprosy diagnostiki i menezhmenta // *Vestnik VGMU.* 2015. T.14. № 2. S. 5-15.
6. Sergienko V.I., Bondareva I.B. Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyah. - M.: GEHOTAR-Media. 2006. 304 s.
7. Stepanov E.V. Metody vysokochuvstvitel'nogo gazovogo analiza molekul-biomarkerov v issledovaniyah vydyhaemogo vozduha // *Trudy IOFAN.* 2005. T. 61. S. 5-47.
8. Shcherbak I.G. Biologicheskaya himiya. - SPb: Izd-vo SPbGMU. 2005. 480 s.
9. Cao W., Duan Y. Breath analysis: potential for clinical diagnosis and exposure assessment // *Clin. Chem.* 2006. V. 52. P. 800-811.
10. Eisenmann A., Amann A., Said M., Datta B., Ledochowski M. Implementation and

- interpretation of hydrogen breath tests // *J. Breath Res.* 2008. V. 2. No. 4. 046002 (9 pp) doi:10.1088/1752-7155/2/4/046002. Epub 2008 Jul 24. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7155/2/4/046002/pdf>.
11. **Gahl M.J., Benevenga N.J., Crenshaw T.D.** Rates of lysine catabolism are inversely related to rates of protein synthesis when measured concurrently in adult female rats induced to grow at different rates // *J. Nutr.* 1998. V. 128. No. 9. P. 1503-1511.
  12. **Kivits G.A.A., Ganguli-Swartouw M.A.C.R., Christ E.J.** The composition of alkanes in exhaled air of rats as a result of lipid peroxidation *in vivo*. Effects of dietary fatty acids, vitamin E and selenium // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 665. No. 3. P. 559-570.
  13. **Kneepkens C.M., Lepage G., Roy C.C.** The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. V. 17. No. 2. P. 127-160.
  14. **Ledochowski M.** Hydrogen breath tests. - Innsbruck: Verlag Ledochowski, 2008. 64 p.
  15. **Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F.** Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds // *Clin. Chim. Acta.* 2004. V. 347. P. 25-39.
  16. **Moseley L., Jentjens R.L.P.G., Waring R.H., Harris R.M., Harding L.K., Jeukendrup A.E.** Measurement of exogenous carbohydrate oxidation: a comparison of [U-14C]glucose and [U-13C]glucose tracers // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 288. No. 2. P. E206-E211.
  17. **Ogawa A., Murayama H., Hayamizu K., Kobayashi Y., Kuwahata M., Kido Y.** A Simple evaluation method for the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation technique // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2015. V. 61. No. 2. P. 123-130.
  18. **Phillips M., Herrera J., Krishnan S., Zain M., Greenberg J., Cataneo R.N.** Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999. V. 729. No. 1-2. P. 75-88.
  19. **Quera R.P., Quigley E.M., Madrid A.M.** Sobrecrecimiento bacteriano intestinal // *Rev. Med. Chil.* 2005. V. 133. P. 1361-1370.
  20. **Raj T., Kuriyan R., Kurpad A.V.** Bicarbonate kinetics in Indian males // *J. Biosci.* 2006. V. 31. P. 273-280.
  21. **Uchida M., Endo N., Shimizu K.** Simple and noninvasive breath test using <sup>13</sup>C-acetic acid to evaluate gastric emptying in conscious rats and its validation by metoclopramide // *J. Pharmacol. Sci.* 2005. V. 98. No. 4. P. 388-395.
  22. **Zolin P.P., Conway V.D.** Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats // *Bul. Exper. Biol.* 1997. V. 124. No. 6. P. 1180-1182.

## Measurement of the isotopic label incorporation in the breath CO<sub>2</sub>

P.P. Zolin, V.D. Conway

This study reports a simple <sup>14</sup>C-breath test in rats. The expired carbon dioxide in the chamber was collected in a breath-sampling system using a pump after intravenous injection of <sup>14</sup>C-glucose. The level of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in the expired air was measured at 10-min intervals for 30 min. The received data confirm that this method is suitable for medical and biological investigations using labeled compounds.

**Key words:** breath tests, isotopic label, carbon dioxide, glucose.

## Методика оценки системы детоксикации ксенобиотиков у лабораторных животных

Г.Д. Капанадзе<sup>1</sup>, А.О. Ревякин<sup>1</sup>, Е.Б. Шустов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Контактная информация: д.б.н. Капанадзе Гия Джемалиевич, [giyak@yandex.ru](mailto:giyak@yandex.ru)

В целях более точной оценки безопасности лекарственных средств в преклинических исследованиях была предложена методика оценки системы детоксикации ксенобиотиков у лабораторных животных. Исследование выполнено на двух видах лабораторных животных – лягушках и крысах. В качестве токсического ксенобиотика использовалось два препарата с принципиально различными механизмами действия и разными путями детоксикации – этиловый спирт и цисплатин. Бальная оценка токсического действия ксенобиотиков осуществлялась методом экспертного шкалирования. Проведенное исследование показало, что об эффективности системы детоксикации ксенобиотиков можно судить по данным токсикологических исследований их острой токсичности на основании динамики суммарной бальной оценки выраженности признаков интоксикации.

**Ключевые слова:** безопасность лекарственных средств, преклинические исследования, система детоксикации, лабораторные животные.

### Введение

Система детоксикации организма является ключевой в оценке безопасности лекарственных средств. Несмотря на обилие методических рекомендаций по фармакотоксикологическим исследованиям [3], нам не удалось обнаружить методики оценки именно этого параметра. Очевидной методической сложностью является невозможность в одной методике учесть специфические для конкретных ксенобиотиков виды их токсического действия (нейротоксического, кардиотоксического, нефротоксического, гепатотоксического, миелотоксического и др.). Однако, несмотря на разные аспекты токсического действия конкретного ксенобиотика, в пределах вида лабораторных животных (а иногда – отдельных генетических линий) можно выявить признаки общих,

неспецифических токсических проявлений в картине поведения и внешнего вида животных. Как правило, такие признаки весьма разнообразны и могут иметь признаки разных степеней нарушения физиологических функций (от минимальной выраженности до крайне тяжелых), что позволяет, во-первых, разработать для них полуколичественную шкалу (бальные оценки тяжести проявления интоксикации) и, во вторых, разработать на их основе интегральную (суммарную) оценку токсического действия ксенобиотика на организм животного.

Такой подход позволяет легко получить динамическую картину развития интоксикации и процессов детоксикации организма, в т.ч. в виде графической (токсикодинамической) кривой (по горизонтальной оси – время от введения

ксенобиотика, по вертикальной оси – суммарная бальная оценка выраженности токсического действия). На такой кривой могут быть выделены фазы токсического процесса: фаза нарастания признаков интоксикации, фаза динамического равновесия (плато) и фаза снижения выраженности интоксикации (фаза детоксикации).

Очевидно, что чем выше введенная доза препарата, тем более напряженно должна будет работать система детоксикации. Поэтому в оценке ее работы необходимо учитывать дозовые особенности и особенности всасывания и распределения ксенобиотика по организму. Для лекарственных препаратов эти особенности, как правило, отражаются в параметрах фармакокинетики.

Нарастание признаков интоксикации будет характеризовать фазу всасывания и распределения ксенобиотика, снижение – фазу его метаболической трансформации и выведения. Нами было принято допущение, что чем мощнее у животного система детоксикации, тем быстрее в картине формирующегося общетоксического действия будут отмечаться признаки его снижения. Поэтому для характеристики эффективности системы детоксикации более значимыми будут не уровневые (например, максимальная выраженность признаков токсического действия), а темповые характеристики – отношение уровня соответствующей фазы к ее длительности, которые будут характеризовать скорости анализируемых процессов.

### **Материалы и методы**

Исследование выполнено на двух видах лабораторных животных – лягушках *Xenopus laevis*, полученных из ФГБНУ

«Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства» (ФГБНУ ВНИИР), и грызунах (беспородных белых крысах-самцах массой 180-210 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).

Данное исследование было выполнено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей от 18.03.1986 г. (в редакции Протокола ETS № 170, вступление в силу 02.12.2005 г.), Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [4].

Данное исследование было рассмотрено биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и одобрено для проведения.

Животные содержались в условиях сертифицированного вивария. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Лягушки (*Xenopus laevis*) средней массой 24 г содержались в 160-литровых аквариумах с водоочисткой и принудительной аэрацией. Кормление осуществлялось личинками хирономид с добавлением форелевого комбикорма по поедаемости. Температура воды в аквариумах поддерживалась на уровне 15-16°C.

Лабораторные крысы содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem, группами по 3 особи в клетке. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 20-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

В течение исследования каждое животное осматривалось ежедневно. Осмотр включал в себя оценку поведения и общего состояния животных. При введении препарата осмотр проводился примерно через 1 ч после введения.

Животные были распределены по группам методом рандомизации. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер. Название исследования, номер исследуемой группы, а также индиви-

дуальные номера содержащихся в группе животных указывались на карточке клетки. Оставшиеся после формирования групп животные были включены в стоковую популяцию для использования внутри исследовательской организации.

В качестве токсического ксенобиотика использовалось два препарата с принципиально различным механизмом действия и разными путями детоксикации – этиловый спирт и цисплатин. Дозы ксенобиотиков для оценки динамики симптомов интоксикации выбирались исходя из известных данных об их острой токсичности для соответствующего вида животных при внутрижелудочном пути введения [1].

Для оценки признаков общей интоксикации использовались принципы и критерии, изложенные в работах [2-4]. Наблюдение за животными осуществлялось на протяжении 5-7 (в зависимости от выраженности общетоксического действия) суток. При этом в первые сутки регистрация признаков токсического действия осуществлялась через 1, 2, 4, 8, 16 и 24 ч, на вторые и последующие сутки – 2 раза в день. В случае нормализации поведения животных на вторые и последующие сутки оценка состояния животного проводилась 1 раз в день.

Разработка бальных оценок признаков интоксикации осуществлялась методом экспертного шкалирования с привлечением в качестве экспертов профильных специалистов ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Интегральная (суммарная) оценка выраженности признаков острой интоксикации отражалась графически в виде динамической хроноинтоксикационной кривой, которая подвергалась дальнейшему статистическому и математическому анализу.

**Результаты и их обсуждение** оценки выраженности признаков Обобщенная методом экспертно- острой интоксикации представлена в го шкалирования система бальной табл. 1 и 2.

Таблица 1  
Бальная оценка токсического действия ксенобиотиков при остром пероральном введении лягушкам

Признак	Бальная оценка
Нормальное поведение	0
Кратковременные эпизоды возбуждения с последующим угнетением	1
Повторные эпизоды возбуждения, чередующиеся с угнетением	2
Кратковременное выраженное возбуждение, «мечется по аквариуму»	2
Длительная повышенная двигательная активность	2
Длительное выраженное возбуждение, «мечется по аквариуму»	3
Сниженная двигательная активность	2
Выраженная заторможенность, замедленность движений	3
Полная неподвижность, адинамия	4
Одиночные эпизоды судорожных реакций	4
Длительные стойкие судорожные реакции	5
Нетипичное (неадекватное) поведение	3
Не резко выраженная «сморщенность» кожи	4
Резко выраженная «сморщенность» кожи	5
Отечность внешних покровов	4
Реакция на раздражение (повреждение) слизистой рта (пытается лапами освободить пасть от соединения)	3
Подавление аппетита	3
Полный отказ от корма	4
Появление пены из пасти	5
Гибель животного	20

Таблица 2  
Бальная оценка признаков интоксикации у мелких грызунов (мыши, крысы)

Признак	Оценка (баллы)
<b>Реакция на взятие в руки</b>	
Типичная умеренная реакция	0
Высокая или низкая реакция	1
Отсутствие реакции	4
Вокализация при перемещении из клетки или взятия на руки	1
<b>Максимальная оценка</b>	<b>5</b>
<b>Осмотр животных в клетке</b>	
Внешний вид (глаза, зрачковый статус, уши, зубы, нос, дыхание, шерсть, тонус мускулатуры, конечности) – норма	0
Ксерофтальмия или слезотечение, отечность	2
Глаза – воспаление, нагноение	2
Экзофтальм	2
Миоз или мидриаз	1
Птоз век	1
Глазная щель полностью закрыта	2
Уши – нагноение, воспаление	1
Уши – бледность или цианотичность	2

Признак	Оценка (баллы)
Зубы – изменение цвета	1
Зубы – сломанные	2
Зубы – выпадение	3
Нос – покраснение	1
Нос - обильные выделения	2
Нос – выделение крови	3
Слюнотечение	1
Взъерошенность шерсти, утрата ее блеска	1
Неестественный цвет или загрязненность шерсти	2
Выпадение шерсти	3
Конечности бледные или гиперемированные	1
Конечности отечные	2
Истощение	3
Ожирение	2
Кровотечение умеренное	3
Кровотечение выраженное	4
Изменение цвета выделений	1
Наличие крови в выделениях	2
<b>Максимальная оценка</b>	<b>20</b>
<b><i>Дыхание</i></b>	
Норма	0
Незначительное кратковременное угнетение дыхания	1
Поверхностное дыхание	2
Периодическое дыхание или одышка	3
Патологические звуки при дыхании	3
<b>Максимальная оценка</b>	<b>6</b>
<b><i>Тонус мускулатуры</i></b>	
Норма	0
Тонус мускулатуры пониженный или повышенный	1
Тонус мускулатуры высокий, с судорожными подергиваниями	4
Тонус мускулатуры практически отсутствует	3
Подергивание	1
Тремор	2
Судороги	5
Атаксия	4
<b>Максимальная оценка</b>	<b>9</b>
<b><i>Двигательная активность</i></b>	
Двигательная активность, поза, походка – в норме	0
Двигательная активность повышенная или пониженная	1
Возбуждение	2
Утрата позы	4
Заторможенность	2
Нетипичная осанка	2
Нарушение реакции	3
Нарушения координации	3
Заторможенная или неестественная походка (ходьба на цыпочках)	2
Другое необычное поведение	1
<b>Максимальная оценка</b>	<b>15</b>
<b>Общая максимальная оценка</b>	<b>55</b>

## Шкала оценки тяжести интоксикации

Степень тяжести интоксикации	Баллы (суммарно по критериям)
I (легкая)	0-10
II (умеренная)	11-25
III (высокая)	26-55
IV (критическая)	гибель животных

Для интегральной оценки картины интоксикации животных по тяжести экспертами была предложена шкала, представленная в табл. 3.

Результаты исследования динамики выраженности общетоксического действия отдельных ксенобиотиков на лягушках представлены на рис. 1.

В исследовании использованы следующие группы животных:

- Группа 1. Ксенобиотик – спирт этиловый 50% 1 мл.
- Группа 2. Ксенобиотик – цисплатин 1 мл (0,5 мг).
- Группа 3. Ксенобиотик – цисплатин 2 мл (1 мг).

Анализ рис. 1 показывает, что для этилового спирта характерным является кратковременное (до 1 ч) слабо выраженное интоксикационное действие. Цисплатин в малой дозе проявляет также слабое, но длительное (до 5 суток) интоксикационное действие, определяемое, скорее всего, стойкостью связывания ксенобиотика с субстратом своего действия. И только для более высокой дозы цисплатина отмечается выраженное, с трехфазным нарастанием признаков интоксикации, токсическое действие. Наличие третьей фазы нарастания признаков интоксикации может быть

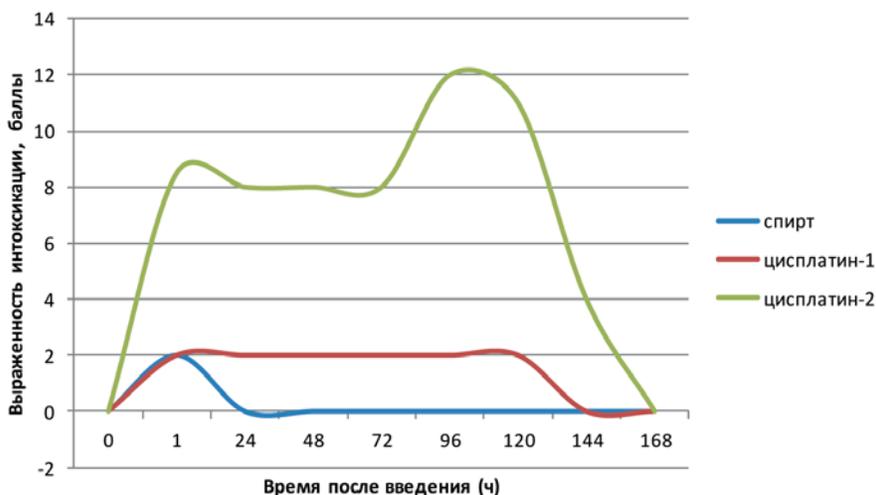


Рис. 1. Динамика выраженности симптомов интоксикации у лягушек при введении ксенобиотиков.

отнесено к накапливающимся, более токсичным метаболитам цисплатина, вносящим вклад в его общетоксическое действие.

Для дальнейшего анализа с представленных хронотоксикологических кривых были сняты следующие первичные показатели:

А<sub>м</sub> – максимальное суммарное значение признаков интоксикации;

Т<sub>м</sub> – время от введения соединения до развития максимальной выраженности интоксикации;

А<sub>г</sub> – суммарное значение признаков интоксикации в заданный момент времени Т;

Т – время от введения соединения до момента наблюдения.

Затем определялись производные показатели:

СИ – скорость развития интоксикации ( $СИ = A_m / T_m$ , балл/ч или балл/сутки);

СД – скорость детоксикации ( $СД = (A_m - A_g) / (T - T_m)$ , балл/сутки);

МСД – мощность системы детоксикации ( $МСД = D * СД$ , мг\*балл/кг\*сутки, где D – доза введенного соединения, мг/кг, СД – скорость детоксикации, балл/сутки).

Расчетные параметры модели динамики симптомов интоксикации исследуемыми ксенобиотиками у лягушек представлены в табл. 4.

Для экспериментальной отработки методики оценки системы детоксикации *на грызунах* были выбраны ранее

Таблица 4

Параметры модели общетоксического действия ксенобиотиков у лягушек

Параметр	Ед. измерения	Ксенобиотики		
		Спирт этиловый	Цисплатин-1	Цисплатин-2
Введенная доза	мг/кг	17,5	18	37,5
Максимальная выраженность симптомов интоксикации	баллы	2	2	12
Кол-во фаз нарастания симптомов	ед.	1	1	3
Скорость развития симптомов фазы 1	балл/ч	2	2	8
Длительность фазы плато	сутки	0	5	5
Длительность фазы интоксикации	ч	1	120	144
Длительность фазы детоксикации	сутки	1	6	7
Скорость детоксикации	балл/сутки	1	0,3	1,7
Мощность системы детоксикации	Мг*балл/кг*сутки	17,5	5,4	63,75

## Динамика картины интоксикации этиловым спиртом в дозе 5 мл/кг

Время после введения, ч	Показатели					
	Реакция на взятие на руки	Осмотр в клетке	Дыхание	Тонус мускулатуры	Двигательная активность	Сумма баллов
0-1	1	3	1	2	9	16
1-2	1	4	1	2	9	17
2-4	1	3	1	2	6	13
4-8	1	2	0	1	3	7
8-24	0	1	0	0	2	3
24-48	0	0	0	0	0	0
48-72	0	0	0	0	0	0
27-96	0	0	0	0	0	0
96-120	0	0	0	0	0	0
120-240	0	0	0	0	0	0

использованные в исследованиях на лягушках этиловый спирт (5 мл/кг) и цисплатин (2 и 8 мг/кг). Полученные результаты представлены в табл. 5-7.

Отмечено быстрое наступление токсического эффекта в течение нескольких минут и относительно непродолжительное действие препарата. В течение первых 4 ч степень токсичности определена как «умеренная», от 4 до 24 ч – легкая, и после 24 ч интоксикация отсутствовала.

Картина развития интоксикации у цисплатина в дозе 2 мг/кг отличается,

прежде всего, тем, что основные побочные действия проявляются спустя 2 ч и длятся 3 суток. В течение первых двух часов происходило постепенное нарастание токсических эффектов, и степень токсичности определена как «легкая», а начиная с 3-го ч происходит усиление интоксикации, и до 72 ч степень токсичности держится на уровне «умеренной». Затем происходит процесс «восстановления», и к 10-м суткам признаков интоксикации не отмечается.

## Динамика картины интоксикации цисплатином в дозе 2 мг/кг

Время после введения, ч	Показатели					
	Реакция на взятие на руки	Осмотр в клетке	Дыхание	Тонус мускулатуры	Двигательная активность	Сумма баллов
0-1	0	1	1	0	1	3
1-2	1	1	1	1	1	5
2-4	1	4	2	2	2	11
4-8	1	4	2	2	3	12
8-24	1	6	2	2	3	14
24-48	1	6	2	1	2	12
48-72	1	6	1	1	1	10
72-96	1	4	1	0	1	7
96-120	1	2	1	0	0	4
120-240	0	0	0	0	0	0

Динамика картины интоксикации цисплатином в дозе 8 мг/кг

Время после введения, ч	Показатели					
	Реакция на взятие на руки	Осмотр в клетке	Дыхание	Тонус мускулатуры	Двигательная активность	Сумма баллов
0-1	1	4	3	4	4	16
1-2	2	5	6	5	7	25
2-4	2	5	6	6	7	26
4-8	3	5	6	5	8	27
8-24	3	8	4	4	7	26
24-48	2	8	3	3	5	21
48-72	2	8	2	3	5	20
72-96	1	6	2	3	2	14
96-120	1	3	2	2	1	9
120-240	1	1	1	1	1	5

Динамика нарастания побочных эффектов после введения цисплатина в дозе 8 мг/кг характеризуется более быстрой и выраженной интоксикацией. Так, в течение 1-го и 2-го ч токсичность имеет уровень «умеренная», а начиная с 3-го и до 24-го ч после введения – третью, «высокую» степень. Третьи и четвертые

сутки степень токсичности вновь опускается до «умеренной» и, начиная с пятых суток, переходит в категорию «легкая». Полностью токсические эффекты не проходят до 10-ти суток.

В графическом виде динамика тяжести интоксикационных проявлений у грызунов представлена на рис. 2.

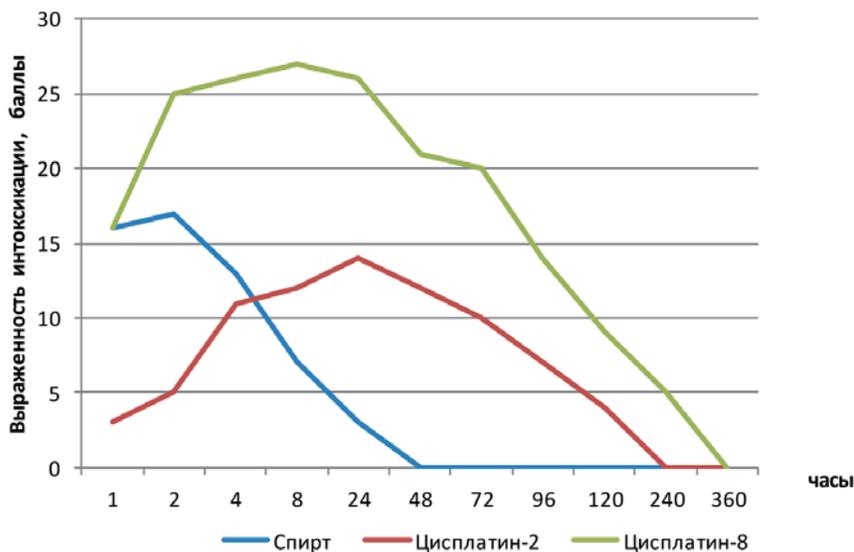


Рис. 2. Динамика картины интоксикации грызунов этиловым спиртом и цисплатином в разных дозах.

Анализ рис. 2 показывает, что для этилового спирта характерным является кратковременное (до 2-х ч) умеренно выраженное интоксикационное действие. Цисплатин в малой дозе проявляет также слабое, но длительное (до 5-ти суток) интоксикационное действие, определяемое, скорее всего, стойкостью связывания ксенобиотика с субстратом своего действия. И только для более высокой дозы цисплатина отмечается выраженное, с двухфазным нарастанием признаков интоксикации, токсическое действие.

Расчетные параметры модели динамики симптомов интоксикации у лабораторных крыс представлены в табл. 8.

Анализ табл. 8 показывает, что грызуны имеют врожденную мощную систему детоксикации, способную быстро метаболизировать этиловый спирт. В то же время, для цисплатина такая врожденная система обладает малой метаболической активностью, но характеризуется способностью к индукции при использовании более высоких доз.

### Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что об эффективности системы детоксикации ксенобиотиков можно судить по данным токсикологических исследований их острой токсичности на основании динамики суммарной бальной оценки выраженности признаков интоксикации.

Для оценки эффективности системы детоксикации могут быть использованы следующие количественные параметры:

СИ – скорость развития интоксикации ( $СИ = A_m / T_m$ , балл/ч или балл/сутки, где  $A_m$  – максимальное суммарное значение признаков интоксикации,  $T_m$  – время от введения соединения до развития максимальной выраженности интоксикации);

СД – скорость детоксикации ( $СД = A_m / T_d$ , балл/сутки, где  $A_m$  – максимальное суммарное значение признаков детоксикации;  $T_d$  – длительность фазы детоксикации);

Таблица 8

**Параметры модели динамики выраженности признаков общетоксического действия ксенобиотиков у лабораторных крыс**

Параметр	Ед. измерения	Ксенобиотики		
		Спирт этиловый	Цисплатин-1	Цисплатин-2
Введенная доза	мг/кг	5	2	8
Максимальная выраженность симптомов интоксикации	баллы	17	14	27
Кол-во фаз нарастания симптомов	ед.	1	1	2
Скорость развития симптомов фазы 1	балл/ч	8,5	0,58	1,12
Длительность фазы плато	сутки	0	0	0
Длительность фазы интоксикации	ч	2	24	24
Длительность фазы детоксикации	сутки	1	8	12
Скорость детоксикации	балл/сутки	17	1,75	2,25
Мощность системы детоксикации	Мг*балл/кг*сутки	85	3,6	18

МСД – мощность системы детоксикации ( $MSD = D * CD$ , мг\*балл/кг\*сутки, где  $D$  – доза введенного соединения, мг/кг,  $CD$  – скорость детоксикации, балл/сутки).

### Список литературы

1. Альберт А. Избирательная токсичность: физико-химические основы терапии. В 2-х томах. - М.: Медицина. 1989. Т. 1. 400 с.; Т. 2. 432 с.
2. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ // Рук-во по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М., 2005. С. 41-54.
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармако-токсикологии. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 448 с.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.

Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К. 2012.

### References

1. Al'bert A. Izbiratel'naya toksichnost': fiziko-himicheskie osnovy terapii. V 2-h tomah. - M.: Medicina. 1989. T. 1. 400 s.; T. 2. 432 s.
2. Arzamascev E.V., Gus'kova T.A., Berezovskaya I.V., Lyubimov B.I., Liberman S.S., Verstakova O.L. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya farmakologicheskikh veshchestv // Ruk-vo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. - M., 2005. S. 41-54.
3. Karkishchenko N.N. Al'ternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i al'ternativy farmakotoksikologii. - M.: Izd-vo VPK. 2007. 448 s.
4. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ch. 1 / Pod red. A.N. Mironova. - M.: Grif i K. 2012.

## Method of evaluating the xenobiotic detoxification system in laboratory animals

G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, E.B. Shustov

In order for more accurately assess the safety of research in pre-clinical studies have proposed the technique of an estimation of system of detoxification of xenobiotics in laboratory animals. The study was performed on two species of laboratory animals – frogs and rats. As toxic xenobiotic we used two medications with fundamentally different mechanisms of action and different ways of detoxification – ethyl alcohol and cisplatin. Scoring of toxic action of xenobiotics was carried out by the method of expert scaling. The study showed that the effectiveness of the detoxification system of xenobiotics can be judged according to their Toxicological studies acute toxicity on the basis of the dynamics of the total point scoring of severity of signs of intoxication.

**Key words:** drug safety, pre-clinical research, the system is the detoxification, laboratory animals.

## Влияние ультрадисперсных систем на основе комплексов сукцинамида хитозана с коллоидными частицами йодида серебра на иммунологическую реактивность

Л.А. Шарафутдинова<sup>1</sup>, М.В. Базунова<sup>1</sup>, Е.И. Кулиш<sup>1</sup>, Н.Н. Курчатова<sup>2</sup>,  
В.Г. Шамратова<sup>1</sup>, З.Р. Хисматуллина<sup>1</sup>, М.Р. Даминов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа

<sup>2</sup> – Всероссийский центр глазной и пластической хирургии МЗ РФ, Уфа

Контактная информация: Шарафутдинова Люция Ахтямовна, [sharafta@yandex.ru](mailto:sharafta@yandex.ru)

---

В статье представлены результаты исследования влияния натриевой соли – сукцинамида хитозана (СХТЗ) (5%) и дисперсий СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра СХТЗ:AgJ (исходная концентрация СХТЗ – 5%, в объёмном соотношении исходных компонентов 1:1) на активационные процессы иммунокомпетентных клеток человека *in vitro*. Показано, что растворы СХТЗ и дисперсии СХТЗ:AgJ повышают фагоцитарно-метаболические характеристики нейтрофилов, вызывают умеренное повышение экспрессии активационных рецепторов CD25+, CD95+ и HLA-DR+ на лимфоцитах, увеличивают пролиферативную активность лимфоцитов наряду с возрастанием количества клеток с внутриклеточными признаками апоптоза.

**Ключевые слова:** хитозан, коллоидные частицы йодида серебра, фагоцитарная активность лейкоцитов, пролиферативная активность лимфоцитов.

---

### Введение

В последние годы активно ведутся исследования по созданию систем направленной доставки лекарственных препаратов пролонгированного действия. В качестве матриц для создания таких систем часто используются наноразмерные системы на основе природных и синтетических биodeградируемых биосовместимых полимеров, в т.ч. хитозана (ХТЗ) и его производных [2, 12, 13, 16].

Одним из подходов к созданию стабильных наноструктурированных дисперсных систем с регулируемыми размерами может быть использование способности макромолекул к самосборке путем межмолекулярной ассоциации через нековалентные связи – на приме-

ре полимер-коллоидных комплексов (ПКК) ХТЗ и его производных (например, натриевой соли сукцинамида хитозана, СХТЗ) с неорганическими коллоидными частицами лиофобных зольей (например, золя йодида серебра) [14]. Результаты многочисленных исследований показывают, что препараты на основе полисахаридов проявляют иммуномодулирующее, антибактериальное, антиоксидантное, гипополипидемическое, ранозаживляющее действие [3, 4, 6, 8, 21].

Коллоидные неорганические частицы лиофобных зольей могут выступать в качестве ядра при капсулировании малорастворимых лекарственных веществ с использованием нано- и микроразмер-

ных контейнеров. Для материалов на основе наноразмерных частиц серебра и его соединений возможен широкий спектр медицинского применения [17, 18]. Так, известно, что в низких дозах наночастицы серебра стимулируют восстановительные процессы в тканях живых организмов, улучшают энергетический обмен, обладают хорошим иммуномодулирующим и антибактериальным действием [29]. Более перспективными для применения являются галогениды серебра – в частности, йодид серебра, частицы которого отличаются отсутствием мутагенного действия и не оказывают дестабилизирующего действия на мембраны клеток [23].

**Целью** данной работы явилось исследование влияния образцов р-ров СХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на активационные процессы иммунокомпетентных клеток человека.

В настоящей работе представлены результаты исследования иммуномодулирующих свойств гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана. В качестве модельных систем для исследования биологических свойств исследуемых соединений использована *культура мононуклеаров периферической крови человека*. Проведены сравнительные исследования фагоцитарно-метаболических характеристик нейтрофильного звена иммунитета как важного показателя неспецифической резистентности организма, количественной оценки пролиферативной активности лимфоцитов и апоптоза. Оценка действия указанных соединений на функцию иммунокомпетентных клеток человека может

быть полезна с точки зрения расширения представлений об иммуотропных свойствах полимер-коллоидных комплексов СХТЗ и СХТЗ с золев AgJ.

### **Материалы и методы**

В качестве объектов исследования использовали СХТЗ с  $M_w = 207$  кДа и характеристической вязкостью  $[\eta] = 3,60$  дл/г (ТУ 9284-027-11734126-08) производства ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково, Россия).

Йодид серебра является чрезвычайно малорастворимым веществом и в водных средах обычно используется в виде коллоидного р-ра (золя). Учитывая тот факт, что с увеличением суммарной межфазной поверхности частиц биологическая активность золя повышается, а агрегативная устойчивость системы снижается (вследствие большой поверхностной энергии и небольшого их заряда) [9], были определены условия, позволяющие получить агрегативно устойчивые золи йодида серебра с малым средним размером частиц и высокой межфазной поверхностью [25]. Для получения р-ра с высоким количеством частиц размером 50-60 нм, входящего в интервал истинно-коллоидных систем и обладающего максимальной межфазной поверхностью, смешивали 0,01 Н р-ра нитрата серебра и 0,01 Н р-ра йодида калия в объемном соотношении 7:10 (AgJ-1) (концентрация частиц дисперсной фазы – 0,004 моль/л).

Для получения дисперсий полимер-коллоидных комплексов СХТЗ с золев AgJ использовали два способа. В первом, к р-ру СХТЗ исходной концентрации 0,1, 0,2 или 1% ма. добавляли золь AgJ в различном объемном соотношении компонентов. При использовании

второго способа навеска СХТЗ растворялась в заранее синтезированном золе. Растворение осуществлялось путём магнитного перемешивания при комнатной температуре в течение 24 ч.

В качестве модельной системы для оценки влияния образцов р-ров СХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на активационные процессы иммунокомпетентных клеток человека использовалась *культура мононуклеаров периферической крови человека*, поскольку эти клетки контактируют с лекарственными препаратами при внутривенном или любом другом способе введения. Для выделения клеток использовали гепаринизированную кровь 10-ти здоровых доноров-волонтеров, не имеющих в анамнезе проявлений инфекционного, аутоиммунного и аллергического симптомов. Все доноры относились к одной возрастной группе – 25-30 лет.

Для подбора оптимальной дозы гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана проводили культивирование клеток крови здоровых доноров в 24-луночных планшетах в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) в течение 24 и 72 ч. По истечении срока культивирования клетки собирали и оценивали стимулирующее действие гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана (1, 2, 5, 5, 10, 15 и 20 мкг/мл) по пролиферации клеток. Полученные показатели сравнивали с контрольными культурами клеток (без добавления исследуемых образцов) и с “положительным контролем”. В качестве контрольных образцов использовались стимулятор митогенеза Т-лимфоцитов КонА, 10мкг/мл, и В-клеточный митоген лаконоса (МЛ), 5 мкг/мл. В

культурах лимфоцитов здоровых доноров было обнаружено, что добавление гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана приводит к усилению пролиферации клеток, начинающемуся с 24-х ч культивирования и достигающему максимума к 72-му ч культивирования. Исследуемые р-ры вызывали повышение митогенеза лимфоцитов в культуре, оцениваемое по индексу стимуляции (ИС), но не превышали показатели. Наиболее выраженное действие в стимуляции клеточного роста показала концентрация 2,5 мкг/мл. Поэтому для проведения дальнейших исследований была выбрана именно эта доза.

**Оценку фагоцитарной активности нейтрофилов** определяли по способности клеток поглощать частицы латекса (диаметр частицы 1,49 мкм). Кровь (40 мкл) инкубировали с равным объемом суспензии латекса с добавлением исследуемых образцов р-ров СХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра (2,5 мкг/мл) при температуре 37°C 30 мин в лунках полистеролового круглодонного планшета, центрифугировали и ресуспендировали в 20 мкл фосфатно-солевого буферного р-ра (ФСБР). Переносили суспензию клеток на предметные стекла, фиксировали 96% этиловым спиртом и окрашивали 0,5% р-ром нейтрального красного. Учет результата проводили в световом микроскопе под иммерсией (10x100) путем просматривания 200 клеток. Определяли фагоцитарный индекс (ФИ – процент поглотивших объекты лейкоцитов из числа потенциальных фагоцитов клеток) и фагоцитарное число (ФЧ – среднее количество поглощенных частиц в пересчёте на один фагоцит).

**Определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия** проводили традиционным способом [11]. Для постановки реакции в лунки полистеролового круглодонного планшета к 40 мкл крови добавляли 40 мкл 0,1% р-ра нитросинего тетразолия фирмы «Sigma» (спонтанный НСТ-тест). Для постановки стимулированного НСТ-теста к такому же объему крови добавляли р-р НСТ и индуктор кислородного взрыва (зимозан). Суспензии клеток инкубировали при 37°C 30 мин с добавлением исследуемых образцов (р-ров СХТЗ и дисперсий на основе ПКК СХТЗ с AgJ), центрифугировали и ресуспендировали в 20 мкл ФСБР, переносили суспензию клеток на предметные стекла, фиксировали 96% этиловым спиртом и окрашивали 0,5% р-ром нейтрального красного. Учет результата проводили в световом микроскопе под иммерсией (10x100) путем просматривания 200 клеток и определяя процент положительно прореагировавших клеток на 100 фагоцитов как в спонтанном, так и в стимулированном тесте. В каждом мазке подсчитывали количество нейтрофилов, среди которых определяли процент клеток, содержащих включения диформаза. Индекс активации нейтрофилов (ИАН) рассчитывали по формуле [10]:  $ИАН = (Ax0 + Bx1 + Cx2 + Dx3) / 100$ , где А – количество клеток, не содержащих диформаза, В, С и D – количество клеток, содержащих гранулы диформаза в тех или иных количествах.

**Для определения активационных рецепторов CD25+, CD95+ и HLA-DR+** использовались моноклональные

антитела CD25+, CD95+ и HLA-DR+ (Caltag). Лимфоциты выделялись и культивировались с добавлением образцов р-ров СХТЗ и дисперсий СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра, а затем окрашивались моноклональными антителами в соответствии с требованиями фирмы-производителя. Результаты учитывались на однолазерном проточном цитофлюориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США).

**Оценку пролиферативной активности лимфоцитов** проводили с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) *in vitro*. В данной работе применялся вариант постановки РБТЛ с использованием проточного цитофлюориметра по методу, описанному в работе [27]. В качестве исследуемого материала использовались выделенные на градиенте плотности мононуклеары периферической крови человека, культивируемые в питательной среде с добавлением соответствующих митогенов. Для оценки состояния функциональной активности лимфоцитов учитывали процент выявленных бластов.

**Оценка апоптоза лимфоцитов** проводилась с использованием метода окрашивания ДНК йодистым пропидием [19] при помощи проточного цитофлюориметра. Процедура окрашивания проводилась в стандартных пробирках для цитометрии. Клетки отмывали после этанола ФСБР и ресуспендировали в красящем р-ре, содержащем 0,005% йодистого пропидия, 0,1% цитрата натрия, 0,1% тритона X100. Непосредственно перед проведением процедуры к красящему р-ру добавляли РНК-азу (Sigma) в концентрации 50 мкг/мл для удаления примесей двуспиральной РНК в образцах. Анализ полученных образцов про-

водили в проточном цитофлюориметре (FL3, >600 нм), с использованием логарифмического канала флюоресценции.

Математико-статистическую обработку данных производили с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica 7.0 («Stat Soft Inc.», США). В модуле «Основные статистики» («Basic Statistics») по всем изученным количественным показателям были подсчитаны следующие основные характеристики: выборочное среднее (среднее арифметическое, Mean), стандартная ошибка среднего (standard error of mean) и стандартное отклонение (standard deviation).

Для всех выборок проводили анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения с помощью кри-

терия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Поскольку распределение признаков в группах являлось нормальным, сравнительный анализ групп проводился с помощью параметрических методов (t-критерий Стьюдента). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Количественные данные в таблице представлены в виде  $M \pm Sd$ , где  $M$  – выборочное среднее,  $Sd$  – стандартное отклонение.

### Результаты и их обсуждение

Важным показателем состояния неспецифической резистентности организма являются характеристики фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов.

Результаты проведенного исследования показали (табл. 1), что р-ры СХТЗ

Таблица 1  
Показатели фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов при действии р-ра СХТЗ концентрацией 5% мас. и дисперсий СХТЗ:AgJ (исходная концентрация СХТЗ 5%) в объёмном соотношении исходных компонентов 1:1

Группа	Фагоцитарная активность нейтрофилов $Mx \pm Sd$ (n=10)		Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов $Mx \pm Sd$ (n=10)			
	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число	Спонтанная активность		Зимозан-активированная активность	
			НСТ-спонтанные нейтрофилы, %	ИАН спонтанный	НСТ-индуцированные нейтрофилы, %	ИАН индуцированный
Контроль	56,10±2,10	6,74±0,41	8,60±0,42	0,15±0,01	47,80±2,62	0,69±0,04
СХТЗ 5%	59,60±2,34	7,54±0,42	14,50±1,3*	0,28±0,03*	55,20±1,30*	1,17±0,03*
СХТЗ:AgJ 5% 1:1	65,10±2,53*#	8,62±0,46*#	21,40±2,25*#	0,51±0,05*#	68,3±2,04*#	1,44±0,03*#

Примечание: \* – статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой, # – статистически значимое отличие по сравнению с группой СХТЗ 5%.

и дисперсии СХТЗ:AgJ увеличивают количество активных фагоцитов, о чем свидетельствует повышение фагоцитарного индекса и показателя интенсивности фагоцитоза – фагоцитарного числа. Причем более выраженное повышение указанных показателей по сравнению с контролем (ФИ –  $56,10 \pm 2,10$ ; ФЧ –  $6,74 \pm 0,41$ ) выявлено в ответ на инкубацию клеток с СХТЗ:AgJ: ФИ составил  $65,10 \pm 2,53\%$ ; ФЧ –  $8,62 \pm 0,46$  ( $p < 0,05$ ).

При анализе результатов спонтанного НСТ-теста установлено, что исследуемые образцы усиливают метаболическую активность нейтрофилов, причем обнаружено статистически значимое повышение числа активных фагоцитов в ответ на инкубацию с СХТЗ:AgJ ( $p < 0,05$ ). Так, если в контроле описываемый показатель составил  $8,60 \pm 0,42\%$ , то в группе СХТЗ:AgJ –  $21,40 \pm 2,25\%$ .

Добавление индуктора респираторного взрыва (зимозана) вызывает увеличение количества диформазан-позитивных клеток и уровня активности оксидативных процессов в этих клетках по сравнению с контролем, где процент индуцированных фагоцитов составил  $47,80 \pm 2,62$ , тогда как в группе СХТЗ –  $55,20 \pm 1,30\%$ , а в группе СХТЗ:AgJ –  $68,3 \pm 2,04$ ; индекс активности нейтрофилов в контрольной группе –  $0,69 \pm 0,04$ , и в группах СХТЗ и СХТЗ:AgJ –  $1,17 \pm 0,03$  и  $1,44 \pm 0,03$  соответственно.

Следовательно, можно сделать вывод о том, что проведенный индуцированный тест с НСТ, позволяющий оценить функциональный резерв кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов, свидетельствует о сохранении внутриклеточной антибактериальной активности в фагоцитах при добавлении исследованных образцов.

Интересным моментом является тот факт, что испытанные образцы, усиливая оксидативность нейтрофилов, действуют очень мягко, поскольку количество диформазан-позитивных нейтрофилов не выходит за пределы нормальных значений, оцениваемых у здоровых людей (1-9%). Это очень важно, поскольку известно, что избыточная активация метаболитов кислорода, генерируемых гранулоцитами и моноцитами, может привести к повреждению мембран клеток в организме, репарации ДНК клеток, что ведёт к деструктуризации тканей и конечном итоге повышает риск развития аутоиммунных процессов [7].

Таким образом, влияние р-ров СХТЗ и дисперсий на основе ПКК СХТЗ с AgJ на фагоцитарно-метаболические характеристики нейтрофильного звена иммунитета можно оценить как стимулирующее.

**Лимфоциты** – единственный тип клеток крови, для которых пролиферация в периферических тканях является физиологической нормой и *обязательным этапом* в развитии иммунного ответа. Поэтому количественная оценка пролиферативной активности лимфоцитов в спланированных экспериментальных условиях может служить мерой реактивности лимфоцитов на тот или иной внешний стимул. Процесс активации лимфоцита, исходом которого является клональная экспансия, или пролиферация, начинается с экспрессии активационных рецепторов на мембране клетки.

Одним из важнейших маркёров, выявляющихся на клетках и служащих признаком активации лимфоцитов, является рецептор к ИЛ-2 – CD25+. Этот рецептор экспрессирует на себе акти-

вированные Т-лимфоциты, стимулирующие антителообразование и цитотоксичность. В нашем исследовании мы провели оценку уровня экспрессии рецептора CD25+, результаты которой представлены в табл. 2. В работе мы использовали часовую инкубацию выделенных мононуклеаров с исследуемыми образцами СХТЗ.

Анализ уровня экспрессии рецептора CD25+ показал увеличение этого показателя при добавлении СХТЗ и СХТЗ:AgJ, причем более существенное – при инкубации с СХТЗ:AgJ ( $19,9 \pm 0,5\%$  против  $15,7 \pm 1,3\%$  в контроле,  $p < 0,05$ ).

Одновременно определялась экспрессия иммунокомпетентными клетками антигена CD95+, указывающего на готовность к программируемой клеточной гибели в случае необходимости устранения избытка активированных клеток, а также клеток с нарушенной генетической программой. Результаты исследования показали повышение экспрессии активационных рецепторов CD95+, при этом более существенное – при культивировании в среде с СХТЗ:AgJ 5% 1:1 ( $21,01 \pm 0,95\%$  против  $18,2 \pm 1,25\%$  в контроле,  $p < 0,05$ ).

Определение экспрессии маркеров поздней и длительной активации лейкоцитов – HLA-DR+ продемонстрировало

повышение указанного показателя как в случае культивирования с СХТЗ, так и СХТЗ:AgJ.

Для правильного понимания формирования полного иммунного ответа на попавший в организм антиген необходимо хорошо представлять, какие процессы развиваются в клетке после этого события и какую роль играют кооперативные взаимодействия различных популяций клеток (лимфоциты, макрофаги).

При попадании в организм антигена происходит активация лимфоцитов, под которой понимают серию событий, происходящих в покоящихся клетках, в результате которых лимфоциты стимулируются. Это процесс, на котором базируются практически все иммунологические реакции. Пролиферация служит главной предпосылкой иммунного ответа, т.к. на стимулятор реагирует небольшое число клеток, и для развития достаточно интенсивной реакции необходимо их дополнительное размножение.

В данной работе в качестве активатора иммунокомпетентных клеток использовали образцы СХТЗ и СХТЗ:AgJ. Анализ пролиферативной активности лимфоцитов проводился в реакции бласттрансформации лимфоцитов (БТ)

Таблица 2  
Экспрессия CD25+, CD95+ и HLA-DR+ при инкубации р-ра СХТЗ концентрацией 5% мас. и дисперсий СХТЗ:AgJ (исходная концентрация СХТЗ 5%) в объёмном соотношении исходных компонентов 1:1

Показатель	Контроль	СХТЗ 5%	СХТЗ:AgJ 5% 1:1
Экспрессия CD25+, %	$15,7 \pm 1,3$	$16,1 \pm 0,9$	$19,9 \pm 0,5^*$
Экспрессия CD95+, %	$18,2 \pm 1,25$	$19,04 \pm 0,68$	$21,01 \pm 0,95^*$
Экспрессия HLA-DR+, %	$3,9 \pm 0,35$	$4,6 \pm 0,2$	$4,21 \pm 0,33$

Примечание: \* – статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой.

с использованием проточного цитофлюориметра БТ – это способность лимфоцитов пролиферировать и делиться в ответ на воздействие митогенов. При этом происходит превращение лимфоцитов в бласты – большие пиронинофильные клетки, способные к пролиферации и дифференцировке, что приводит к увеличению в лимфоидной ткани количества реагирующих клеток.

Поскольку результаты исследования показали, что СХТЗ и его соединение с йодидом серебра вызывают умеренное повышение экспрессии активационных рецепторов CD25+, CD95+ и HLA-DR+ на лимфоцитах уже через 1 ч после их добавления в культуру, большой интерес для исследования представляло определение судьбы активационных сигналов через 24 ч воздействия (начало изменений внутри клетки) и через 72 ч после воздействия, когда ответ клетки на стимулятор достигает своего максимального значения.

Результаты суточного культивирования мононуклеаров с р-рами СХТЗ и СХТЗ:AgJ (табл. 3) убедительно демонстрируют их действие на иммунные

клетки как стимулирующее (пролиферация), о чем свидетельствует повышение количества бластных клеток в культуре. При этом возрастает количество клеток с признаками деструкции ядра, выявляемое флюорохромами, что может свидетельствовать о процессе позитивной активации клеток, вызванной митоген-индуцирующими свойствами исследуемых образцов. Так, через сутки инкубирования количество клеток увеличивается ( $p < 0,05$ ) как при добавлении СХТЗ 5% ( $16,29 \pm 1,60\%$ ), так и СХТЗ:AgJ 5% ( $16,22 \pm 1,65\%$ ), тогда как в контроле этот показатель составил  $11,14 \pm 1,10\%$ . Аналогичная картина наблюдается и через 72 ч культивирования: количество клеток статистически значимо выше при добавлении в среду испытываемых образцов ( $p < 0,05$ ).

В последние годы стало очевидным, что развитие многих иммунопатологических состояний обусловлено нарушением функционирования клеток иммунной системы, процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Доказано, что при врожденных и приобретенных иммунодефицитных

Таблица 3

**Пролиферативная активность и апоптоз лимфоцитов при добавлении р-ра СХТЗ концентрацией 5% мас. и дисперсий СХТЗ:AgJ (исходная концентрация СХТЗ 5%) в объёмном соотношении исходных компонентов 1:1 через 24 и 78 ч культивирования, %**

Группа	Пролиферация, 24 ч, % Mx±Sd (n=10)	Апоптоз, 24 ч, % Mx±Sd (n=10)	Пролиферация, 72 ч, % Mx±Sd (n=10)	Апоптоз, 72 ч, % Mx±Sd (n=10)
Контроль	11,14±1,10	2,93±0,23	13,83±1,26	3,35±0,19
СХТЗ 5%	16,29±1,60*	3,63±0,27	17,94±1,21*	3,91±0,31
СХТЗ:AgJ 5%	16,22±1,65*	4,29±0,32*#	15,19±1,09*#	5,36±0,24*#

*Примечание:* \* – статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой; # – статистически значимое отличие по сравнению с группой СХТЗ 5%.

состояниях, аутоиммунных заболеваниях, аллергиях нарушены функции Т-лимфоцитов, осуществляющих регуляцию эффекторных иммунных реакций в организме. Результаты проведенного нами исследования убедительно демонстрируют, что введение образцов СХТЗ 5% и СХТЗ:AgJ в культуру клеток оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность Т-лимфоцитов в реакции бластной трансформации.

Активационные процессы, происходящие в организме, результатом которых является достижение конкретной цели – пролиферация и накопление определённого клона клеток – неразрывно связаны с альтернативными механизмами, которые приводят к клеточной гибели. Отдельная клетка может погибнуть как в результате некроза, вызванного прямым повреждающим действием окружающей среды, так и в результате программируемой клеточной смерти или апоптоза.

В связи с этим представляла интерес оценка программированной клеточной гибели лимфоцитов – апоптоза. В данной работе использовался метод оценки апоптоза по структурным изменениям ядерной ДНК путем окрашивания клеток йодистым пропидием.

При суточном культивировании монулеаров с исследуемыми образцами было показано, что количество клеток с внутриклеточными признаками апоптоза увеличивается к третьим суткам и достигает значений  $3,91 \pm 0,31\%$  и  $5,36 \pm 0,24$  в группах СХТЗ 5% и СХТЗ:AgJ против  $3,35 \pm 0,19$  в контроле. Причем более выраженная реакция наблюдалась в случае культивирования с СХТЗ:AgJ ( $p < 0,05$ ).

Сопоставляя полученные данные с результатами оценки пролиферативной активности, следует отметить, что к третьим суткам культивирования сохраняется высокое количество пролиферирующих клеток в культурах культивирования, и к этому же сроку начинают работать механизмы запрограммированной гибели клеток, что выражается в увеличении количества лимфоцитов с внутриклеточными признаками апоптоза. Этот факт является отражением физиологических процессов обеспечения нормального баланса клеток иммунной системы и их взаимодействия между собой и факторами окружающей среды.

Программированная клеточная смерть путем апоптоза рассматривается в настоящее время как основной механизм поддержания иммунного гомеостаза, играющего ключевую роль в регуляции численности иммуокомпетентных клеток, их созревания и дифференцировки Т- и В-клеток, обеспечения адекватной силы и продолжительности иммунного ответа, сохранения ауто-толерантности [22, 24, 28]. Благодаря апоптозу в организме обеспечивается баланс между пролиферацией клеток, их дифференцировкой и элиминацией. В ходе иммунного ответа путём апоптоза удаляются лимфоциты, не получившие адекватного стимула и не способные выполнить свою функцию, а по завершении иммунного ответа необходимо избавиться от большого числа активированных клеток, которые опасны в плане развития аутоагрессии и повреждения собственных тканей. «Дефицит» апоптоза является важным звеном патогенеза многих аутоиммунных реакций и причиной лимфопролиферативной патологии, а преобладание

апоптоза иммунокомпетентных клеток приводит к нарушениям иммунологической защиты [20]. Нарушения механизмов программированной клеточной смерти иммунокомпетентных клеток нередко лежат в основе иммуноксичности ксенобиотиков [10, 15]. Выяснение характера влияния изучаемых соединений на пролиферативную активность и апоптоз лимфоцитов представляется весьма важным для понимания механизмов иммуномодулирующего действия полисахаридов.

В результате проведенного нами исследования показана сбалансированная реакция между пролиферацией и программированной клеточной гибелью, она может рассматриваться как находящаяся под контролем иммунной системы для обеспечения необходимых регуляторных процессов.

Полученные в ходе работы данные позволяют заключить, что полимер-коллоидные комплексы натриевой соли – сукцинамида хитозана с неорганическими коллоидными частицами золя йодида серебра оказывают иммуномодулирующий эффект. Хорошо известно, что в низких дозах наночастицы серебра стимулируют восстановительные процессы в тканях живых организмов, улучшают энергетический обмен, обладают хорошим иммуностропным и антибактериальным действием. Частицы йодида серебра отличаются отсутствием мутагенного действия и не оказывают дестабилизирующего действия на мембраны клеток [23, 30]. Однако  $Ag^0$  начинает проявлять антимикробные свойства только после поверхностного окисления, т.е. при образовании ионов  $Ag^+$  [30]. К тому же, водорастворимые соли серебра в некоторой степени ток-

сичны и могут вызывать аргирию. В связи с этим в нашей работе использованы более перспективные для применения в медицине соединения – галогениды серебра. Возможно, обнаруженный нами иммуномодулирующий эффект комплекса СХТЗ:AgJ достигается присутствием сукцинамида хитозана, выбранного в качестве наностабилизирующего компонента, предотвращающего агрегацию наночастиц и обладающего комплексом уникальных свойств, среди которых – биосовместимость, биodeградируемость, антибактериальное и антиоксидантное действия.

Все вышесказанное аргументирует целесообразность применения гибридных полимерных комплексов натриевой соли – сукцинамида хитозана с неорганическими частицами золя йодида серебра в составе средств направленной доставки лекарственных препаратов или исходных систем для получения полимерных композиционных материалов биомедицинского назначения (ранозаживляющих покрытий в виде гелей и плёнок, матриц для тканевой инженерии и др.).

### **Список литературы**

1. *Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.* Иммунологические проблемы апоптоза. - М.: Эдиториал УРСС. 2002. 320 с.
2. *Болотова Г.В.* Полимерные носители для противотуберкулёзных лекарственных средств на основе хитозана // Молодой учёный. 2010. № 5 (16). Т. 2.
3. *Быков В.П.* Состояние и перспективы развития производства хитина, хитозана и продуктов на их основе из панциря ракообразных // Материалы 5-й конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана». - М.: ВНИРО. 1999. С. 12-15.
4. *Бычков А.В., Быкова В.М., Кривошеина Л.И.* Применение «Хитана» в клинической практике // Современные перспективы в ис-

- следовании хитина и хитозана / Мат-лы 7-й Междунар. конф. / Под ред. В.П. Варламова и др. - М.: ВНИРО. - 2003. - С. 156-157.
5. *Гамзаде А.И.* Производные хитина/хитозана контролируемой структуры в качестве потенциально новых биоматериалов: Автореф. дисс. ... д.х.н. - М. 2005. 48 с.
  6. *Гамзаде А.И., Насибов С.М., Лукин О.В.* Антибактериальная активность хитозанов / Мат-лы 8-й Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». - Казань. 2006. С. 183-186.
  7. *Долгушин И.И., Бухарин О.В.* Нейтрофилы и гомеостаз. - Екб.: УрО РАН. 2001.
  8. *Жоголев К.Д., Щедрина В.Ю., Никитин В.Ю., Ващенко В.И.* Иммунокорректирующее действие препарата хитозан при бактериально и гриппозной инфекции // Иммунокоррекция при инфекционной патологии. - Л. 1998. С. 32.
  9. *Иванова О.С., Шекунова Т.О., Иванов В.К. и др.* Доклады Академии наук. 2011. 437. № 5. С. 638.
  10. *Имельбаева Э.А., Теплова С.Н., Камиллов Ф.Х., Ахметова Б.Х.* Иммунотропные эффекты феноксигербицидов. - Уфа: Из-во Башкирского ун-та. 2000. 116 с.
  11. *Имельбаева Э.А., Хайруллина Р.М., Медведев Ю.А.* Методические указания к занятиям по иммунологии и серологии: Уч.-мет. пособ. для спец. по клин. и лаб. диагностике. - Уфа. 2006. 87 с.
  12. *Иноземцева О.А.* Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 9. С. 68-80.
  13. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии. - СПб.: Интермедика. - 2002. - 600 с.
  14. *Корчагина Е.В.* Агрегация хитозана и его производных в разбавленных водных растворах: автореф. дисс. ... к. ф.-м.н. - М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. - 2012. - 232 с.
  15. *Кулиш Е.И., Базунова М.В., Валиев Д.Р.* Перспективы использования полимер-коллоидных дисперсий на основе сукцината хитозана и зольей йодида серебра в биомедицинских целях // В кн.: Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой. 2015. С. 104-105.
  16. *Мочалова А.Е., Никищенкова Л.В., Смирнова Н.Н., Смирнова Л.А.* Термодинамические свойства гидрогелей на основе хитозана в области от T→0 до 350 K // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. 2007. Т. 49. № 2. С. 371-376.
  17. *Нежинская Г.И., Копейкин В.В., Гмиро В.Е.* Препринт № 4. - Новосибирск: СО РАМН. 1995. С. 151.
  18. *Савадян Э.Ш., Мельников В.М., Беликов Г.П.* Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34. № 11. 874 с.
  19. *Сибиряк С.В., Вахитов В.А., Курчатова Н.Н.* Цитохром P450 и иммунная система: факты, гипотезы, перспективы. - Уфа: ГИЛЕМ. 2003. 211 с.
  20. *Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А.* Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. - Екб. 2008. 59 с.
  21. *Сливкин А.И., Лапенко В.Л., Арзамасцев А.П. и др.* Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2005. № 2. С. 73.
  22. *Чередеев А.Н., Ковальчук Л.В.* Апоптоз, как важный этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу // Клин. лаб. диагностика. 1997. № 7. С. 31-34.
  23. *Шамратова В.Г., Шарафутдинова Л.А., Хисматуллина З.Р., Базунова М.В. и др.* Биомедицина. 2015. № 3. С. 69.
  24. *Ярилин А.А.* Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. 1996. № 6. С. 10-23.
  25. *Vazunova M.V., Valiev D.R., Zamula Yu.S., Chernova V.V., Kolesov S.V., Kulish E.I.* Russian J. of Physical Chemistry. 2017. V. 11. P. 513-520.
  26. *Eliopoulos P., Mourelatos D.* Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. 1998. V. 18. Issue 6. P. 303.
  27. *Gaines H., Andersson L., Biberfeld G.* A new method measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry // J. Immun. Methods. 1996. Vol. 195. P. 63-72.
  28. *Krammer P.* CD95's deadly mission in the immune system // Nature. 2000. Vol. 407. P. 789-800.
  29. *Pandey D., Ortiz C., Torres R.* Int. J. Nanomedicine. 2013. V. 3. No. 9. P. 1361.
  30. *Wright J.B., Lam K., Burrell R.E.* Am. J. of Infection Control. 1998. V. 26. No. 6. P. 572.

## References

1. *Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V.* Immunologicheskie problemy apoptoza. - М.: Ehditorial URSS. 2002. 320 s.
2. *Bolotova G.V.* Polimernye nositeli dlya protivotuberkulyoznyh lekartsvennyh sredstv na osnove hitozana // Molodoj uchyonyj. 2010. № 5 (16). Т. 2.
3. *Вуков В.Р.* Sostoyanie i perspektivy razvitiya proizvodstva hitina, hitozana i produktov na

- ih osnove iz pancirya rakoobraznyh // Mat-ly 5-j konf. «Novye perspektivy v issledovanii hitina i hitozana». - M.: VNIRO. 1999. S. 12-15.
4. **Bychkov A.B., Bykova V.M., Krivosheina L.I.** Primenenie «Hitana» v klinicheskoy praktike // Sovremennye perspektivy v issledovanii hitina i hitozana / Mat-ly 7-j Mezhdunar. konf. / Pod red. V.P. Varlamova i dr. - M.: VNIRO. - 2003. - S. 156-157.
  5. **Gamzazade A.I.** Proizvodnye hitina/hitozana kontroliruemoy struktury v kachestve potencial'no novyh biomaterialov.: Avtoref. diss. ...d.h.n. - M. 2005. 48 s.
  6. **Gamzazade A.I., Nasibov S.M., Lukin O.V.** Antibakterial'naya aktivnost' hitozanov / Mat-ly 8-j Mezhdunar. konf. «Sovremennye perspektivy v issledovanii hitina i hitozana». - Kazan'. 2006. S. 183-186.
  7. **Dolgushin I.I., Buharin O.V.** Nejtrofily i gomeostaz. – Ekb.: UrO RAN. 2001.
  8. **Zhogolev K.D., Shchedrina V.Yu., Nikitin V.Yu., Vashchenko V.I.** Immunokorrigiruyushchee dejstvie preparata hitozan pri bakterial'no i grippoznoj infekcii // Immunokorrekcija pri infekcionnoj patologii. - L. 1998. S. 32.
  9. **Ivanova O.S., Shekunova T.O., Ivanov V.K. i dr.** Doklady Akademii nauk. 2011. 437. № 5. S. 638.
  10. **Imel'baeva Eh.A., Teplova S.N., Kamilov F.H., Ahmetova B.H.** Immunotropnye ehffekty fenoksigerbicidov. – Ufa: Iz-vo Bashkirskogo un-ta. 2000. 116 s.
  11. **Imel'baeva Eh.A., Hajrullina R.M., Medvedev Yu.A.** Metodicheskie ukazaniya k zanyatiyam po immunologii i serologii: Uch.-met. posob. dlya spec. po klin. i lab. diagnostike. - Ufa. 2006. 87 s.
  12. **Inozemceva O.A.** Rossijskie nanotekhnologii. 2007. T. 2. № 9. S. 68-80.
  13. **Karpishchenko A.I.** Medicinskie laboratornye tekhnologii. - SPb.: Intermedika. - 2002. 600 s.
  14. **Korchagina E.V.** Agregaciya hitozana i ego proizvodnyh v razbavlenykh vodnykh rastvorah: avtoref. diss. ... k.f.-m.n. - M.: MGU im. M.V. Lomonosova. - 2012. - 232 s.
  15. **Kulish E.I., Bazunova M.V., Valiev D.R.** Perspektivy ispol'zovaniya polimer-kolloidnyh dispersij na osnove sukcinatahitozana i zolej jodida srebra v biomedicinskih celyah // V kn.: Tezisy dokladov X Vserossijskoj konferencii «Himiya i medicina» s Molodezhnoj nauchnoj shkoloj. 2015. S. 104-105.
  16. **Mochalova A.E., Nikishchenkova L.V., Smirnova N.N., Smirnova L.A.** Termodinamicheskie svojstva gidrogelej na osnove hitozana v oblasti ot  $T \rightarrow 0$  do 350 K // Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya B. 2007. T. 49. № 2. S. 371-376.
  17. **Nezhinskaya G.I., Kopejkin V.V., Gmiro V.E.** Preprint № 4. - Novosibirsk: SO RAMN. 1995. S. 151.
  18. **Savadyan Eh.Sh., Mel'nikov V.M., Belikov G.P.** Antibiotiki i himioterapiya. 1989. T. 34. № 11. 874 s.
  19. **Sibiryak S.V., Vahitov V.A., Kurchatova N.N.** Citohrom R450 i immunnaya sistema: fakty, gipotezy, perspektivy. - Ufa: GILEM. 2003. 211 s.
  20. **Sibiryak S.V., Hajdukov S.V., Zurochka A.V., Chereshev V.A.** Ocenka apoptoza v immunologicheskikh issledovaniyah. - Ekb. 2008. 59 s.
  21. **Slivkin A.I., Lapenko V.L., Arzamashev A.P. i dr.** Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2005. № 2. S. 73.
  22. **Cheredeev A.N., Koval'chuk L.V.** Apoptoz, kak vazhnyj ehtap ocenki immunnnoj sistemy po patogeneticheskomu principu // Klin. lab. diagnostika. 1997. №7. S. 31-34.
  23. **Shamratova V.G., Sharafutdinova L.A., Hismatullina Z.R., Bazunova M.V. i dr.** Biomedicina. 2015. № 3. S. 69.
  24. **Yarilin A.A.** Apoptoz i ego mesto v immunnnyh processah // Immunologiya. 1996. № 6. S. 10-23.
  25. **Bazunova M.V., Valiev D.R., Zamula Yu.S., Chernova V.V., Kolesov S.V., Kulish E.I.** Russian J. of Physical Chemistry. 2017. V. 11. P. 513-520.
  26. **Eliopoulos P., Mourelatos D.** Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. 1998. V. 18. Issue 6. P. 303.
  27. **Gaines H., Andersson L., Biberfeld G.** A new method measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry // J. Immun. Methods. 1996. Vol. 195. P. 63-72.
  28. **Krammer P.** CD95's deadly mission in the immune system // Nature. 2000. Vol. 407. P. 789-800.
  29. **Pandey D., Ortiz C., Torres R.** Int. J. Nanomedicine. 2013. V. 3. No. 9. P. 1361.
  30. **Wright J.B., Lam K., Burrell R.E.** Am. J. of Infection Control. 1998. V. 26. No. 6. P. 572.

## **Influence of ultradisperse systems on the basis of complexes of a chitosan and its derivatives with colloidal particles of silver iodide on the immune status**

**L.A. Sharafutdinova, M.V. Bazunova, E.I., Kulish, N.N. Kurchatova,  
Z.R. Hismatullina, M.R. Daminov**

The article presents the results of a study of the solution of the sodium salt of chitosan succinamides (5%) effect and dispersions of the sodium salt of chitosan succinamide with AgI (1:1) on the activation processes of immunocompetent cells *in vitro*. It is shown that the solutions of the sodium salt of chitosan succinamide and dispersion of colloidal particles of silver iodide increase the phagocytic and metabolic characteristics of neutrophils, cause a moderate increase in expression of activation receptors CD25+, CD95+ and HLA-DR+ lymphocytes, and increase the proliferative activity of lymphocytes along with an increase in the number of cells with intracellular apoptosis signs.

**Key words:** chitosan, colloidal particles of silver iodide, phagocytic activity of leukocytes, proliferative activity of lymphocytes.



## Формирование новых линий светлогорских мини-свиней

Н.В. Станкова, М.А. Савина, Г.Д. Капанадзе

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

Контактная информация: к.б.н. Станкова Наталья Владимировна, [sinayva@yandex.ru](mailto:sinayva@yandex.ru)

Проведена зоотехническая оценка пятилетней селекционной работы с линиями светлогорских мини-свиней. Выявлены особенности животных по каждой линии и намечена дальнейшая работа с поголовьем. Получены животные со сниженной живой массой, желательного типа в каждой линии, которые отвечают необходимым требованиям для лабораторных животных. Выбракованы животные линии Вс, что повлекло необходимость создания новых линий, а также повышения многоплодия имеющихся линий. Планируется изучение других показателей по каждой линии (работоспособность, поведение и т.д.).

**Ключевые слова:** светлогорские мини-свиньи, лабораторные животные, биомодели.

### Введение

В лаборатории спортивной биомедицины и экстремальных состояний ФГБУН НЦБМТ ФМБА России ведется чистопородное разведение по линиям светлогорских мини-свиней. В 2012 г. внутри популяции были заложены 4 линии и 2 семейства. Это позволило нам разделить популяцию на отдельные неродственные между собой группы животных и спланировать подбор так, чтобы исключить случайное родственное спаривание. В результате были получены 6 неродственных между собой групп мини-свиней, которые успешно используются в разнообразных исследованиях (по стоматологии, фармакологии, спортивной медицине, хирургии, токсикологии и др.).

**Целью** работы является зоотехнический анализ пятилетней селекционной работы с линиями и семействами светлогорских мини-свиней.

### Материалы и методы

Объектом исследования были 4 линии и 2 семейства светлогорских мини-свиней. Животные содержались в обособованном виварии с оптимальными условиями кормления, позволяющем содержать лишь определенное количество животных [3]. В прошлых номерах журнала «Биомедицина» мы подробно описывали историю создания, становления и усовершенствования светлогорской популяции мини-свиней [1, 4, 5], приводили основные показатели роста и развития, продуктивности, иммуно-

логических характеристик [2, 6, 7]. В настоящей статье мы анализируем селекционную работу последних пяти лет и определим дальнейшее ее направление.

### Результаты и их обсуждение

Возможности селекционной работы с лабораторными мини-свиньями существенно ограничены количеством животных и местом для их содержания. С другой стороны, работа упрощена в связи с меньшим количеством селекционируемых признаков в сравнении с промышленным свиноводством. Предпочтение отдается животным с наименьшей живой массой и белой мастью, а также крепкой конституцией. Конституция животных в значительной степени связана с типом нервной деятельности, которая определяет реакцию животного на условия внешней среды. Это особенно важно при работе с мини-свиньями в лабораторных условиях. В дальнейшем мы планируем детально изучить это направление.

По данным 2010-2012 гг. животные имели следующие показатели живой массы (табл. 1), при этом все животные имели крепкую конституцию, развитые прямые конечности, добрый нрав.

В каждой линии селекция отцовских форм ведется по экстерьеру, стресс-устойчивости, качеству приплода и воспроизводительной способности; материнских форм – по многоплодию, молочности, крупноплодности и выравниваемости поросят в гнезде. Инбридинг допускается для закрепления желательных генотипов в степени V-IV и меньше. Все животные проходят регулярную бонитировку, зоотехническую оценку, в разведение допускаются животные только желательного типа. Животные имеют разнообразные масти, которые были унаследованы от предков (белая, черная, пега, агути). Предпочтение отдается животным белой масти (65% всего поголовья), т.к. это наиболее удобно для исследований. Животные проходят строгую выбраковку, если имеют слабую конституцию, пороки в экстерьере, проявляют агрессию (или излишнюю пугливость) к исследователям и сородичам.

СМС – линия животных, которая была создана на основе собственного генофонда, животные объединены лишь формально только по общности происхождения. Это основная и самая старая группа животных. Эти животные имеют наибольшее родство со своими прямыми

Таблица 1  
Показатели живой массы в общем по стаду (данные 2010 г.), кг

Показатель	Возраст						
	при рождении	в 21 день	в 2 мес.	в 6 мес.	в 12 мес.	в 36 мес. и старше	
						хряки	свиноматки
Живая масса, кг	0,54± 0,05	2,87± 0,22	5,68± 0,34	18,15± 0,41	25,26± 0,29	38,84± 0,38	45,12± 0,42

Примечание: в 2010 г. использовался показатель «живая масса в 21 день», сейчас мы используем показатель «живая масса в 1 мес.».

прародителями – «минисибсами», группу которых завезли в 1974 г. из Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск. Для этих животных характерна крепкая конституция, прямые развитые, несколько длинные конечности, животные имеют самые разнообразные масти, преобладает белая (рис. 1). Животные легко обучаются бегу на тредбане, они выносливы и неагрессивны. Живая масса при рождении составляет 0,58 кг; в год – 18-23 кг (табл. 2); многоплодие свиноматок – 6,6 гол.; сохранность поросят к отъему – 96,97%.

Ст – линия животных, которая ведет свое начало от одного родоначальника. Животные этой линии скрещиваются по схеме ротационного скрещивания, т.е. первое поколение (F1) было получено от

родоначальника Ст, которое затем скрещивалось с выдающимися животными линии СМС. F2, в свою очередь, скрещивались с потомками, полученными от родоначальника Ст, и т.д. Ротация – только по отцовской линии. Животные характеризуются сниженной живой массой, имеют крепкую конституцию, прямые конечности. Обладают добрым нравом, имеют белую, черную и пегую масти, преобладает белая масть (рис. 2). Живая масса при рождении составляет 0,52 кг; в год – 18-23 кг (табл. 2); многоплодие свиноматок – 7,1 гол.; сохранность поросят к отъему – 95,24%.

С3 – линия животных, которая также ведет свое начало от одного родоначальника. Животные этой линии также скрещиваются по схеме ротационного

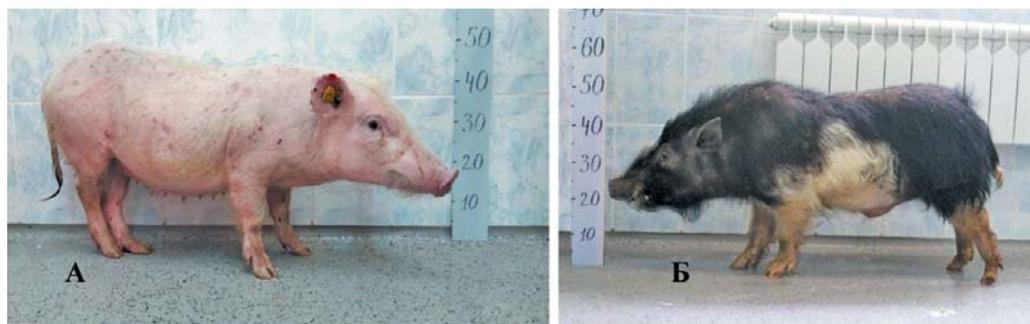


Рис. 1. Животные линии СМС: А – свинка; Б – хряк.

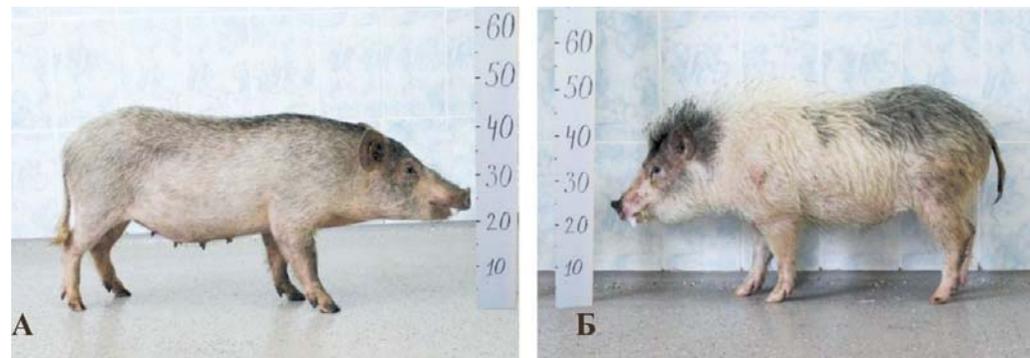


Рис. 2. Животные линии Ст: А – свинка; Б – хряк.

скрещивания, т.е. первое поколение (F1) было получено от другого родоначальника СЗ. Ротация – только по отцовской линии. Для этих животных характерна крепкая конституция, ровная спина, прямые конечности. Животные обладают сниженной живой массой, добрым нравом, имеют белую и черную масти, преобладает белая масть (рис. 3). Живая масса при рождении составляет 0,52 кг; в год – 18-23 кг (табл. 2); многоплодие свиноматок – 5 гол.; сохранность поросят к отъему – 97,1%.

Вс – линия животных, которая была создана на основе родоначальника Вс. Полученное потомство не соответствовало желательному типу, имело рыхлую конституцию, провисшую спину, слабые конечности, флегматичный темперамент, излишнюю живую массу. Свиноматки характеризовались низким многоплодием. Эта линия была выбра-

кована, после зоотехнической оценки животные использовались только для проведения экспериментов.

С8 – семейство животных, которое ведет свое начало от одной родоначальницы. Животные этой линии скрещиваются по схеме ротационного скрещивания, т.е. первое поколение (F1) было получено от родоначальницы С8, которое затем скрещивалось с выдающимися животными линии СМС. F2, в свою очередь, скрещивались с потомками, полученными от родоначальницы С8, и т.д. Ротация – по материнской линии. Для этих животных характерна крепкая конституция, ровная спина, прямые, развитые конечности. Животные легко обучаются бегу на тредбане, они выносливы и неагрессивны. Животные обладают сниженной живой массой, добрым нравом, имеют разнообразные масти, преобладает белая масть (рис. 4). Живая



Рис. 3. Животные линии СЗ: А – свинка; Б – хряк.



Рис. 4. Животные семейства С8: А – супоросная свиноматка; Б – хряк.

Живая масса светлогорских мини-свиней по линиям, кг

Линия	Пол	Возраст						
		при рожд.	1 мес.	2 мес.	6 мес.	1 год	2 года	3 года
СМС	хряки	0,58± 0,19	2,38± 0,28	5,11± 0,55	12,73± 2,27	18,3± 4,01	26,8± 5,27	31,02± 6,04
	свинки	0,55± 0,20	2,52± 0,38	5,41± 0,18	14,15± 2,64	23,38± 4,49	33,57± 2,68	39,08± 3,85
СТ	хряки	0,49± 0,17	2,26± 0,26	4,81± 0,79	12,11± 3,11	20,8± 3,29	25,22± 2,97	29,25± 4,75
	свинки	0,52± 0,12	2,64± 0,23	4,71± 0,35	13,89± 3,03	24,43± 3,35	27,14± 5,81	32,45± 0,39
СЗ	хряки	0,59± 0,14	2,45± 0,34	6,25± 0,37	12,63± 1,84	18,37± 2,97	28,4± 7,00	31,28± 3,65
	свинки	0,53± 0,25	2,67± 0,12	5,17± 0,91	14,58± 0,53	25,91± 3,51	27,45± 0,64	34,72± 1,28
С8	хряки	0,53± 0,17	2,67± 0,63	4,74± 0,42	11,46± 2,16	20,38± 4,23	22,49± 4,73	30,12± 8,27
	свинки	0,54± 0,15	2,96± 0,61	5,51± 0,18	13,95± 2,082	18,65± 4,43	27,97± 5,95	35,35± 5,91
С22	хряки	0,56± 0,09	2,36± 0,45	5,55± 0,71	14,38± 2,86	20,01± 3,90	23,47± 3,45	25,45± 4,67
	свинки	0,58± 0,04	2,48± 0,37	5,49± 0,31	14,74± 2,53	21,55± 4,72	25,93± 4,31	28,39± 2,58

масса при рождении составляет 0,52 кг; в год – 18-23 кг (табл. 2); многоплодие свиноматок – 6,1 гол.; сохранность поросят к отъему – 94,23%.

С22 – семейство животных, которое также ведет свое начало от одной родоначальницы. Животные этой линии

скрещиваются по схеме ротационного скрещивания, т.е. первое поколение (F1) было получено от родоначальницы С22, которое затем скрещивалось с выдающимися животными линии СМС. F2, в свою очередь, скрещивались с потомками, полученными от родоначальницы



Рис. 5. Животные семейства С22: А – свинка; Б – хряк.

С22, и т.д. Ротация – по материнской линии. Для этих животных характерна крепкая конституция, ровная спина, прямые, развитые конечности. Животные легко обучаются бегу на тредбане, они выносливы и неагрессивны. Животные обладают сниженной живой массой, добрым нравом, имеют белую и черную масти, преобладает белая масть (рис. 5). Живая масса при рождении составляет 0,52 кг; в год – 18-23 кг (табл. 2); многоплодие свиноматок – 6,25 гол.; сохранность поросят к отъему – 72%.

Таким образом, полученные линии позволяют вести разведение без привлечения животных из других хозяйств. Существенно снижена живая масса взрослых животных (у свинок в среднем по стаду на 11,13 кг, у хряков – на 9,42 кг), что позволяет легко ими манипулировать в лабораторных условиях. Это, в свою очередь, повлекло снижение многоплодия на 1,5 гол. в среднем по стаду в сравнении с показателями 2010 г.

### Выводы

Светлогорские мини-свиньи являются удобной биомоделью для проведения различного рода исследований, они имеют низкую живую массу и компактные размеры, преобладает белая масть.

В результате плановой бонитировки и выбраковки животных, а также подбора родительских пар получены линии мини-свиней внутри светлогорской популяции. Это позволяет нам получать неродственных животных в условиях ограниченного поголовья без привлечения животных из других хозяйств.

Ввиду того, что одна линия была выбракована, планируется создание новой (одной или нескольких) линии мини-свиней с использованием кроссов существующих линий.

Существенно снижена живая масса взрослых животных, что повлекло снижение многоплодия. Необходимо учитывать этот показатель при дальнейшей работе.

В данной работе мы проанализировали лишь зоотехнические характеристики каждой линии. В дальнейшем планируется более детально изучить типы высшей нервной деятельности и поведение животных внутри каждой линии для отбора мини-свиней в исследования по работоспособности и др.

### Список литературы

1. Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини-свиней // Биомедицина. 2007. № 6. С. 70-80.

2. **Новиков А.А., Романенко Н.И., Семак М.С.** Иммуногенетические маркеры и их использование в селекции // Современные аспекты селекции, биотехнологии, информатики в племенном животноводстве. ВНИИплем. - М. 1997. С. 97-105.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
4. **Станкова Н.В., Кapanadze Г.Д.** Оптимизация светлогорских мини-свиней для биомедицинских исследований // Биомедицина. 2010. № 5. С. 33-49.
5. **Станкова Н.В., Кapanadze Г.Д.** Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции // Биомедицина. 2012. № 1. С. 49-53.
6. **Станкова Н.В.** Типы крови человека и мини-свиней светлогорской популяции // Вестник РАСХН. 2008. № 6. С. 29-30.
7. **Тихонов В.Н.** Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование. - Новосибирск. СО РАН. 2010. 304 с.

## References

1. **Kapanadze G.D., Ashuev Zh.A.** Svetlogorskaya populaciya mini-svinej // Biomedicina. 2007. № 6. S. 70-80.
2. **Novikov A.A., Romanenko N.I., Semak M.S.** Immunogeneticheskie markery i ih ispol'zovanie v selekcii // Sovremennye aspekty selekcii, biotekhnologii, informatiki v plemennom zhivotnovodstve. VNIIPlem. - M. 1997. S. 97-105.
3. Rukovodstvo po laboratornym zhitvotnym i al'ternativnym modelyam v biomedicinskih issledovaniyah / pod red. N.N. Karkischenko, S.V. Gracheva. - M.: Profil'-2S. 2010. 358 s.
4. **Stankova N.V., Kapanadze G.D.** Optimizaciya svetlogorskih mini-svinej dlya biomedicinskih issledovaniy // Biomedicina. 2010. № 5. S. 33-49.
5. **Stankova N.V., Kapanadze G.D.** Selekcionno-geneticheskaya i ehksperimental'naya rabota s mini-svin'yami svetlogorskoj populacii // Biomedicina. 2012. № 1. S. 49-53.
6. **Stankova N.V.** Tipy krovi cheloveka i mini-svinej svetlogorskoj populacii // Vestnik RASKhN. 2008. № 6. S. 29-30.
7. **Tihonov V.N.** Laboratornye mini-svin'i: genetika i mediko-biologicheskoe ispol'zovanie. - Novosibirsk. SO RAN. 2010. 304 s.

## The formation of new lines of svetlogorsk mini-pigs

**N.V. Stankova, M.A. Savina, G.D. Kapanadze**

A zootechnical evaluation of a five-year selection work with lines of svetlogorsk mini-pigs was carried out. The features of the animals on each line are revealed and further work with the livestock is planned. Animals with reduced live weight, of the desired type in each line, that meet the necessary requirements for laboratory animals are obtained. The animal lines of Vs were discarded, which necessitated the creation of new lines, as well as increasing the multiplicity of available lines. It is planned to study other indicators for each line (working capacity, behavior, etc.).

**Key words:** svetlogorsk mini-pigs, laboratory animals, biomodels.



## Изучение влияния производного аминоэтанола на когнитивные функции лабораторных животных

И.А. Титович<sup>1</sup>, С.В. Радько<sup>1</sup>, Д.С. Лисицкий<sup>2</sup>, С.В. Оковитый<sup>1</sup>,  
В.Ц. Болотова<sup>1</sup>, А.В. Бельская<sup>2</sup>, М.В. Михайлова<sup>2</sup>, Ю.И. Сысоев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Контактная информация: Титович Ирина Александровна, [irina.titovich@pharmimnotech.com](mailto:irina.titovich@pharmimnotech.com)

Изучено влияние производного диэтиламиноэтанола (ФДЭС) в дозах 10 и 75 мг/кг на когнитивные функции крыс и мышей в тестах «Условная реакция пассивного избегания болевого раздражения» (УРПИ), «Экстраполяционное избавление» (ЭПИ) и «Т-лабиринт». В тесте «УРПИ» ФДЭС оказывал защитное влияние на процессы консолидации и воспроизведения памятного следа через 2 и 24 ч после введения скополамина и был сопоставим с пирацетамом. Производное диэтиламиноэтанола способствовало сохранению навыка выбора «правильного рукава» в тесте «Т-лабиринт» и превосходило препарат сравнения. На фоне приема ФДЭС в обеих дозах в тесте «ЭПИ» уменьшалось время подныривания и увеличивалось количество крыс, решивших экстраполяционную задачу, по сравнению с пирацетамом.

**Ключевые слова:** диэтиламиноэтанола производное, условная реакция пассивного избегания болевого раздражения, экстраполяционное избавление, Т-лабиринт, пирацетам, крысы, мыши.

### Введение

Черепно-мозговая травма, гипоксия, нарушения мозгового кровообращения и нейроинфекции могут быть причинами когнитивных дисфункций, проявляющихся снижением памяти и внимания [3]. Впоследствии это приводит к ухудшению качества жизни, уменьшению социальной активности, трудовой деятельности и большим экономическим потерям.

Основной группой препаратов, используемых для лечения нарушения памяти, являются ноотропные средства [5, 7, 9, 19]. К ним относятся производные пирролидона

(пирацетам, фонтурацетам), нейропептиды и их аналоги (пептиды головного мозга скота, семакс, ноопепт), структурные аналоги ГАМК (гопантеновая, аминифенилмасляная и гамма-аминомасляная кислоты), препараты, оптимизирующие холинергическую передачу в ЦНС (деанола ацеглумат, холина альфосцерат, цитиколин). Их недостатками являются необходимость длительного (для некоторых препаратов – многомесячного) приема до начала отчетливых проявлений ноотропного действия и недостаточная выраженность фармакологического эффекта.

В качестве потенциальных ноотропов большой интерес представляют прекурсоры ацетилхолина – в частности, производные диэтиламиноэтанола (ДЭАЭ), оптимизирующие холинергическую передачу, участвующую в механизмах формирования долговременной памяти.

**Целью** исследования была оценка влияния нового производного ДЭАЭ – (2e)-4-[2-(диэтиламино)этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоата – на когнитивные функции лабораторных животных.

### Материалы и методы

Исследование выполняли в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», согласно утвержденному письменному протоколу. Животные были получены из питомника «Рапполово» (Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде.

В качестве объекта исследования было выбрано соединение аминокэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС), синтезированное на кафедре органической химии СПХФА Минздрава России (зав. кафедрой проф. Яковлев И.П.) в дозах 10 и 75 мг/кг [8]. В качестве препарата сравнения использовали пираретам («ЮСБ Фарма С.А.») в дозе 900 мг/кг [4, 15].

Когнитивные функции лабораторных животных оценивали на белых

беспородных крысах-самцах массой 200-250 г в тестах «Экстраполяционное избавление» (ЭПИ) и «Условная реакция пассивного избегания болевого раздражения» (УРПИ). Тест «Т-лабиринт» выполняли на 30-ти мышках-самцах линии СВА массой 18-22 г.

Тест «УРПИ» основан на выработке условной реакции пассивного избегания в челночной камере у крыс в ответ на безусловный электрокожный болевой раздражитель, предъявляемый в предпочитаемом грызунами тёмном отсеке камеры. Обучение животных проводилось в двухкамерной установке PACS-30 («Columbus Instruments», США), состоящей из затемненного и освещённого отсеков, соединенных дверцей. Использовался ток силой 1 мА, который предъявлялся в течение трех сек, однократно. В эксперимент отбирали животных с наличием норкового рефлекса. За 30 мин до обучения животным внутрибрюшинно вводили скополамина гидробромид («Sigma», США) в дозе 1,5 мг/кг, кроме интактной группы. Далее регистрировали количество обученных крыс, не зашедших в тёмную камеру на протяжении двух мин, а также время нахождения животных в тёмной и светлой камерах через 2 и 24 ч после обучения [2, 18].

Препараты вводили ежедневно внутрижелудочно в течение 14-ти дней до введения скополамина. Животные контрольной и интактной групп получали физ. р-р в эквивалентном количестве.

Тест «ЭПИ» позволяет определить способность животного находить пути избавления из острой стресс-ситуации и используется для выявления влияния фармакологических агентов на мнестические функции. После помещения животного в установку (НПК «Открытая Наука», Мо-

сква) включали секундомер и фиксировали латентный период начала реакций и латентный период подныривания [1]. После подныривания или по истечении двух мин вынимали животных из воды и обсушивали. Сохранение навыка избавления от водной среды проверяли через 14 дней.

Препараты вводили ежедневно внутрижелудочно в течение 14-ти дней после обучения. Животные контрольной группы получали физ. р-р в эквивалентном количестве.

Модели обучения животных в лабиринтах являются наиболее адекватными для изучения процессов памяти, т.к. создаваемые условия соответствуют естественной среде обитания. Хорошо развитая пространственная память мелких грызунов позволяет исследовать их поведение в лабиринтах различной сложности. Обучение мышей в Т-образном лабиринте с пищевым подкреплением является одной из распространенных моделей лабиринтного обучения. Для этого мышей помещали в Т-лабиринт (НПК «Открытая Наука», Москва), где в конце обоих «рукавов» находилось вознаграждение в виде корма. Животному давалось время выбрать «рукав» и съесть корм. Выбранный «рукав» впоследствии обозначался как «неправильный» и закрывался перегородкой на время обучения. В следующие 5 дней происходило обучение животных, в ходе которого ежедневно в серии из 10-ти попыток животное могло пройти в «правильный» «рукав», где находилось вознаграждение. Тесты по оценке памяти проводились на 1-й, 5-й и 10-й день после окончания обучения. Фиксировалось количество посещений «правильного» и «неправильного» «рукава» в серии из 10-ти попыток. Критерием оценки обучаемости было осуществление более 8-ми

заходов в «правильный» «рукав» в ходе 10-ти попыток [12]. Препараты вводили ежедневно внутрижелудочно в течение 5-ти дней во время обучения в Т-лабиринте. Животные контрольной группы получали физ. р-р в эквивалентных количествах.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью t-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: среднее арифметическое ( $M$ )  $\pm$  ошибка среднего ( $m$ ). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

### Результаты исследования

Проведенными исследованиями установлено, что для изучаемых препаратов характерно влияние на когнитивные функции. Так, в тесте «УРПИ» среди интактных крыс через 2 и 24 ч после обучения памятный след сохранили соответственно 83 и 75% животных. Скополамин значительно ухудшал этот показатель, уменьшая число обученных крыс до 16 и 41% соответственно. Под

влиянием пираретама происходило нивелирование отрицательного действия холиноблокатора, и количество обученных животных через 2 и 24 ч составило 83 и 100% соответственно. ФДЭС в обеих дозах показал сопоставимый с препаратом сравнения эффект, увеличивая число крыс, сохранивших навык через 2 ч до 75% (обе дозы), а через 24 ч – до

91% (10 мг/кг) и 83% (75 мг/кг) (рис.).

На фоне предварительного введения скополамина в контрольной группе животных происходило снижение времени нахождения в светлой камере и увеличение времени нахождения в темной камере, что может говорить об угнетении процессов запоминания и воспроизведения информации (таб. 1).

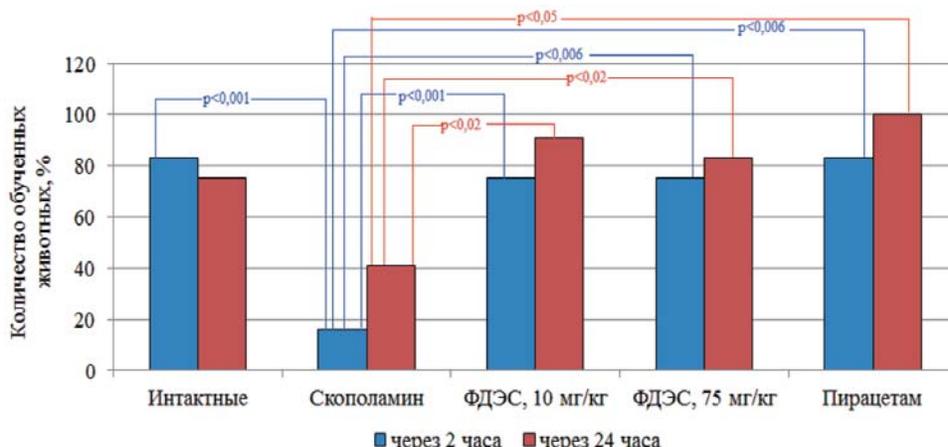


Рис. Влияние исследуемых препаратов на сохранение памятного следа в тесте «УРПИ».

Таблица 1  
Влияние исследуемых препаратов на формирование и воспроизведение памятного следа в тесте «УРПИ»

Группа	Показатели, M±m					
	Латентный период первого захода в темную камеру через 2 ч, с	Время нахождения в темной камере через 2 ч, с	Время нахождения в светлой камере через 2 ч, с	Латентный период первого захода в темную камеру через 24 ч, с	Время нахождения в темной камере через 24 ч, с	Время нахождения в светлой камере через 24 ч, с
Интактные	107,7±8,3	10,8±7,3	109,3±7,3	104,9±9,0	9,8±6,6	110,2±6,6
Контроль (скополамин)	39,8±11,7 <sup>1</sup>	37,5±9,4 <sup>1</sup>	82,5±9,4 <sup>1</sup>	57,0±13,2 <sup>1</sup>	47,3±11,6 <sup>1</sup>	72,8±11,6 <sup>1</sup>
Пирацетам + скополамин	102,3±11,0 <sup>2</sup>	12,0±7,8 <sup>2</sup>	108,0±7,8 <sup>2</sup>	110,5±9,5 <sup>2</sup>	8,6±8,6 <sup>2</sup>	111,4±8,6 <sup>2</sup>
ФДЭС (10 мг/кг) + скополамин	94,8±13,2 <sup>2</sup>	3,5±2,0 <sup>2</sup>	116,5±2,0 <sup>2</sup>	113,5±6,5 <sup>2</sup>	1,3±1,3 <sup>2</sup>	118,8±1,3 <sup>2</sup>
ФДЭС (75 мг/кг) + скополамин	94,4±13,4 <sup>2</sup>	12,3±8,5 <sup>2</sup>	107,8±8,5 <sup>2</sup>	104,8±10,3 <sup>2</sup>	1,8±1,2 <sup>2</sup>	118,3±1,2 <sup>2</sup>

Примечание: <sup>1</sup> – достоверное отличие от интактной группы (p<0,05); <sup>2</sup> – достоверное отличие от контрольной группы (p<0,05).

ФДЭС в обеих дозах при курсовом введении оказывал защитное влияние после введения скополамина на процессы консолидации и воспроизведения памятного следа через 2 и 24 ч. У животных этих групп время нахождения в светлой камере значительно преобладало над временем нахождения в тёмной камере, а заходы животных в тёмную камеру были ошибочными и на непродолжительный срок. Эффект пиррацетам был сопоставим с действием ФДЭС.

В тесте «ЭПИ» изучалась способность исследуемых препаратов сохранять памятный след о способе избегания водной среды через 14 дней. В ходе проведенного исследования было установлено, что в контрольной группе латентное время подныривания и начала движений увеличивалось в 1,7 и 2 раза; количество крыс, решивших экстрас-

поляционную задачу, уменьшалось на 10% по сравнению с исходным уровнем (табл. 2).

В группе животных, которым вводили пиррацетам, наблюдали достоверное снижение времени подныривания в 2,3 раза и повышение на 30% количества крыс, которые смогли выполнить задачу, по отношению к контрольной группе. По сравнению с исходными данными не было выявлено достоверных отличий.

В группе ФДЭС (10 мг/кг) наблюдали достоверное уменьшение времени подныривания в 2,2 раза, что говорит о высокой скорости ориентировочных реакций, сокращении латентного периода начала движений в 6,9 раза и увеличении количества крыс, решивших экстрасполяционную задачу, на 30% по сравнению с контрольной группой. ФДЭС (10 мг/кг) достоверно снижал латент-

Таблица 2

**Влияние исследуемых препаратов на формирование и воспроизведение памятного следа в тесте «ЭПИ»**

Показатель	Группа			
	Контроль	ФДЭС, 10 мг/кг	ФДЭС, 75 мг/кг	Пиррацетам
<i>Исходно</i>				
Латентное время начала движений, сек	3,8±0,8	3,6±0,6	3,9±1,8	3,4±1,1
Латентное время подныривания, сек	45,15±14,3	49,39±15,6	51,7±15,2	52,3±14,4
% крыс, решивших экстрасполяционную задачу	70	70	70	70
<i>После 14 дней введения препаратов</i>				
Латентное время начала движений, сек	7,6±2,4 <sup>1</sup>	1,1±0,1 <sup>1,2</sup>	2,3±0,7 <sup>2</sup>	5,2±1,16
Латентное время подныривания, сек	77,0±10,1 <sup>1</sup>	35,1±11,1 <sup>2</sup>	31,2±14,8 <sup>2</sup>	33,9±10,7 <sup>2</sup>
% крыс, решивших экстрасполяционную задачу	60	90	80	90

Примечание: <sup>1</sup> – достоверные отличия от соответствующего исходного показателя (p<0,05);

<sup>2</sup> – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы (p<0,05)

ный период начала движений в 3,2 раза по отношению к исходным данным.

ФДЭС (75 мг/кг) способствовал достоверному ( $p < 0,05$ ) уменьшению латентного периода начала движений в 3,3 раза, латентного периода подныривания в 2,5 раза и увеличению крыс, решивших экстрополяционную задачу, на 20% по сравнению с контрольной группой.

В тесте «Т-лабиринт» было установлено, что 100% животных контрольной группы не сохранили навык выбора «правильного рукава». При введении пирацетама 28,5% мышей смогли выбрать «верный рукав» в 1-й и 5-й дни исследования. В группах, которые получали ФДЭС (10 и 75 мг/кг), количество обученных животных соответственно составило 50% и 87,5% в 1-й день, 62,5% и 87,5% – в 5-й день, а к 10-му дню 50% мышей в обеих группах сохранили навык выбора «правильного рукава» (табл. 3).

### Обсуждение результатов

Холинергическая система является важным компонентом формирования памяти и нейрональной пластичности

[23, 26], а ее нарушения приводят к заметным негативным изменениям [14, 24]. Кроме того, ухудшение памяти – хорошо известный эффект холиноблокаторов [13].

В исследовании Николаевой И.Г. и др. [6], проведенном на крысах, было показано, что введение пирацетама в дозе 200 мг/кг вызывает выработку рефлекса в тесте «Т-лабиринт» на 4-й день у 40 % крыс, на 10-й день – у всех животных в группе. Через 7 дней навык сохранялся у 94% животных. Такой эффект препарата некоторые авторы объясняют его влиянием не только на глутаматергическую, но и на холинергическую системы, играющие ведущую роль в реализации интеллектуально-мнестических функций мозга. Пирацетам достаточно избирательно активирует АМРА-подтип глутаматных рецепторов, участвующий в формировании долговременной памяти [11, 20]. Но при этом он стимулирует биосинтез ацетилхолина, обратный захват холина в синаптической щели и увеличивает плотность М-холинорецепторов во фронтальной коре старых крыс [21].

Таблица 3  
Влияние исследуемых препаратов на когнитивные функции мышей в тесте «Т-лабиринт»

Группа	Количество животных, сохранившие навык выбора «правильного» «рукава» после окончания обучения, %		
	1-й день	5-й день	10-й день
Контроль	0	0	0
Пирацетам	28,5 <sup>1</sup>	28,5 <sup>1</sup>	0
ФДЭС, 10 мг/кг	50 <sup>1</sup>	62,5 <sup>1,2</sup>	50 <sup>1,2</sup>
ФДЭС, 75 мг/кг	87,5 <sup>1,2</sup>	87,5 <sup>1,2</sup>	50 <sup>1,2</sup>

Примечание: <sup>1</sup> – достоверные отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> – достоверные отличия от группы пирацетама ( $p < 0,05$ ).

Продолжительно, механизм действия ФДЭС может быть связан с тем, что входящий в состав препарата диэтиламиноэтанол обеспечивает синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран [10, 16]. Однако достаточно низкая несубстратная доза препарата, в которой он оказывает свой эффект, не позволяет рассматривать этот механизм как ведущий. Возможно, в такой низкой дозе ФДЭС, как и другие производные аминокэтанола, может непосредственно взаимодействовать с холинергическими рецепторами или же стимулировать выброс ацетилхолина [17, 22]. Кроме того, вклад в фармакологический эффект препарата может вносить входящая в его состав бутандиовая (янтарная) кислота, реализующая свои эффекты в данном случае не столько через субстратные, сколько через специфические рецепторные (SUCNR1) механизмы.

Таким образом, (2е)-4-[2-(диэтиламино)этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоат оказывает положительное влияние на когнитивные функции лабораторных животных в тестах «УРПИ», «ЭПИ» и «Т-лабиринт», сопоставимое с эталонным препаратом пирацетамом.

### Выводы

1. (2е)-4-[2-(диэтиламино)этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоат оказывает положительное действие на кратковременную и долговременную память, способствуя сохранению и воспроизведению полученной информации.

2. Выраженность антиамнестического действия ФДЭС в обеих дозах сопоставима с таковой у пирацетама.

3. ФДЭС в дозах 10 и 75 мг/кг оказывает сходный по выраженности ноотропный эффект в тесте «ЭПИ».

4. В тесте «Т-Лабиринт» ФДЭС в обеих дозах превосходит эталонный препарат.

5. В эффектах на мнестические функции ФДЭС для доз 10 и 75 мг/кг отсутствует заметная разница, в связи с чем при исследованиях с курсовым применением препарата оптимальной может считаться доза 10 мг/кг.

### Список литературы

1. *Бондаренко Н.А.* Избирательный эффект нейролептиков на нарушение дофамин-зависимого поведения у крыс в тесте экстропольационного избавления // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1990. № 11. С. 506-508.
2. *Воронина Т.А.* Экспериментальная психофармакология ноотропов // В кн.: Фармакология ноотропов / Под ред. Вальдман А.В., Ворониной Т.А. - М.: Медицина. 1989. С. 91-98.
3. *Дамулин И.В.* Сосудистая деменция // Неврологический журнал. 1999. № 4. С. 4-11.
4. *Колясникова К.Н.* Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффекту // Эксп. и клин. фармакология. 2012. № 9. С. 3-6.
5. *Левин О.С.* Применение цитиколина в лечении инсульта // РМЖ. 2008. Т. 26. С. 1772-1777.
6. *Николаева И.Г., Дымищева Л.Д.* Разработка средства, обладающего ноотропной активностью // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 2. С. 201-204.
7. *Полужтков М.Г., Преображенская И.С.* Нарушения сна и когнитивных функций, подходы к терапии // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2014. № 1. С. 68-73.
8. *Титович И.А., Болотова В.Ц.* Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола // Биомедицина. 2016. № 2. С. 77-83.
9. *Фардиева Р.М., Залялютдинова Л.Н.* Применение ноотропов при интеллектуальной недостаточности у детей // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 2. С. 78.
10. *Akesson B.* Effects of analogues of ethanolamine and choline on phospholipid metabolism in

- rat hepatocytes // *Biochemical J.* 1977. V. 168. No. 3. P. 401-408.
11. **Baxter M.G., Bucci D.J., Gorman L.K., Wiley R.G., Gallagher M.** Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats // *Behav. Neurosci.* 1995. Vol. 109. P. 714-722.
  12. **Deacon R.M., Rawlins J.N.** T-maze alternation in the rodent // *Nature protocols-electronic edition.* 2006. Vol. 1. No. 1. P. 7.
  13. **Drachman D.A.** Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a special role // *Neurology.* 1977. Vol. 27. P. 783-790.
  14. **Fernandes M.A., Moscovitch M.** Divided attention and memory: evidence of substantial interference effects at retrieval and encoding // *J. Exp. Psychol. Gen.* 2000. Vol. 129. P. 155-176.
  15. **Giurgea C.** Clinical significance of nootropil // *Symposium UCB.* 1976. P. 1-1.
  16. **Kapoor V.K., Dureja J., Chadha R.** Synthetic drugs with antiageing effects drug // *Dis-cov. Today.* 2009. Vol. 14. P. 899-904.
  17. **Kostopoulos G.K., Phillis J.W.** The effects of dimethylaminoethanol (deanol) on cerebral cortical neurons // *Psychopharmacology communications.* 1974. V. 1. No. 3. P. 339-347.
  18. **Ostrovskaya R.U.** GVS 111 an acylprolyl containing dipeptide with nootropic properties // *Biological basis of individual sensitivity to psychotropic drugs.* 1994. Vol. 1. P. 79-91.
  19. **Parnetti L., et al.** Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re-evaluation? // *J. of the neurological sciences.* 2007. Vol. 257. No. 1. P. 264-269.
  20. **Pedata F., Moroni F., Pepeu G.C.** Effect of nootropic agents on brain cholinergic mechanisms // *Clinical Neuropharmacology.* 1984. Vol. 7. P. 416.
  21. **Pilch H., Müller W.E.** Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice // *Psychopharmacology.* 1988. Vol. 94. No. 1. P. 74-78.
  22. **Pomeroy A.R., Raper C.** Cholinomimetic activity of dimethylaminoethanol, and propanol and related compounds // *Eur. J. of Pharmacology.* 1972. Vol. 17. No. 1. P. 81-86.
  23. **Rasmusson D.D.** The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity // *Behav. Brain Res.* 2000. Vol. 115. P. 205-218.
  24. **Sarter M., Hasselmo M.E., Bruno J.P., Givens B.** Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection // *Brain Res. Rev.* 2005. Vol. 48. P. 98-111.
  25. **Scandia V.** Nootropil // *Symposium UCB.* Belgium. 1977. P. 5-20.
  26. **Warburton E.C., Koder T., Cho K.** Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory // *Neuron.* 2003. Vol. 38. P. 987-96.

## References

1. **Bondarenko N.A.** Izbiratel'nyj ehffekt nejroleptikov na narushenie dofamin-zavisimogo povedeniya u kryv v teste ehkstopolyacionnogo izbavleniya // *Byull. ehksp. boil. i med.* 1990 . № 11. S. 506-508.
2. **Voronina T.A.** Ehksperimental'naya psihofarmakologiya nootropov // V kn.: *Farmakologiya nootropov / Pod red. Val'dman A.V., Voroninoy T.A.* - M.: Medicina. 1989. S. 91-98.
3. **Damulin I.V.** Sosudistaya demenciya // *Nevrologicheskij zhurnal.* 1999. № 4. C. 4-11.
4. **Kolyasnikova K.N.** Skhodstvo ciklo-prolilglicina s piracetamom po antigipoksicheskomu i nejroprotektornomu ehffektu // *Ehksp. i kiln. farmakologiya.* 2012. № 9. S. 3-6.
5. **Levin O.S.** Primenenie citikolina v lechenii insul'ta // *RMZh.* 2008. T. 26. S. 1772-1777.
6. **Nikolaeva I.G., Dymshcheva L.D.** Razrabotka sredstva, obladayushchego nootropnoj aktivnost'yu // *Byull. VSNC SO RAMN.* 2010. № 2. S. 201-204.
7. **Poluehktov M.G., Preobrazhenskaya I.S.** Narusheniya sna i kognitivnyh funkcij, podhody k terapii // *Nevrologiya, nejropsihiatriya, psihosomatika.* 2014. № 1. S. 68-73.
8. **Titovich I.A., Bolotova V.C.** Ehksperimental'noe izuchenie antigipoksicheskoy aktivnosti novogo proizvodnogo aminoethanola // *Biomedicina.* 2016. № 2. S. 77-83.
9. **Fardieva R.M., Zalyalyutdinova L.N.** Primenenie nootropov pri intellektual'noj nedostatochnosti u detej // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2013. № 2. S. 78.
10. **Akesson B.** Effects of analogues of ethanolamine and choline on phospholipid metabolism in rat hepatocytes // *Biochemical J.* 1977. V. 168. No. 3. P. 401-408.
11. **Baxter M.G., Bucci D.J., Gorman L.K., Wiley R.G., Gallagher M.** Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats // *Behav. Neurosci.* 1995. Vol. 109. P. 714-722.

12. *Deacon R.M., Rawlins J.N.* T-maze alternation in the rodent // Nature protocols-electronic edition. 2006. Vol. 1. No. 1. P. 7.
13. *Drachman D.A.* Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a special role // Neurology. 1977. Vol. 27. P. 783-790.
14. *Fernandes M.A., Moscovitch M.* Divided attention and memory: evidence of substantial interference effects at retrieval and encoding // J. Exp. Psychol. Gen. 2000. Vol. 129. P. 155-176.
15. *Giurgea C.* Clinical significance of nootropil // Symposium UCB. 1976. P. 1-1.
16. *Kapoor V.K., Dureja J., Chadha R.* Synthetic drugs with antiageing effects drug // Dis-cov. Today. 2009. Vol. 14. P. 899-904.
17. *Kostopoulos G.K., Phillis J.W.* The effects of dimethylaminoethanol (deanol) on cerebral cortical neurons // Psychopharmacology communications. 1974. V. 1. No. 3. P. 339-347.
18. *Ostrovskaya R.U.* GVS 111 an acylprolyl containing dipeptide with nootropic properties // Biological basis of individual sensitivity to psychotropic drugs. 1994. Vol. 1. P. 79-91.
19. *Parnetti L., et al.* Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re-evaluation? // J. of the neurological sciences. 2007. Vol. 257. No. 1. P. 264-269.
20. *Pedata F., Moroni F., Pepeu G.C.* Effect of nootropic agents on brain cholinergic mechanisms // Clinical Neuropharmacology. 1984. Vol. 7. P. 416.
21. *Pilch H., Müller W.E.* Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice // Psychopharmacology. 1988. Vol. 94. No. 1. P. 74-78.
22. *Pomeroy A.R., Raper C.* Cholinomimetic activity of dimethylaminoethanol, and propranol and related compounds // Eur. J. of Pharmacology. 1972. Vol. 17. No. 1. P. 81-86.
23. *Rasmusson D.D.* The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity // Behav. Brain Res. 2000. Vol. 115. P. 205-218.
24. *Sarter M., Hasselmo M.E., Bruno J.P., Givens B.* Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection // Brain Res. Rev. 2005. Vol. 48. P. 98-111.
25. *Scandia V.* Nootropil // Symposium UCB. Belgium. 1977. P. 5-20.
26. *Warburton E.C., Koder T., Cho K.* Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory // Neuron. 2003. Vol. 38. P. 987-96.

## The study of the effect of the aminoethanol derivative on cognitive functions of laboratory animals

I.A. Titovich, S.V. Radko, D.S. Lisitskiy, S.V. Okovityy, V.Ts. Bolotova, A.V. Belskaya, M.V. Mikhailova, Yu.I. Sysoev

The influence of a novel diethylaminoethanol derivative (FDES) at doses of 10 and 75 mg/kg on the cognitive functions of rats and mice was tested in the tests "Conditional reaction of passive avoidance of pain stimulation" (URPI), "Extrapolation disposal" (EPI) and "T-maze". In the "URPI" test, FDES exerted a protective effect on the processes of consolidation and reproduction of the memorable trace 2 and 24 hours after the administration of scopolamine and was comparable to pyracetam. The novel diethylaminoethanol derivative contributed to retaining of the ability to choose the "correct" arm in the "T-maze" test and also outperformed the reference drug (agent). During the administration of FDES in both doses, in the "EPI" test, the rats dove under the edge of the cylinder earlier, also the number of rats which dove was higher in comparison with rats to which piracetam was administered.

**Key words:** diethylaminoethanol derivative, conditional reaction of passive avoidance of pain stimulation, extrapolation deliverance, T-maze, piracetam, rat, mice.

---

# Правила направления, рецензирования и опубликования рукописей научных работ в журнале «Биомедицина»

## 1. Порядок направления и опубликования рукописей в рецензируемом издании

1.1. Журнал «Биомедицина» публикует научные работы обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвящённые биологическому, математическому и комплексному моделированию. Особое внимание уделяется вопросам генетической, микробиологической, экологической стандартизации лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами. Принимаются рукописи, касающиеся доклинических и клинических испытаний лекарственных препаратов, выполненных на классических и альтернативных биологических объектах. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых видов животных-моделей, представляющих ценность для биомедицинских исследований в качестве тест-систем, биологических объектов, моделирующих патологические состояния человека, продуцентов вакцин и сывороток клеточных культур, органов и тканей для ксенотрансплантации. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных. Значительное

место отводится статьям по разработке и внедрению новых биомедицинских технологий.

### 1.2. Рубрикация журнала:

- Обзоры;
- Оригинальные статьи;
- Краткие сообщения;
- Практикум;
- Нормативные документы.

В рубрике «Обзоры» публикуются обзоры научной литературы по темам, соответствующим профилю журнала, методологические статьи (максимальный объём рукописи – до 12 стр., максимальное количество ссылок – до 35).

В рубрике «Оригинальные статьи» печатаются труды, отражающие результаты завершённых исследований (до 10 стр., до 25 ссылок).

В «Кратких сообщениях» приводятся завершённые фрагменты работ, представляющие самостоятельный интерес (до 4 стр., до 15 ссылок).

«Практикум» – учебно-методическая рубрика, где помещаются описания используемых в биомедицине методик, новых технологий (до 6 стр., до 10 ссылок).

В рубрике «Нормативные документы» печатаются правила обращения с лабораторными животными, отечественные и международные законодательные акты, регламентирующие использование биомоделей в экспериментах (до 3 стр.).

1.3. Актуальные разделы журнала:  
• Новые биомедицинские технологии;

• Релевантное и альтернативное биомоделирование;

• Методы биомедицинских исследований;

• Лабораторные животные;

• Генетика лабораторных животных;

• Доклинические исследования новых медицинских технологий;

• Клинические исследования новых медицинских технологий;

• Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине;

• Новые регуляторные пептиды;

• Фармаконутриенты и спортивное питание;

• Информационные материалы и нормативные документы.

1.4. Общие требования к оформлению

1.4.1. Статью следует представлять в двух экземплярах с печатной и электронной версией текста, набранной в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12 на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Нумерация страниц – сверху по центру (на первой странице номер не проставляется).

1.4.2. На первой странице следует указать:

• предполагаемый раздел журнала;

• название работы;

• инициалы и фамилии авторов;

• учреждения, в которых была проведена работа;

• город или населённый пункт.

На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов). Латинские на-

звания должны быть выделены *курсивом*.

1.4.3. В конце статьи приводится список цитированной литературы (см. п. 1.4.10 «Литература»), осуществляется его транслитерация (раздел «References», согласно требованиям «Scopus»), проставляются собственноручные подписи всех авторов рукописи. На отдельных листах печатаются реферат и ключевые слова на английском языке; контактная информация – ФИО (полностью) автора, осуществляющего связь с редакцией, учёная степень (при наличии), почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

1.4.4. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу, содержащее разрешение на публикацию в открытой печати (или копию протокола заседания экспертного совета).

1.4.5. Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список литературы». Для работ, предназначенных для рубрики «Краткие сообщения», раздел «Обсуждение результатов» необязателен, а количество литературных ссылок должно быть минимальным. Форма изложения обзорных и теоретических статей – свободная.

1.4.6. Статьи, описывающие исследования, выполненные на экспериментальных животных или альтернативных биологических объектах, в разделе «Материалы и методы» должны содержать следующую информацию: организм, орган, ткань, клеточная культура,

---

микробная культура, субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов.

В тех работах, где были использованы лабораторные животные, следует указать:

- биологический вид;
- пол;
- возраст;
- массу животного;
- генетический статус: инбредные линии, популяции нелинейных животных, гибриды, генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные);
- источник, откуда получены животные;
- микробиологический статус: гнотобиоты, SPF, конвенциональные;
- условия содержания: виварий, изолятор, барьерная система, тип клеток, плотность посадки животных, режим кормления и поения.

#### 1.4.7. Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для расчётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы должны быть пронумерованы и озаглавлены. В тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (табл. 1).

#### 1.4.8. Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке

их упоминания в тексте. Если рисунок или фотография напечатаны на отдельных листах, на обороте должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов, название статьи, номер рисунка, «верх».

Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение.

Требования к иллюстрациям на дисках или компакт-дисках:

- чёрно-белая графика – разрешение не менее 600 точек на дюйм, формат EPS или TIFF;
- полутоновые и цветные изображения – разрешение не менее 300 точек на дюйм, формат EPS или TIFF;
- диаграммы и графики (векторные изображения) представляются в собственном формате программы Adobe Illustrator, FreeHand или CorelDraw или в формате EPS с приложением исходных (табличных) данных, по которым построены графики/диаграммы.

#### 1.4.9. Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более трёх сокращений терминов, с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

#### 1.4.10. Литература

Цитируемая в статье литература приводится общим списком в конце статьи в алфавитном порядке (вначале – на русском, затем – на иностранных языках). Ссылки на цитируемую литературу в тексте статьи отмечаются порядковым номером работы в списке литературы, заключённым в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов при первом упоминании в тексте указываются (если это необходимо) на языке оригинала.

В списке литературы приводятся:

- для книг: фамилии и инициалы всех авторов, название, место издания, название издательства, год издания, цитируемые страницы, либо общее количество страниц в книге (если текст статьи содержит несколько ссылок на данную книгу).

Пример:

**1. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В.** Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. – М.-Воронеж: ИСТОКИ. – 2004. – С. 232.

- для главы (статьи) в книге: фамилии и инициалы авторов главы, название главы, название книги, фамилии и инициалы редакторов, место издания, название издательства, год издания, первая и последняя страницы главы.

Пример:

**2. Авербах М.М., Мороз А.М.** Естественная резистентность к туберкулезу и некоторые вопросы иммуногенетики // В кн.: Иммунология и иммунопатология туберкулеза. – М.: Медицина. – 1976. – С. 106-116.

- для статьи в журнале: фамилии и инициалы авторов, название статьи, наименование журнала, год, том (выпуск), номер, первая и последняя страницы статьи.

Пример:

**3. Каркищенко Н.Н.** Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина. – 2005. – № 1. – С. 5-17.

- для сайта: ссылка на страницу в сети Интернет.

Пример:

<http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout/index.html>.

## 1.5. Корректурa

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другой раздел журнала. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование.

## 1.6. Плата за публикацию и гонорар авторам

За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается. После опубликования статьи авторам высылается бесплатно один экземпляр журнала.

## 1.7. Адрес редакции

- Почтовый адрес: 143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, влад. 1. НЦБМТ ФМБА России, редакция журнала «Биомедицина».

- Электронные адреса:

ФГБУН НЦБМТ ФМБА России – [scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru);

отв. секретарь редакции Станкова Наталия Владимировна – [sinauva@yandex.ru](mailto:sinauva@yandex.ru).

## 1.8. Сроки опубликования работ

Максимальный срок между датами поступления рукописи в редакцию и опубликования в журнале составляет шесть месяцев. Уведомление авторов в случае отклонения статьи при предварительном рассмотрении главным редактором по причине явного несоответствия работы тематике журнала происходит в течение месяца после поступления рукописи в редакцию.

---

## **2. Порядок рецензирования статей, направленных в редакцию рецензируемого издания**

2.1. Все статьи, поступившие в редакцию, проходят независимое рецензирование.

2.2. Рукопись научной статьи, поступившая в редакцию журнала «Биомедицина», рассматривается ответственным секретарём на предмет соответствия профилю журнала, требованиям к оформлению, регистрируется. Отв. секретарь направляет статью на рецензирование одному или, при необходимости, двум рецензентам.

2.3. Для проведения рецензирования рукописей статей в качестве рецензентов могут привлекаться как члены редакционной коллегии журнала «Биомедицина», так и высококвалифицированные учёные и специалисты других организаций и предприятий, обладающие глубокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению (как правило, доктора наук, профессора) и имеющие публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних трёх лет.

2.4. Оплата труда рецензентов, не являющихся членами редколлегии, производится в соответствии с действующими правилами.

2.5. Рецензенты уведомляются о том, что присланные им рукописи являются частной собственностью авторов и относятся к сведениям, не подлежащим разглашению. Рецензентам не разрешается делать копии статей для своих нужд. Рецензирование проводится конфиденциально (одностороннее «слепое»). Нарушение конфиденциальности возможно только в случае заяв-

ления рецензента о недостоверности или фальсификации материалов, изложенных в статье.

2.6. К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в том же учреждении, где выполнена работа.

2.7. Если в рецензии на статью имеется указание на необходимость её исправления, то статья направляется автору на доработку. В этом случае датой поступления в редакцию считается дата возвращения доработанной статьи.

2.8. Статья, направленная автору на доработку, должна быть возвращена в исправленном виде в течение месяца. К переработанной рукописи необходимо приложить письмо от авторов, содержащее ответы на все замечания и поясняющее все изменения, сделанные в статье.

2.9. Если статья по рекомендации рецензента подверглась значительной авторской переработке, она направляется на повторное рецензирование тому же рецензенту, который сделал критические замечания.

2.10. Редакция оставляет за собой право отклонения статей в случае неспособности или нежелания автора учесть пожелания редакции.

2.11. При наличии отрицательных рецензий на рукопись от двух разных рецензентов или одной рецензии на её доработанный вариант статья отвергается без рассмотрения другими членами редколлегии.

2.12. В случае несогласия с мнением рецензента автор статьи имеет право предоставить аргументированный ответ в редакцию журнала. Статья может быть направлена на повторное рецензирование либо на согласование в редакционную коллегию.

2.13. Решение о целесообразности публикации после рецензирования принимается главным редактором, а при необходимости – редколлекгией в целом.

2.14. Ответственный секретарь доводит до сведения автора принятое решение. Максимальный срок рецензирования между датами поступления рукописи в редакцию и вынесения редколлекгией решения составляет два месяца.

2.15. Правила, предъявляемые к рецензиям на научную статью

Задача рецензирования – способствовать строгому отбору авторских рукописей для издания и предлагать конкретные рекомендации по их улучшению. Рецензия должна объективно оценивать научную статью и содержать всесторонний анализ её научных и методических достоинств и недостатков. Рекомендуемый объем рецензий – до 15 тыс. знаков (с пробелами), примерно до 1,5 страниц текста формата А4 кеглем 12.

2.16. Требования к содержанию рецензии на научную статью

Рецензент должен:

- определить соответствие материала, изложенного в статье, профилю журнала;

- оценить актуальность содержания статьи: соответствует ли уровень изложенного в ней материала современным достижениям науки и техники;

- оценить значимость полученных результатов исследований (научных, практических);

- указать, насколько учтены требования к оформлению материала статьи: соответствие объёма статьи, наличие аннотации на русском и английском

языках, наличие списка литературы и ссылок на него в тексте, контактной информации об авторах и др.;

- дать качественную и/или количественную оценку приведённого в статье материала (фактического, иллюстрационного);

- оценить полноту и достоверность приводимых сведений;

- оценить правильность и точность используемых (или вводимых) определений и формулировок;

- дать оценку литературного стиля изложения материала;

- дать обоснованные выводы о статье в целом, замечания, при необходимости – рекомендации по её улучшению.

Комплекс перечисленных вопросов носит общий характер. Каждая конкретная статья требует индивидуального подхода к выбору критериев её оценки.

В заключительной части рецензии по результатам анализа статьи должна быть дана чёткая рекомендация об её публикации в представленном виде, либо о необходимости её доработки или переработки (с конструктивными замечаниями), а может быть, и о нецелесообразности её издания в данном журнале.

2.17. Редакция издания направляет авторам представленных материалов копии рецензий или мотивированный отказ, а также обязуется направлять копии рецензий в Министерство образования и науки РФ при поступлении соответствующего запроса.

2.18. Оригиналы рецензий хранятся в издательстве и редакционной коллегии в течение пяти лет со дня публикации статей.

# Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным **комбикормом для лабораторных животных** научные медицинские и учебные учреждения России.

## Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень;
- ✓ Премиксы.



**НАШИ КОРМА**  
полнорационные,  
сбалансированные по  
аминокислотному составу,  
минералам и витаминам

Доставка в любой регион России

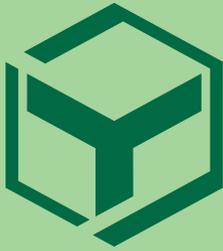
Наш адрес: Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 9 (Виварий)  
ООО "Лабораторкорм"

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 648-42-39;

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

[www.laboratorkorm.ru](http://www.laboratorkorm.ru), e-mail: [info@laboratorkorm.ru](mailto:info@laboratorkorm.ru)

на правах рекламы



## БИОМЕДИЦИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»  
Филиал «Андреевка»

Филиал «Андреевка» образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году.

Постановлением Совета Министров СССР основной задачей Филиала является получение и выращивание лабораторных животных. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируруемыми по генетическим, физиологическим, морфологическим показате-

лям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С Филиалом сотрудничает более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАН, Министерства здравоохранения РФ, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

### Филиал «Андреевка» предлагает следующих животных:

**I. Морские свинки:** альбиносы и пестрые.

**II. Генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крыс;** мыши SHK-самки подвержены раку молочных желез (частота заболевания выше 50%).

**III. Линейные мыши и крысы:**

– мыши линии **DBA** – имеют светло-коричневый окрас шерсти, используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях, для изучения нарушений вестибулярного и слухового аппаратов;

– мыши линии **BALB/C** – белого окраса, альбиносы, используются во всех медико-биологических исследованиях. Высокая частота опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком;

– мыши линии **C57BL/6** – черного окраса. Используются в изучении скелетных аномалий, дефектов развития головы и

глаз. Стандартная линия для поддержания мутаций. Чувствительны к действию канцерогенов, стафилококков, сальмонелл;

– мыши линии **CBA** – серого окраса, используются в радиологии, медико-биологических геронтологических исследованиях, для изучения спонтанных опухолей печени;

– крысы **W1STAR** – белого окраса, альбиносы. Используются для онкологических исследований, для изучения поведенческих реакций.

**IV. Межлинейные гибриды мышей:**

– **F1 CBA x C57BL/6** – шерсть серого окраса;

– **F1 C57BL/6 x DBA** – шерсть черного окраса. Гибриды F1 используются для онкологических и радиационных исследований.



141551, М.О., Солнечногорский р-н, п/о Андреевка, д. 49

Тел.: 8(495)536-09-18; 8(495)536-37-58

Факс: 8(495)536-28-33

E-mail: andreevka-kv@rambler.ru

