

Утверждаю
ГОУ ВПО НижГМА Росздрава
Ректор НГМА

Б.Е.Шахов

Отчет

о выполнении НИР по теме:

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АППАРАТА
СКЭНАР-97.4+ У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС**

договор №3
от 1 февраля 2007

Исполнители

Щербатю Т.Г. - Зав.кафедрой биологии, д.б.н

Цель работы

Изучить биологические эффекты короткоимпульсных низкочастотных электрических сигналов у беременных крыс.

Задачи исследования

1. Сравнить действие различных по частотности электрических импульсов (оптимальное и стресс СКЭНАР-влияние) на общий свободнорадикальный статус организма крыс.
2. Изучить действие различных по частотности электрических импульсов (оптимальное и стресс СКЭНАР-влияние) на поведенческие реакции беременных нелинейных крыс.
3. Сравнить действие различных по частотности электрических импульсов (40имп./мин. и 80имп./мин.) на свободнорадикальное окисление плазмы крови у экспериментальных животных на разных сроках беременности.

Объект исследования

Лабораторные животные 90 животных (80 самок и 10 самцов белых беспородных крыс).

Материалы и методы исследования

Работа проведена на базе кафедры биологии НижГМА в сроки с 1 февраля 2007 по 30 июля 2007г.

Исследования проводились согласно указаниям Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.

Лабораторные животные были разделены на 6 групп по 13 крыс в каждой группе. Группы формировались с учетом определенных сроков беременности и величиной воздействия прибором СКЭНАР, а именно: в 1, 2, 3 группах животных беременность составила 20 дней (предродовая ситуация), в 4, 5, 6 группах - 10 дней (середина срока беременности). Группы 1 и 4 составили контрольные животные, не подвергавшиеся СКЭНАР-воздействию, группы 2 и 5 получали 15-минутное воздействие СКЭНАРом с оптимальной частотой (40 имп. в пачке при постоянном режиме) ежедневно на протяжении 20 и 10 дней соответственно, группы 3 и 6 получали 15-минутное воздействие СКЭНАРом со стрессовой частотой (удвоенная оптимальная частота - 80 имп. в пачке при постоянном режиме) также ежедневно на протяжении 20 и 10 дней соответственно.

Самок подсаживали к самцам в соотношении 3:1, сроком на 2 эстральных цикла. Беременность фиксировали с помощью метода вагинальных мазков. День обнаружения в мазке сперматозоидов принимали за 1-й день беременности. Животные на протяжении всего эксперимента содержались в стандартных условиях вивария.

Воздействие производилось системно, для чего использовалась специально сконструированная клетка, пол которой состоял из металлических электродов, к которым подключался через внешний выход прибор СКЭНАР (модель «СКЭНАР 97.4+», пр-во: ОКБ «Ритм», г. Таганрог). Контрольные животные также выдерживались в клетке с экспозицией в 15 минут, но с выключенным прибором.

Эвтаназию самок осуществляли путем декапитации под эфирным наркозом, после чего плазма крови бралась для проведения биохимических и биофизических исследований.

Методы исследования поведенческих реакций

После ежедневного 15 минутного СКЭНАР-воздействия, оценивалось физиологическое состояние каждого животного, для чего использовался тест «открытого поля». Крыса помещается в камеру на 5 минут. Установка представляет собой большую круглую камеру

диаметром 10 см, ограниченную полосой белой жести высотой 40 см. Пол камеры разделен на квадраты со стороной 20 см (Буреш и др., 1991).

В течение этого времени, в соответствии с рекомендациями некоторых авторов (Буреш и др., 1991, Мутускина и др., 1990) регистрируются следующие элементарные поведенческие акты: локомоция- поступательное перемещение животного в горизонтальной плоскости; сидение на месте; вертикальная активность - вертикальные стойки на задних лапах; груминг (чистка, умывание), дефекация и уринация - как показатели эмоционального состояния крысы (Кулагин, Федоров, 1969).

Биохимические и биофизические методы исследования

1. *Определение суммарной свободнорадикальной активности биологического субстрата методом индуцированной хемилюминесценции.*

Разработанные в настоящее время биохемилюминесцентные (БХЛ) методы позволяют всесторонне оценивать активность радикальных реакций с участием АФК, начиная от стадии зарождения радикалов до образования конечных продуктов окисления. Эти методы высокочувствительны и экономичны. Однако БХЛ методы не являются прямыми количественными методами определения концентрации радикалов, а регистрируют кванты света, образующиеся в реакциях с АФК (Владимиров, Шерстнев и др., 1996).

Методики были выполнены на биохемилюминометре БХЛ-06М (Н. Новгород), сопряженном с компьютером IBM. БХЛ-06 предназначен для регистрации световых потоков, возникающих в биологических образцах в результате протекания ферментативных и химических процессов. БХЛ-06 состоит из:

- кюветного отделения, обеспечивающего размещение анализируемого образца, его термостабилизацию и перемешивание, фотодатчика (ФЭУ), усилителей аналогового и счетного режимов, источника питания ФЭУ;
- измерительного блока, представляющего собой специализированную микро-ЭВМ на базе БИС 580 серии, и обеспечивающего регистрацию интенсивности сигнала и его светосуммы за заданное оператором время, констант нарастания и спада БХЛ сигнала. (Ермолин, Родичев и др., 1990).

Метод индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа ХЛ основан на том, что в представленной системе происходит каталитическое разложение перекиси водорода, ионами металла с переменной валентностью - двухвалентным железом: $ROOH + Fe^{2+} \longrightarrow RO^\circ + OH^- + Fe^{3+}$ (реакция Фентон). Образующиеся свободные радикалы RO° и OH° вступают в реакцию активации СРО в биологическом субстрате, что приводит к образованию неустойчивого тетроксидов, распадающегося с выделением кванта света, регистрируемого на БХЛ-06. На интенсивность процесса свечения оказывает влияние полный комплекс соединений, обладающих как окислительными, так и проокислительными действиями.

Информативными показателями считаются I_{max} - максимальная интенсивность свечения исследуемой пробы, измеряемая в mV. I_{max} отражает свободнорадикальную активность образца. Показатель S - светосумма ХЛ за определенное время, обратно пропорционален антиоксидантной активности (АОА) пробы. АОА - суммарная физико-химическая величина, характеризующая способность данного субстрата тормозить реакции окисления. (Журавлев, 1981). Она зависит от относительного количества и физико-химических параметров каждого из биоантиоксидантов, имеющихся в анализируемой смеси, их взаимного влияния друг на друга, и от присутствия веществ, способных усиливать или ослаблять действие биоантиоксидантов (Кузьмина, Нелюбин и др., 1983)

2. *Определение суммарного ультразвукового свечения плазмы крови методом сонолюминесценции.*

Одним из видов индуцированной биохемилюминесценции является сонолюминесценция, открытая в 1934г. Френцелем и Шульцом.

Параметры, характеризующие особенности ультразвукового свечения жидкостей,

зависят от их физико-химических свойств - поверхностного натяжения, давления насыщающих паров, вязкости, природы и концентрации растворенных в жидкости веществ и т. д. Поэтому оказывается возможным использовать ультразвуковое свечение для изучения процессов, сопровождающихся изменением этих свойств.

При исследовании сыворотки (и плазмы) крови этим способом установлено, что она начинает светиться при более высоких интенсивностях ультразвука, чем вода. Порог возникновения свечения для сыворотки в капле 0.01 Вт/см и интенсивность свечения нарастают с увеличением интенсивности ультразвука гораздо медленнее, чем у воды. Это обусловлено более высокой, чем у воды, вязкостью сыворотки крови (Журавлев, Акопян, 1977).

Чувствительность ультразвукового свечения сыворотки крови при добавлении весьма малых количеств посторонних веществ делает этот метод перспективным для применения в диагностических целях любые изменения в организме, приводят к появлению в крови тех или иных веществ, многие из которых должны менять характер ультразвукового свечения плазмы и сыворотки крови (Цвылев, 1967).

Ультразвуковое свечение плазмы крови является интегральным показателем. Появление при различных патологиях в плазме крови биополимеров (белков, полипептидов, аминокислот, ферментов) с измененной конформацией и биологической активностью служит причиной изменения солюлюминесценции плазмы, поэтому ее исследование солюлюминесцентным методом является высокопродуктивным тестом в диагностике разнообразных заболеваний.

Исследования проводятся на приборе ДИС-1, разработанным в Институте Прикладной Физики Российской Академии Наук (г.Н.Новгород), в котором для усиления свечения использован ультразвук частотой 780 кГц и интенсивностью 0,1 Вт/мм². При индуцировании ультразвуком возникает свечение плазмы, превышающее уровень фона и собственной спонтанной хемилюминесценции в десятки раз, поэтому не требуется специальных мер экранирования и выдержки образцов биологической жидкости в темноте. В процессе озвучивания регистрируется интенсивность свечения сыворотки крови в диапазоне длин волн от 3000 до 7000Å, в режиме счета фотонов.

Определяли суммарное ультразвуковое свечение плазмы крови. Для калибровки брали бидистиллированную воду, выдержанную в контакте с воздухом не менее 1 суток. Калибровка проводилась перед началом и по окончании цикла измерений (Горский, Карев, и др., 1989).

Методы статистической обработки

Полученные данные были обработаны на IBM PC/ AT с помощью пакетов прикладных программ Statistica- 6.0 (Windows 98) и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики.

Результаты представлялись в виде $M \pm t$, где M - среднее арифметическое, t - стандартное отклонение. Достоверность различий средних определяли по t - критерию Стьюдента. Две выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p < 0,05$.

Работа выполнена совместно с кафедрой акушерства и гинекологии ЦПК и ППС.

Результаты исследования

Влияние СКЭНАР на поведенческую активность крыс в тесте «Открытое поле»

В изучении механизмов действия различных агентов важным является изучение их влияния на характеристики поведения животных. Отсутствие вербального контакта с животными ограничивает диапазон возможных тестов. Однако, несмотря на эти ограничения, ряд неврологических тестов могут дать сведения о функциях всех уровней центральной нервной системы. Наиболее распространенным и информативным тестом в определении влияния различного рода на эмоциональное состояния и двигательную активность животных является тест «Открытое поле».

Помещение животного (крысы) в новое окружение ведет к возникновению исследовательского поведения, которому в то же время препятствуют условия, вызывающие страх. Две антагонистические тенденции характеризуются различным временным ходом. По

Материал из электронной библиотеки ЗАО «ОКБ «РИТМ»

этой причине, несмотря на уменьшение страха, активность животного к концу опыта снижается. Лучшим выражением уменьшения страха у животных является исследование ими внутренних секторов, которое постепенно становится более интенсивным от опыта к опыту. Данный тест является достаточным для первичного скрининга, а также является адекватным для выявления возможного отрицательного действия исследуемого воздействия.

Полученные результаты представлены в сводной таблице 1.

Горизонтальная двигательная активность крыс в тесте «Открытое поле»

Крысы помещенные в незнакомую обстановку испытывают страх и неуверенность. Положительный результат имеет место, когда животные проявляют активность и этот показатель увеличивается, что свидетельствует о стимуляции ориентировочно-исследовательского поведения и снижении дистресса.

При изучении СКЭНАР-влияния, за норму был принят уровень характеристик поведения крыс, контрольной группы. Многократные исследования исходного состояния характеристик поведения крыс показали, что горизонтальная двигательная активность крыс при оптимальном СКЭНАР-влиянии и стресс-влиянии остается неизменной на сроке беременности 10 дней. Дальнейшее воздействие СКЭНАРом снизило горизонтальную двигательную активность у крыс со стрессовым воздействием (20й день), по отношению к показателям контрольной группы ($p < 0,05$). Это может свидетельствовать об угасании ориентировочно-исследовательского поведения.

Параметр ориентировочно — исследовательского поведения крыс в тесте «открытое поле» характеризуется рядом величин. Этот вид поведения раскрывают: выход в центр и вертикальные стойки.

Выход в центр

По методике «открытое поле» одной из характеристик ориентировочно — исследовательского поведения крыс является выход в центр, который определяют по количеству пересеченных центральных секторов площади. Попав в незнакомую обстановку, животное испытывает страх: при этом оно старается находиться и передвигаться вдоль стенки или сидит на периферии площадки. После оценки безопасности обстановки крыса может выйти к центральным секторам.

Предварительные исследования исходного состояния крыс показали, что величина выхода в центр крыс в тесте открытое поле оставалась неизменной при любых влияниях на 10-й день беременности и достоверно изменялась при стресс-влиянии на 20-й день ($p < 0,05$), что может говорить о постепенном угнетении ориентировочного рефлекса.

Вертикальные стойки

Анализ ориентировочно — исследовательского поведения крыс в тесте «открытое поле» по показателю «вертикальные стойки» раскрывает мотивационную составляющую характеристики животных. При этом они пытаются войти в непрямой контакт с предметами, расположенными на расстоянии: крысы принимают к предметам, расположенным за пределами открытого поля. Величина показателя «вертикальные стойки» у всей группы крыс, принявших участие в эксперименте, достоверно ($p < 0,05$) повышалась у животных, подвергшихся оптимальному СКЭНАР-влиянию на 10-й день по отношению к контролю и достоверно ($p < 0,05$) снизилась на 20-й день у животных как оптимальной так и стресс-группы, что может говорить о стимуляции исследовательского поведения на ранних сроках беременности при оптимальном СКЭНАР-влиянии и о потере интереса к исследованию окружающего пространства, что можно трактовать как привыкание к процедуре, а также угнетению под влиянием СКЭНАРа мотивации к исследованию окружения.

Груминг

Груминг (косметическое поведение) крыс является важной характеристикой поведения животных в открытом поле. Более того, крысы большую часть времени уделяют вычесыванию своего тела, по сравнению с перемещением в пространстве. Поэтому при исследовании эта характеристика поведения особенно ценна. Предварительные испытания показали, что

косметические движения (груминг) у крыс не изменились по отношению к показателям контрольных групп как на первом, так и на втором временном интервале беременности. Очевидно, это связано с тем, что даже долговременное СКЭНАР-воздействие не приводит к возникновению устойчивых нарушений в поведенческой сфере и развития тревожных состояний.

Дефекация и уринация

Уровень эмоционального состояния крыс оценивается по количеству дефекаций и уринаций. Сравнение данных показателей по группам не выявило достоверных отличий, что свидетельствует о стабильном эмоциональном фоне подопытных животных на протяжении всего эксперимента и, следовательно, отсутствии ярко выраженного угнетающего или возбуждающего эффекта на центральную нервную систему при различных СКЭНАР-воздействиях.

Влияние СКЭНАР на свободнорадикальный статус организма крыс

Диагностическая роль сверхслабого свечения определяется возможностью оценить по интенсивности свечения уровень свободнорадикального окисления и по отклонению его от нормы судить о наличии и выраженности патологического процесса (Журавлев, Журавлева, 1975), Метод регистрации хемилюминесценции в настоящее время нашел широкое применение в медико-биологических исследованиях.

При сопоставлении показателей хемилюминесценции плазмы крови в опытных группах животных со сроками беременности 10 дней, по сравнению с контрольной, достоверных изменений обнаружено не было. Интенсивность свечения незначительно уменьшилась на 2,4 % в группе, подвергавшейся воздействию 40 имп./мин низкочастотных электрических импульсов. В группе, подвергавшейся воздействию 80 имп./мин, интенсивность свечения снизилась на 0,9 %. (рис.1)

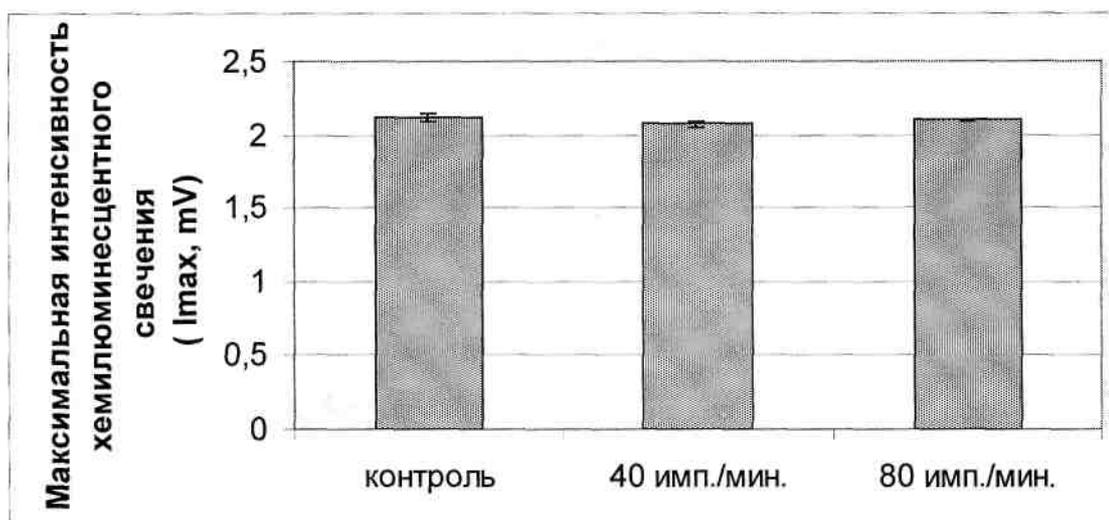


Рис.1 Интенсивность хемилюминесцентного свечения плазмы крови животных со сроком беременности 10 дней.

Уровень антиоксидантной активности повысился на 4,3 % в группе с воздействием 40 имп./мин. В группе после воздействия в 80 имп./мин антиоксидантная активность стала выше на 4,1 % (рис.2).

Показатели интенсивности хемилюминесценции и антиоксидантной активности контрольных и опытных групп со сроком беременности 10 дней, подвергнувшихся действию 40 имп./мин и 80 имп./мин., достоверно не отличаются.

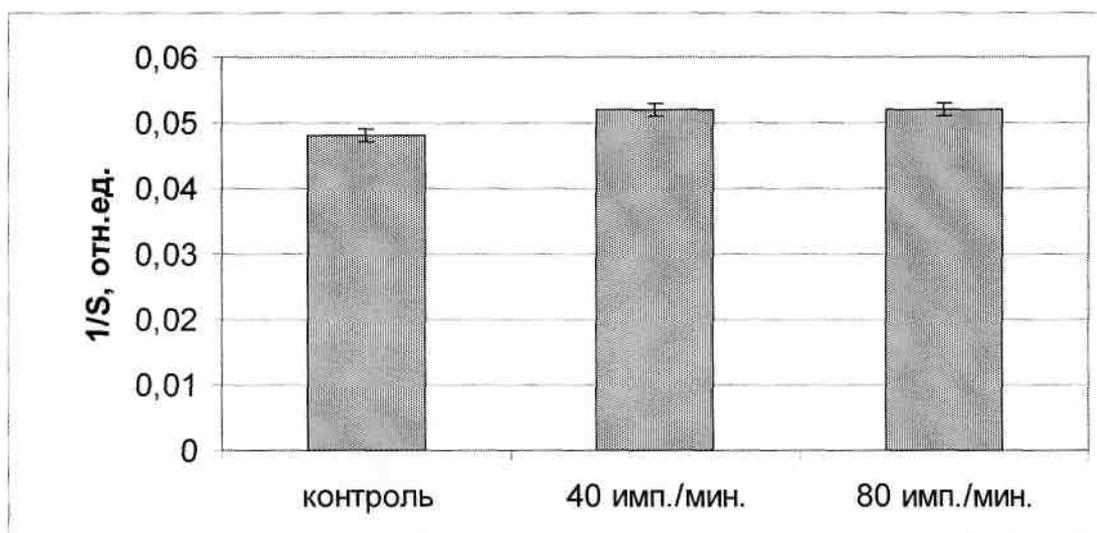


Рис.2 Антиоксидантная активность плазмы крови животных со сроком беременности 10 дней.

Показатели хемилюминесценции плазмы крови в опытных группах со сроками беременности 20 дней, по сравнению с контрольной, не имеют достоверных отличий между группами, подвергавшимися воздействию низкочастотных электрических импульсов 40 имп/мин., и ниже на 4,6% в группе, подвергавшейся 80 имп/мин воздействию (рис.3).

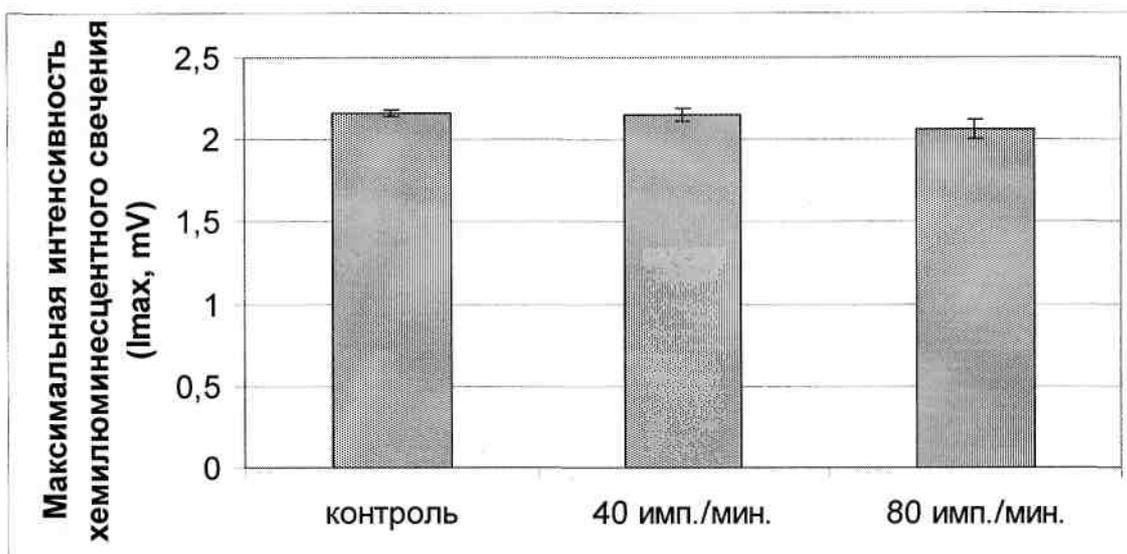


Рис.3 Интенсивность хемилюминесценции плазмы крови животных со сроком беременности 20 дней.

Уровень АОА не изменился в группе с воздействием 40 имп/мин и повысился на 4,8% в группе с воздействием 80имп./мин (рис.4).

Таким образом, воздействие низкочастотных электрических импульсов не влияет на интенсивность свободнорадикального окисления у крыс со сроками беременности 10 дней (середина беременности) и 20 дней (предродовая ситуация).

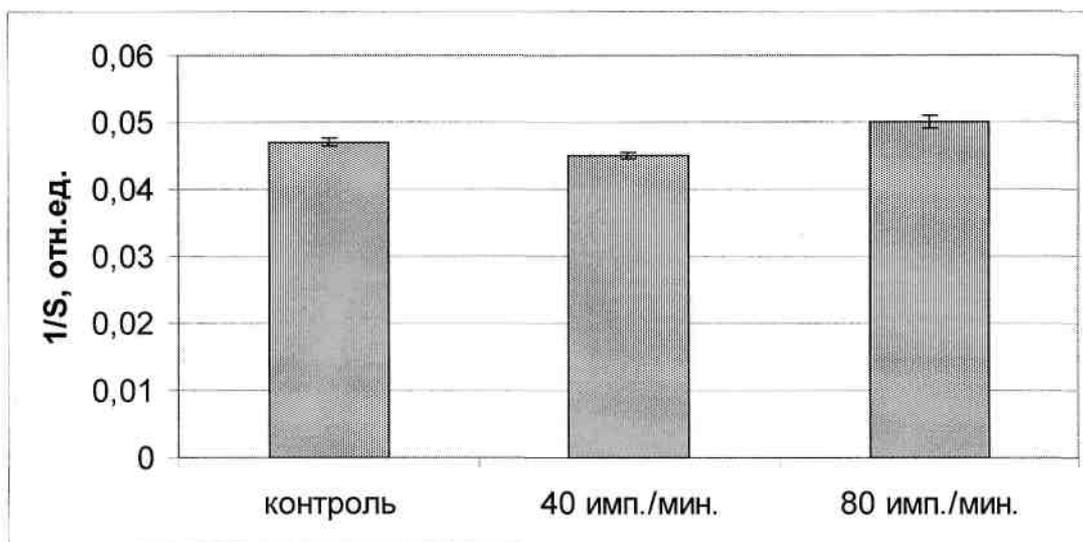


Рис.4 Антиоксидантная активность плазмы крови животных со сроком беременности 20 дней.

Одним из видов индуцированной биохемилюминесценции, наряду с хемилюминесценцией, является сонолюминесценция - свечение, возникающее под действием ультразвука (Журавлев, 1983). Исследование сонолюминесценции проводится в настоящее время с целью разработки дополнительного метода диагностики патологических процессов. В связи с этим представляет интерес сравнить метод сонолюминесценции с хемилюминесцентным, проследить динамику изменения свечения на различных сроках беременности при СКЭНАР-воздействиях различной интенсивности.

Полученные нами результаты суммированы в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Показатели индуцированной хемилюминесценции (2 срока беременности) белых нелинейных крыс при различных интенсивностях СКЭНАР-воздействия ($M \pm \sigma$).

Группы животных	I _{max}		S	
	10 дней	20 дней	10 дней	20 дней
Контроль (n=12)	2,12±0,03	2,16±0,02	20,05±0,35	21,25±0,31
СКЭНАР_оптима (n=12)	2,07±0,02	2,15±0,04	19,18±0,44	21,89±0,25
СКЭНАР_стресс (n=12)	2,10±0,01	2,06±0,06	19,22±0,38	20,22±0,54

Примечания: I_{max}- максимальная интенсивность хемилюминесценции,

S- светосумма хемилюминесценции,

• -p<0,05 по t- критерию Стьюдента по отношению к группе контроля

Показатели спонтанной сонолюминесценции плазмы крови белых нелинейных крыс при различных интенсивностях СКЭНАР-воздействия на двух сроках беременности

Группы животных	Интенсивность сонолюминесценции (отн.ед.)	
	10 дней	20 дней
Контроль (n=12)	195±15	253±18
СКЭНАР_оптима (n=12)	238±27	283±29
СКЭНАР_стресс (n=12)	261±33	303±41

Примечания: • -p < 0,05 по t- критерию Стьюдента по отношению к группе контроля

Как видно из таблицы 2 показатели свободнорадикальной активности достоверно не отличались ($p > 0,05$) по всем трем группам как на сроке 10 дней беременности, так и на сроке 20 дней. Та же самая картина наблюдалась при сравнении показателей антиоксидантной активности внутри групп на 2-х сроках беременности, что является вполне обоснованным, учитывая четкую взаимосвязь этих двух показателей.

Интенсивность спонтанной сонолюминесценции также достоверно не отличалась в опытных группах по сравнению с контрольными, как в середине срока беременности (10 дней), так и непосредственно перед её окончанием (20 дней).

Таким образом, регулярное систематическое воздействие низкочастотными электрическими импульсами не оказывает повреждающего влияния на организм самок белых беспородных крыс в эксперименте на протяжении всего срока нормального протекания беременности.

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие **выводы**:

1. Продолжительное стресс-влияние аппаратом СКЭНАР на беременных нелинейных крыс приводит к снижению двигательной активности и исследовательского поведения животных на поздних сроках беременности.

2. Оптимальное СКЭНАР-воздействие оказывает стимулирующее влияние на мотивационное поведение крыс во время первой половины беременности (10 дней).

3. Оптимальное и стрессовое влияние короткоимпульсных низкочастотных электрических сигналов (40 имп./мин. и 80 имп./мин) не изменяет уровень свободнорадикального окисления плазмы крови экспериментальных животных в условиях нормального протекания беременности.

Показатели поведенческой активности белых нелинейных крыс на двух сроках беременности при различных интенсивностях СКЭНАР- воздействия.

Показатели	Группы животных					
	Контроль (n=12)	СКЭНАР_ оптима (n=12)	СКЭНАР_ стресс (n=12)	Контроль (n=12)	СКЭНАР_ оптима (n=12)	СКЭНАР_ стресс (n=12)
	10 дней			20 дней		
Горизонтальная активность	28±10	23±12	20±6	30±7	23±5	15±6•
Количество выходов в центральную зону	9,2±3,5	6,2±1,8	5,4±2,0	10,0±2,7	7,2±3,4	4,2±2,6•
Вертикальная активность	7,8±1,1	12,2±2,5•	9,8±1,9	8,5±1,3	6,0±0,9•	5,7±0,6•
Груминг	6,6 ±2,2	5,8 ± 1,7	4,4±2,4	8,2±1,7	6,8±1,9	5,5±2,1
Дефекация	3,0±0,4	2,9±0,2	2,8±0,5	3,3±0,8	3,1±0,2	3,1±0,6
Уринация	0,8±0,2	0,7±0,3	0,7±0,1	0,7±0,2	0,8±0,3	0,8±0,4

Примечания: • -p<0,05 по t- критерию Стьюдента по отношению к группе контроля

Список литературы

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения (пер. с англ.) - М., 1991.
2. Горский СМ., Карев И.Д., и др. Ультразвуковое свечение плазмы крови и диагностика рака. // Акустический журнал. - 1989. - Т.35, вып.2. - С.364-365.
3. Ермолин СВ., Родичев Б.С. и др. Устройство для контроля биохемилюминесценции, БХЛ-06. // Тезисы докл. III Всесоюзное совещание по хемилюминесценции. - Рига, 1990. - С. 128.
4. Жадное В.З., Мишанов Р.Ф. и др. Опыт применения сонолюминесценции плазмы крови во фтизиопульмонологии // Нижегородский медицинский журнал. - 2001. - №1. - С. 66-68.
5. Кузьмина Е.И., Нелюбим А.С, Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. // Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. - Горький, 1983. - С. 179-183.
6. Кулагин В.А., Федоров В.К. Исследование эмоциональности у крыс линий Вистар и Крушинского-Молодкиной методом «открытого поля». Генетика поведения (под ред Федорова В.К.). - Л., Наука, 1969. - С.35-41.
7. Мутускина Е.А., Незлина Н. И., Куликов М. А., Гурвич А. М. Показатели поведения крыс в открытом поле и характеристики выживания и восстановления функций ЦНС после остановки кровообращения. // Журнал Внд. - 1990- вып.5, том 40, - С.988-990.
8. Цвылев О.П. Закономерности псевдокавитационного свечения низких интенсивностей ультразвука // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. - 1967. - №5. - С.442-449.