Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Минздрав России)
Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦИИ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГРУППА 21. НОРМЫ И ПРАВИЛА НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОРАЖЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ ВЕЩЕСТВАМИ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.10-19

Москва
2019

Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Минздрав России)

Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦИИ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГРУППА 21. НОРМЫ И ПРАВИЛА НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОРАЖЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ ВЕЩЕСТВАМИ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.10-19

Москва
2019

Предисловие

1. Разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России).

Директор – д.м.н. М.Б. Иванов;

заместитель директора по научной работе – д.м.н. доцент В.Л. Рейнюк.

2. Исполнители:

заведующий лабораторией д.м.н. В.А. Кашуро;
заведующий лабораторией д.б.н. Е.Д. Бажанова;
заведующий лабораторией к.м.н. Н.В. Лапина;
заведующий лабораторией к.х.н. Н.Б. Иваненко;
главный научный сотрудник д.м.н. профессор Е.Б. Шустов;
ведущий научный сотрудник д.м.н. профессор А.И. Головко;
ведущий научный сотрудник д.м.н. профессор В.К. Козлов;
ведущий научный сотрудник д.м.н. Б.С. Литвинцев;
ведущий научный сотрудник к.б.н. Е.Г. Батоцыренова;
ведущий научный сотрудник к.м.н. Д.В. Горбунов;
ведущий научный сотрудник к.х.н. Е.П. Подольская,
ведущий научный сотрудник к.м.н. С.В. Степанов;
старший научный сотрудник к.б.н. Е.А. Золотоверхая;
старший научный сотрудник к.б.н. Д.С. Лисицкий.

3. В настоящем документе реализованы требования следующих федеральных законов:

– от 21 декабря 1994 г. № 68-ФЗ «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера»;

– от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

– от 14 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»;

– от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

4. Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством «7» мая 2019 г.

5. Введены впервые.

Содержание

Предисловие 2
Введение 4
1 Область применения..... 7
2 Нормативные ссылки 8
3 Обозначения и сокращения..... 10
4 Основные положения 11
4.1 Краткая характеристика нейротоксикантов..... 11
4.2 Патогенез формирования поражений ЦНС при хронических отравлениях нейротоксикантами..... 11
4.3 Общие подходы к экспериментальному моделированию поражений ЦНС при хронических воздействиях нейротоксикантами..... 17
4.3.1. Экспериментальные животные 18
4.3.2 Алгоритм моделирования хронической интоксикации и подходы к оценке поражений ЦНС..... 19
4.4 Методы оценки поражений ЦНС после хронической нейроинтоксикации..... 23
4.4.1 Методы оценки нейрофизиологических функций..... 24
4.4.2 Биохимические и молекулярно-генетические маркеры нейротоксичности..... 27
4.4.3 Морфологическая картина хронического поражения ЦНС нейротоксикантами..... 35
4.5 Возможные направления фармакологической коррекции поражений ЦНС при хроническом воздействии нейротоксикантами..... 40
Библиография 52
Приложение А. Методика измерения массовой концентрации ртути в пробах крови атомно-абсорбционным методом..... 61
Приложение Б. Методика определение жирных кислот и белкового состава в биологических образцах..... 76
Приложение В. Методика оценки эффективности средств и методов профилактики последствий хронических нейроинтоксикаций 85
Приложение Г. Методы окраски гистологических препаратов для рутинной оценки среза и для выявления хронического поражения ЦНС нейротоксикантами..... 88
Приложение Д. Оценка уровня экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)..... 92
Приложение Е. Основные методы оценки нейрофизиологических функций лабораторных животных..... 97
Приложение Ж. Дополнительные методы оценки нейрофизиологических функций лабораторных животных..... 105

Введение

В настоящее время проблема хронических отравлений актуальна, так как при современных производственных условиях острые интоксикации, обусловленные воздействием высоких концентраций, встречаются только при аварийных ситуациях и несоблюдении правил техники безопасности. Хронические интоксикации развиваются при длительных контактах токсических веществ с организмом.

Перечень веществ, действие которых приводит к хроническому нейротоксическому процессу в головном мозге, достаточно большой. К наиболее распространенным относятся:

– органические растворители (бензол, ацетон, алкоголь и др.);
– наркотики (героин, кокаин, амфетамин и др.);
– промышленные химикаты и яды (пестициды, синильная кислота и др.);
– некоторые лекарственные препараты;
– токсиканты, находящиеся в окружающей среде (ртуть, свинец, угарный газ и т. д.).

Хронические отравления характеризуются:

– материальной кумуляцией, т.е. постепенным нарастанием функциональных и органических нарушений, обусловленных накоплением яда в организме;
– функциональной кумуляцией, т.е. суммацией вызываемых изменений.

Хронические отравления нейротоксикантами подразделяются на бытовые и профессиональные.

В структуре бытовых отравлений преобладают хронические интоксикации психоактивными веществами – алкоголем, его суррогатами и наркотиками.

По данным Минздрава России (2014 год) более 3 миллионов населения Российской Федерации страдают от алкогольной зависимости; на 2,5 миллиона российских граждан приходится 100 тыс. алкоголиков; на каждую 1000 подростков приходится более 25 детей, страдающих от алкоголизма; 76% взрослого населения

Российской Федерации употребляет спиртные напитки каждый день. Число наркоманов, состоящих на медицинском учёте, составило в 2008 г. около 550 тыс., в 2013 г. – 630 тыс., в 2015 г. – 700 тыс., в 2017 г. – 800 тыс. Алкоголизм и хроническая интоксикация наркотическими веществами приводит к формированию различных неврологических и соматических осложнений, которые включают самые разнообразные и прогрессирующие расстройства.

Анализ профессиональной заболеваемости показывает, что несмотря на небольшой удельный вес химической патологии в структуре профессиональных заболеваний токсические поражения головного мозга представляют собой серьезную медико-социальную проблему, поскольку диагностика их сложна, лечение дорогостоящее, а последствия плохо прогнозируемы.

Поражения нервной системы после перенесенных хронических профессиональных отравлений разнообразны и характеризуются различной симптоматикой в зависимости от локализации процесса, нейротропности токсиканта и чувствительности определенных отделов нервной системы к воздействию конкретного нейротоксического яда, индивидуальной чувствительности пострадавшего, наличия других заболеваний и травм.

Представленные в литературе описания клинических форм астенического синдрома и синдрома органического поражения мозга можно считать феноменологической оценкой состояний, развивающихся на фоне хронических отравлений нейротоксикантами. Подобная оценка кроме самостоятельной ценности позволяет разрабатывать направления фармакологической коррекции поражений ЦНС в условиях хронического воздействия нейротоксикантами [1].

На этом фоне значительно больше внимания следует уделить вопросу экспериментального моделирования поражений ЦНС при хронических отравлениях нейротоксикантами. Анализ состояния проблемы свидетельствует, что необходимо экспериментальное

нейротропными ядами с последующим определением направлений профилактики и лечения выявляемых нарушений.

В данных методических рекомендациях рассматриваются экспериментальные модели поражений ЦНС веществами нейротоксического действия, а также подходы к оценке нейротоксического действия, основанные на оценке биохимических, морфологических и физиологических показателей.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель руководителя
Федерального медико-биологического
агентства

_____ В.В. Романов
«__7__» ____мая____ 2019 г.

СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦИИ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГРУППА 21. НОРМЫ И ПРАВИЛА НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОРАЖЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ ВЕЩЕСТВАМИ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.10-19

1. Область применения

Методические рекомендации распространяются на экспериментальное моделирование поражений центральной нервной системы при хроническом отравлении веществами нейротоксического действия.

Документ устанавливает общие подходы к экспериментальному моделированию поражений центральной нервной системы при хронических воздействиях нейротоксикантами.

Документ предназначен для токсикологов, фармакологов, неврологов, психиатров и других специалистов, интересующихся вопросами нейротоксикологии, нейрофизиологии и совершенствованием подходов к лечению хронических отравлений, сопровождающихся нарушением функций центральной нервной системы. Методические рекомендации могут быть использованы для подготовки кадров высшей квалификации (аспирантура) по направлениям 30.06.01 «Фундаментальная медицина» и 31.06.01 «Клиническая медицина».

2. Нормативные ссылки

Настоящий документ разработан на основании рекомендаций и требований следующих нормативных правовых актов и нормативных документов:

– Федерального закона от 21 декабря 1994 г. № 68-ФЗ «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера»;

– Федерального закона от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

– Федерального закона от 14 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»;

– Федерального закона от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»;

– Постановления Правительства Российской Федерации от 30.06.1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации»;

– Распоряжения Правительства Российской Федерации от 23.10.2017 г. № 2323-р об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств на 2018 год»;

– Приказа Минздрава России от 8 января 2002 г. № 9 «О мерах по совершенствованию организации токсикологической помощи населению Российской Федерации»;

– Приказа Минздрава России от 13 ноября 2012 г. № 911н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи при острых и хронических профессиональных заболеваниях»;

– Приказа Минздрава России от 24 декабря 2012 года №1449 н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при органических психотических расстройствах».

– МР ФМБА России 12.45-15 «Клиническая, лабораторная, химико-токсикологическая диагностика и лечение отравлений веществами депримирующего действия, способными вызывать массовые отравления»

П р и м е ч а н и е. При пользовании настоящим документом целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться заменяющим (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3. Обозначения и сокращения

АД – артериальное давление;
АФК – активные формы кислорода;
ГЭБ – гемато-энцефалический барьер;
ДНК – дезоксирибонукленовая кислота;
Ккум – коэффициент кумуляции;
МАЦ – мезаккумбулярная система;
НПВ – наркотические и психотропные вещества;
ПОЛ – перекисное окисление липидов;
ПАВ – психо-активное вещество;
ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт;
РНК – рибонуклеиновая кислота;
УРПИ – условная реакция пассивного избегания;
УРАИ – условная реакция активного избегания;
ЦНС – центральная нервная система;
ЧСС – частота сердечных сокращений;
BDNF – нейротрофический фактор головного мозга;
GFAP – глиальный фибриллярный кислый протеин;
GST – глутатионтрансфераза;
MBP – основной белок миелина;
PEDF – пигментный фактор эпителиального происхождения.

4. Основные положения

4.1. Краткая характеристика нейротоксикантов

К нейротоксикантам следует относить вещества, для которых порог чувствительности структурных компонентов нервной системы к их воздействию существенно ниже, чем других органов и систем, и в основе интоксикации которыми лежат нарушения моторных и сенсорных функций нервной системы, а также высшей нервной деятельности: памяти, мышления, эмоций и поведения [2].

Развивающийся при отравлении подобными токсикантами патологический процесс является следствием воздействия токсиканта на возбудимые мембраны, механизмы передачи нервного импульса в синапсах, пластический и/или энергетический обмен в нервной ткани.

Интоксикация нейротоксикантами проявляется в форме нарушений моторных, сенсорных функций, эмоционального статуса, интегративных функций мозга, таких как память и обучение. Часто нарушаются зрение, слух, тактильная и болевая чувствительность, страдают и другие функции нервной системы. Сенсомоторные нарушения приводят к появлению мышечной слабости, парезов и параличей. Повреждение механизмов регуляции функций жизненно важных органов и систем (дыхательной, сердечно-сосудистой, выделительной и других) порой заканчивается гибелью отравленных.

4.2. Патогенез формирования поражений ЦНС при хронических отравлениях нейротоксикантами

Механизмы нейротоксического действия подвержены общим закономерностям: угнетение активности ферментов за счет блокады сульфгидрильных, карбоксильных, NH_2- и иных групп; формирование оксидативного стресса с последующей активацией процессов ПОЛ; угнетение митохондрий; нарушение гомеостаза кальция и т.д. Нейротоксиканты способны инициировать изменения практически во всех структурно-метаболических комплексах нейронов и глии:

- структурно-метаболическом комплексе эндоплазматического

ретикулума, связанном с метаболизмом ксенобиотиков, обменом кальция, гормонов, белков и пр.;

- структурно-метаболическом комплексе, связанном с процессами синтеза белка;

- митохондриальном структурно-метаболическом комплексе, связанном с процессами биоэнергетики;

- лизосомальном структурно-метаболическом комплексе, связанном с процессами катаболизма.

Кроме того, наблюдаются отклонения функции нейромедиаторных систем, генома, систем антирадикальной и антиперекисной защиты и иные изменения в нервных клетках [3]. Отмечены изменения микроциркуляции, связанные со способность токсиканта ингибировать многие ферменты эндотелия и стенки сосудов: Na^+/K^+-АТФ-азы, Ca^{2+}-АТФ-азы, NO-синтазы и др. [4]. Суммарный эффект перечисленных механизмов, по-видимому, и составляет основу нейротоксичности [5].

Механизмы нейродегенерации при хронических интоксикациях в основном соответствуют таковым для психостимуляторов и антихолинэстеразных веществ [6-9]. В этот список обычно включают:

1. оксидативный стресс;

2. подавление функции митохондрий;

3. эксайтотоксичность, т.е. нейрохимические сдвиги, обусловленные усилением экзоцитоза глутамата, нарушением его обратного захвата, активацией трансдукторных механизмов глутаматергических нейромедиаторных систем, в первую очередь – повышением концентрации внутриклеточного кальция, изменением рецепторного уровня глутаматергической нейротрансмиссии;

4. нейровоспаление (neuroinflammation), т.е. развитие воспалительных процессов в нервной ткани при воздействиях нейротоксикантами, связанное с усилением экспрессии провоспалительных цитокинов в микроглии и астроцитах;

5. усиление проницаемости гематоэнцефалического барьера;

6. угнетение процессов нейрогенеза и глиогенеза, т.е. подавление пролиферации и дифференциации новых нейронов и

глиоцитов;

7. усиление процессов апоптоза клеток центральной и периферической нервной системы.

Для психостимуляторов (кокаин, амфетамин, метамфетамин, синтетические катиноны и др.), кроме того, актуальными являются нарушения метаболизма биогенных аминов (норадреналин, дофамин, серотонин) [6, 9], а для антихолинэстеразных средств – активация холинергических нейромедиаторных систем (холинергическая эксайтотоксичность) [7].

Оксидативный стресс при хронических воздействиях выражается в накоплении активных форм кислорода (АФК), перекисных радикалов, гидроперекисей. Это сопровождается повреждением липидов мембран, белков, нуклеиновых кислот головного мозга. Так, препараты ртути и ее производные оказывают двоякое влияние на систему антирадикальной и антиперекисной защиты: они усиливают накопление радикалов и угнетают их нейтрализацию [10-12]. Таких исследований выполнено достаточно много. Индийские специалисты инициировали хроническую интоксикацию хлоридом метилртути у крыс-самцов (ежедневно в дозе 1 мг/кг, внутрибрюшинно) на протяжении 7 дней. На 8-й день в тканях больших полушарий, мозжечка и ствола мозга выявлено статистически значимое нарастание процессов ПОЛ. Напротив, содержание ДНК, РНК и общего белка достоверно понижалось. На этом фоне когнитивные и моторные функции животных ухудшались (в тестах с У-образным лабиринтом и ротародом). Важным механизмом нейродегенеративного действия метилртути является оксидативный стресс [13]. Накопление АФК в мозжечке мышей и крыс наблюдалось через неделю после однократной внутрибрюшинной инъекции метилртути мышам (1 мг/кг) и крысам (5 мг/кг) [14]. Похожие данные о способности метилртути вызывать оксидативный стресс у грызунов после внутрибрюшинного введения представлены в других работах [15, 16]. Усиление процессов ПОЛ в астроцитах под влиянием ртути показано также в опытах in vitro [17].

Одним из механизмов формирования оксидативного стресса

при хронических отравлениях нейротоксикантами считается ингибирование селен-содержащих ферментов, в том числе глутатионпероксидазы и тиоредоксинредуктазы, считающихся важными компонентами в системе антиоксидантной и антиперекисной защиты нейронов [18, 10, 19, 11]. Считается также, что глутатионпероксидаза угнетается даже раньше по сравнению с тиолсодержащими ферментами по причине более высокого аффинитета Hg к селеновой группе [18, 11].

Дисфункция митохондрий также рассматривается как один из факторов развития нейродегенерации при хронических нейроинтоксикациях [10, 20] Предшествуют ли этому состоянию такие явления, как опустошение запасов глутатиона и других антиоксидантов (N-ацетил-L-цистеина, альфа-липоевой кислоты, тиоредоксинов, глутаредоксинов и т.д.), активация ПОЛ, нарушения обмена кальция, или перечисленные события развиваются параллельно – не ясно [10, 20]. Однако известно, что при хронических интоксикациях метилртутью отмечено накопление яда в митохондриях. Ртуть ингибирует ряд ферментов дыхательной цепи, способствуя снижению запасов макроэргов. Ртуть также нарушает буферные функции митохондрий относительно обмена Ca^{2+} [3].

Эксайтотоксичность, под которой понимают избыточную активность глутаматергической нейротрансмиссии, рассматривается как один из факторов нейротоксического действия [21, 11]. Глутаминовая кислота является основным возбуждающим нейромедиатором в ЦНС млекопитающих. Доказано ее участие в процессах развития, обучения, памяти, где она играет ключевую роль [22]. Однако при высоких концентрациях аминокислоты в синаптической щели проявляются ее токсические свойства. В таких условиях развиваются повреждения нейронов и их гибель [11]. Для реализации эксайтотоксичности особое значение имеет активация N-метил-D-аспартатных рецепторов (NMDA-рецепторов), сопровождающаяся усилением входа Na^+ и Ca^{2+} в нейроны [23, 24]. Кальций опосредует нейротоксическое действие глутамата посредством прямого повреждения органелл нейрона, в том числе

митохондрий, а также инициирует оксидативный стресс [11, 25]. Важным механизмом ослабления эксайтотоксичности глутамата является обратный захват аминокислоты астроцитами [26, 27].

Нейротоксиканты влияют на процессы накопления глутамата в синаптических пузырьках пресинаптических окончаний, на высвобождение (экзоцитоз) аминокислоты в синаптическую щель, на процессы обратного захвата (реаптейк) нейронами и астроцитами.

Так, метилртуть тормозила накопление 3Н-глутамата в синаптических пузырьках из мозга крыс. Причиной наблюдаемого эффекта являлось торможение активности АТФ-азы, обеспечивающей энергозависимый процесс перемещения аминокислоты в пресинаптические пузырьки [28].

Усиление экзоцитоза глутамата ртутью продемонстрировано как в опытах in vitro, так и in vivo. Например, в культуре гранулярных клеток мозжечка мышей сулема достоверно повышала высвобождение эндогенной аминокислоты в инкубационную среду [29]. С помощью метода микродиализа на свободно передвигающихся крысах показано усиление экзоцитоза глутамата во фронтальной коре при подведении метилртути к изучаемой структуре [30].

Развитие эксайтотоксичности при хронических отравлениях определяется способностью угнетать активность ферментов, повреждать биологические мембраны, тормозить синтез белков и пр. При этом инициация процессов эксайтотоксичности происходит параллельно с формированием иных патологических состояний: оксидативным стрессом, угнетением митохондрий, избыточным поступлением кальция в нервные клетки, апоптозом и т.д. [3; 10].

Ключевым моментом в формировании эксайтотоксичности является повышенная активность NMDA-рецепторов. Поэтому неконкурентные NMDA-антагонисты (ингибиторы каналов) могут рассматриваться как перспективная группа при лечении проявлений нейротоксичности [31].

Нейротоксиканты способны активировать процессы апоптоза нервных клеток [32-34]. Апоптоз, как известно, наряду с

некрозом является вариантом клеточной гибели [35]. Некроз сопровождается набуханием клетки, органелл. После разрывов плазматической мембраны содержимое клетки поступает во внеклеточное пространство. В дальнейшем развивается воспалительная реакция. В последующем тельца поглощаются макрофагами и окружающими клетками [32-36].

Процесс апоптотической гибели клетки включает несколько этапов [36]:

– индукция, т.е. запуск программы апоптоза;

– активация проапоптотических белков;

– активация каскада каспаз, или каспазного каскада, что приводит к разрушению белка-мишени;

– разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка;

– фрагментация клетки на апоптотические тельца;

– подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками.

Выделяют внешний (рецепторный) и внутриклеточный механизмы инициации апоптоза. Внешний механизм включает взаимодействие проапоптотических сигнальных молекул с рецепторами плазматической мембраны («рецепторами смерти»). Происходит активация каскада каспаз в цитозоле. При реализации внутриклеточных механизмов апоптоза каспазы активируются в цитозоле высвобождающимися из органелл (митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы) проапоптотическими белками. Возможен также вариант запуска экспрессии генов проапоптотических белков (Bax, Noxa, Puma), также участвующих в реализации программы апоптоза [36].

Механизмы программируемой гибели нейронов и глиоцитов по типу апоптоза при хронических отравлениях нейротоксикантами изучены недостаточно. Известно, что чувствительность к данному процессу выше у нейронов. Вероятно что, инициация апоптоза происходит на фоне повреждения митохондрий и развития оксидативного стресса.

Важную роль играет подавление активности компонента

антиоксидантной системы «тиоредоксинредуктаза – тиоредоксин» [37].

Все же следует признать, что окончательные представления о механизмах апоптоза в центральной нервной системе и вкладе данного процесса в формирование нейротоксического действия пока недостаточны.

Повышение проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) при нейроинтоксикациях установлено как в экспериментах на животных, так и выявлено у людей [38-40]. Однако до настоящего времени не ясно, способны ли нейротоксиканы при хроническом отравлении модулировать основные звенья ГЭБ: эндотелий и базальную мембрану капилляров, окружающую их астроцитарную муфту, перициты (малодифференцированные клетки соединительной ткани, способные трансформироваться в фибробласты, гладкомышечные клетки или в макрофаги; их значение состоит в регуляции эндотелия капилляров, базальной мембраны и пр.), белки плотных контактов (прежде всего белки семейств клаудинов и окклюдинов), адгезивные молекулы (интегрины, иммуноглобулины, селектины). Непонятно также, является ли повреждение ГЭБ самостоятельным процессом нейротоксичности, или оно определяется другими факторами, например, оксидативным стрессом.

4.3. Общие подходы к экспериментальному моделированию поражений ЦНС при хронических воздействиях нейротоксикантами

До начала проведения исследования испытательной лабораторией должна быть проанализирована вся доступная информация по исследуемому веществу, чтобы сфокусировать план исследования на более успешное тестирование возможной хронической токсичности и минимизировать использование животных. Данные, которые будут содействовать проведению исследования, включают: идентификацию, химическую структуру и физико-химические свойства исследуемого вещества; любую информацию о механизме действия; результаты любых in vitro

и in vivo исследований токсичности; предполагаемое использование и вероятное воздействие на человеческий организм; доступные данные испытаний и токсические свойства структурно родственных веществ; имеющиеся токсикокинетические данные (однократная доза, а также кинетика повторной дозы, при наличии) и данные, полученные из других исследований повторного воздействия. Изучение хронической токсичности может быть проведено после получения первоначальных данных по изучению токсичности повторной дозы в течение 28 и/или 90 дней. Поэтапный подход к исследованию хронической токсичности следует рассматривать как часть общей оценки возможного неблагоприятного воздействия вещества на здоровье человека.

4.3.1. Экспериментальные животные

Моделирование выполняют на белых крысах-самцах массой 180-220 г.

Выбор животных для моделирования определяется следующими обстоятельствами: крысы являются стандартным объектом в биологических исследованиях; этот вид животных используется для изучения физиологии высшей нервной деятельности, а также в фармакологии для изучения психофармакологических препаратов и в токсикологии для моделирования нейротоксических эффектов.

Карантин. Перед проведением эксперимента животные находятся под наблюдением (в карантине). Длительность карантина (акклиматизационного периода) для животных составляет 14 дней. В течение карантина проводят ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдают в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования проводят неврологическое тестирование животных и оценку вегетативных показателей. Крысы, отвечающие критериям (здоровые) включения в эксперимент, распределяют на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, исключают из исследования в течение карантина.

За сутки до начала введения токсикантов животных не

кормят. Перед исследованием животных маркируют (раствором пикриновой кислоты или другими способами).

Нормальные величины вегетативных показателей представлены в таблице 1. Содержание животных должно соответствовать руководящим документам. Кормление осуществляют ad libitum в первой половине дня.

Таблица 1 – Нормальные величины вегетативных показателей у белых беспородных крыс-самцов

Показатель	Среднее значение	95% доверительный интервал истинного среднего значения	Границы возможных значений показателя	Количество животных
		$M=x\pm t_{95}\cdot mx$	$X=X\pm t_{95}\cdot Sx$	
Температура, °С	37,4	37,3-37,5	35,8-38,9	217
ЧД, мин$^{-1}$	115	111-119	62-168	199
АД сист, мм.рт.ст.	118,9	115,8-121,9	77,4-160,4	182
ЧСС, мин$^{-1}$	523	517-530	444-603	157

4.3.2. Алгоритм моделирования поражений ЦНС при хроническом воздействии нейротоксикантами

Схема создания моделей интоксикации нейротоксическими агентами и подходы к оценке степени нарушения функций центральной нервной системы представлены на рисунке 1.

На первом этапе определяют среднесмертельные дозы для исследуемого вещества с использованием различных методов с последующим обязательным определением кумулятивных способностей нейротоксиканта. Пути введения токсикантов могут быть любыми. Для моделирования хронического воздействия нейротоксичными агентами целесообразно выбирать тот путь поступления вещества в организм, который наиболее вероятен в естественных условиях.

Под кумуляцией следует понимать усиление действия

вещества при повторном его воздействии. Сопоставление коэффициентов кумуляции различных нейроткcикантов предусматривает соблюдение одинаковых условий проведения экспериментов (величины вводимой дозы в частях или в процентах от LD_{50}, срока, режима и пути введения), а также выбора приема количественного выражения кумулятивного процесса.

Величина воздействующей дозы колеблется в довольно широком диапазоне (от 1/5 до 1/100 LD_{50}). Единой величиной дробности при сравнительной количественной оценке эффекта кумуляции может быть 1/10 LD_{50} поскольку для целого ряда нейротоксикантов она близка к пороговой [41].

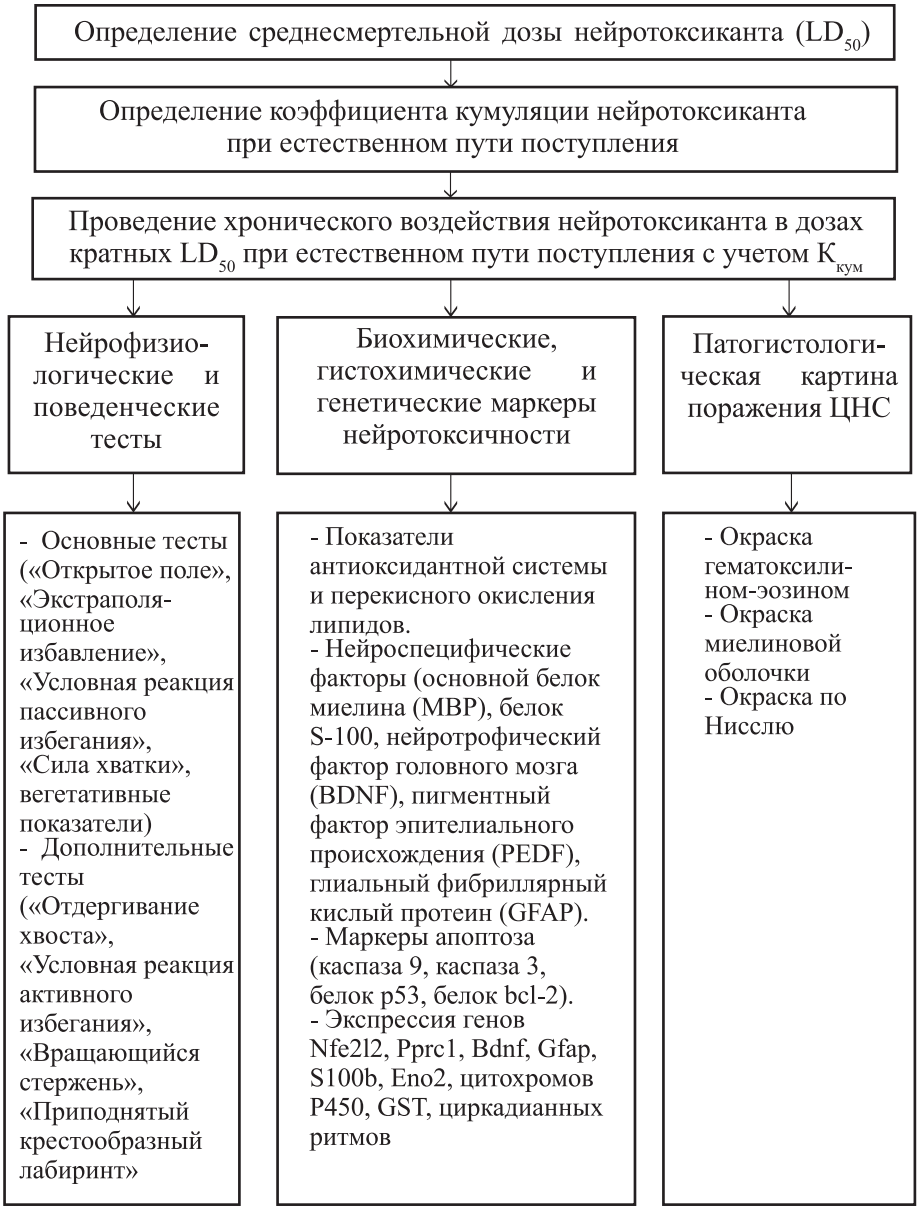

Рисунок 1 – Схема создания моделей интоксикации нейротоксическими агентами

С целью количественной оценки кумулятивного действия веществ используют коэффициент кумуляции (ККУМ) или индекс кумуляции, под которым принято понимать отношение суммарной дозы вещества, вызывающей определенный эффект при дробном введении к дозе, вызывающей тот же эффект при однократном введении.

$$К_{КУМ} = \Sigma(LD_{50}^{N})/LD_{50}^{1},$$

где $\Sigma(LD_{50}^{N})$ – сумма доз, введенных животным в условиях хронического эксперимента, которая привела к гибели 50% животных;

LD_{50}^{1} – среднесмертельная доза нейротоксиканта при однократном введении.

Кумулятивное действие слабо выражено или отсутствует, если $К_{КУМ} > 10$; выражено, если $К_{КУМ}$ от 3 до 10; сильно выражено, если от 1 до 3. Если $К_{КУМ}<1$, то нейротоксикант обладает сверхкумуляцией [42].

Выжившие после хронической интоксикации животные содержатся в обычных условиях. Животные подвергаются ежедневному осмотру. Наблюдение за ними продолжается в течение 1-3-х месяцев. Через 1 и 3 месяца после хронической нейроинтоксикации проводится комплексная оценка поражений ЦНС, которая включает проведение нейрофизиологических тестов, исследование биохимических, генетических и иммуногистохимических маркеров нейротоксичности. Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с контролем проводят статистическую обработку по параметрическим тестам (t-критерию Стьюдента), при несоответствии выборки параметрам нормальности по критерию Шапиро-Уилка - по непараметрическим тестам (Вилкоксона-Манна-Уитни, Шеллинга - Войфейля, углового преобразования Фишера, Х-критерия Ван-дер-Вардена и др).

4.4. Методы оценки поражений ЦНС после хронической нейроинтоксикации

Общее состояние животных с особым вниманием к токсикологически значимым признакам, в частности нейрофункциональным и нейроповеденческим реакциям, должно исследоваться в начале и в конце каждого дня. Дополнительно животные должны проверяться как минимум один раз в выходные и праздничные дни. Общее клиническое наблюдение должно осуществляться как минимум один раз в день, предпочтительно в одно и то же время, принимая во внимание период максимума предполагаемого воздействия дозы.

Подробное клиническое наблюдение должно быть проведено как минимум один раз до начала воздействия, к концу первой недели исследования и впоследствии ежемесячно. Все обследования необходимо делать вне клетки, каждый раз в одном месте, в одно и то же время. Отмеченные признаки должны включать, изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, возникновение секреции и экскреции и автономной активности (например, слезоотделение, пилоэрекция, размер зрачка, аномальный способ дыхания). Изменения в походке, положении тела, реакции на прикосновение, как и наличие клонических или тонических движений, стереотипах (например, чрезмерное умывание, однообразные движения по кругу) или аномалиях поведения (например, членовредительство, хождение задом наперед) также должны регистрироваться.

Все животные должны взвешиваться в начале исследования как минимум раз в неделю первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем. Измерения потребления пищи и питательности пищи следует производить еженедельно первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем. Необходимо также учитывать потребление воды для исследований, в которых активность потребления воды изменяется. Измерения потребления воды следует проводить еженедельно первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем, когда вещество вводится через питьевую воду.

Данные для каждого отдельного животного должны содержать все параметры по оценке воздействия. В дополнение, все данные должны быть сведены в табличной форме, отражающей для каждой тестовой группы количество животных на начало исследования; количество животных, умерших во время исследования или умерщвленных по гуманным соображениям, время каждой смерти или умерщвления; количество обнаруженных признаков токсичности; описание наблюдаемых признаков токсичности, включая время начала, продолжительность и тяжесть любых токсических воздействий; количество животных, демонстрирующих патологию, тип патологии и процент животных, демонстрирующих каждый тип патологии.

Методы оценки поражений ЦНС после хронической нейроинтоксикации представлены в приложениях А-Ж.

Численные результаты должны быть оценены специальными и общепринятыми статистическими методами. Статистические методы и данные для анализа должны быть выбраны во время разработки исследования. При необходимости, этот выбор должен предусматривать корректировку выживаемости.

4.4.1. Методы оценки нейрофизиологических функций

Тест «Открытое поле»

Данный тест позволяет эффективно оценить нейрофизиологическое состояние и поведенческие реакции лабораторных животных с акцентом на изучение спонтанной двигательной активности, исследовательской активности, уровней депрессивности и тревожности. Показатели, регистрируемые при выполнении теста, дают возможность оценки анксиогенной или анксиолитической активности веществ (время и процент нахождения в центре и на периферии открытой центральной площадки), наличие у них седативного или транквилизирующего действия. Снижение общей подвижности животных в данном тесте является следствием повышения уровня стресса, поскольку крысы реагируют замиранием на новые, потенциально опасные стимулы. В тесте «открытое поле» потенциально опасная ситуация имитируется

помещением животного в камеру, которая значительно больше, чем клетка, в которой живет крыса. Замирание крысы в «открытом поле» рассматривают как симптом страха. Лучшим отражением уменьшения страха у животных является исследование ими внутреннего сектора. Смена эмоционального состояния сопровождается изменением работы внутренних органов. Вегетативная функция, которую удобно учитывать вместе с измерением активности – это дефекация. Обнаружена отрицательная корреляция между дефекацией и исследованием центральной части открытого поля. Стойки рассматриваются как компонент исследовательской активности, чувствительный к уровню тревожности. Груминг должен трактоваться как «смешенное» поведение.

Тест «Экстраполяционное избавление»

Методика предназначена для изучения когнитивных функций грызунов в условиях острого стресса. Она позволяет оценить индивидуальные различия когнитивного стиля решения задачи (поиска пути избавления из острой стресс-ситуации), становление когнитивных функций в онтогенезе, влияние фармакологически активных веществ на нарушение когнитивных функций. Тест «экстраполяционное избавление» используется в психофармакологии как чувствительный метод для выявления соединений с анксиолитической и нейролептической активностью, а также для изучения когнитивных функций в условиях острого стресса.

Тест «Условная реакция пассивного избегания»

Условная реакция пассивного избегания болевого раздражения (УРПИ) – метод 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. Вследствие своих биологических особенностей (врождённое предпочтение тёмных участков пространства у грызунов) крыса предпочитает находиться в тёмном помещении («норковый рефлекс»), это

используется при проведении данного эксперимента. Животных, не имеющих «норкового рефлекса», не используют для дальнейшего эксперимента.

Тест «Сила хвата»

Скрининговый тест оценки на статическую выносливость. Использование теста на силу хватки необходимо для оценки нервно-мышечной функции и мышечной силы при статической нагрузке, при помощи фиксации пикового усилия, которое потребуется, чтобы заставить мышь или крысу выпустить свою хватку. В динамике позволяет оценивать как снижение, так и повышение статического компонента неспецифической выносливости.

Дополнительные методы оценки нейрофизиологических функций

Тест отдёргивания хвоста (Tail Flick)

Методика предназначена для оценки болевой чувствительности. Соматическую болевую чувствительность оценивают по безусловно-рефлекторному отдёргиванию хвоста грызунами в ответ на воздействие источником тепла на хвост. Движение хвоста останавливает действие раздражителя.

Тест сдавления конечности (задней лапы)

Методика основана на определении порога болевой чувствительности, при оказании равномерно увеличивающегося давления на лапу животного.

Тест «Условная реакция активного избегания» (УРАИ) плавания

УРАИ является комплексным приемом позволяющим оценивать основные показатели умственной работоспособности – динамику выработки рефлекса, его сохранность, как во времени (кратковременная и долгосрочная память), так и под воздействием экстремальных факторов окружающей среды. Кроме того возможна оценка широкого спектра показателей в скрининговом режиме

(двигательной активности, эмоционального статуса и др.).

Данная методика наиболее полно соответствует этологии крысы, когда в качестве аверсивного стимула или градиента используется вода. Использование метода при доклинических исследованиях позволяет оценить влияние препаратов на процессы обучения и памяти.

Тест «Вращающийся стержень»

Методика предназначена для оценки равновесия и координации движений. Уменьшение времени удержания на вращающемся стержне крыс под влиянием исследуемого токсиканта по сравнению с интактными животными рассматривается, как проявление нарушения равновесия, физической выносливости и координации движений.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

Один из наиболее чувствительных тестов для оценки тревожности. Правомерность использования теста в качестве модели тревожности определяется тем, что он основан на тех же природных стимулах, которые способны вызывать тревожность у людей. Используется баланс между естественным страхом животного перед открытым пространством, высотой, новизной (неофобия) и одновременным стремлением исследовать эти незнакомые условия. Приподнятый крестообразный лабиринт предназначен для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить: уровень тревожности животного (по предпочтению темных углов/светлых углов, боязни высоты лабиринта, выраженности и динамике поведения (выглядывания, заглядывания, свешивания); симптомы неврологического дефицита; привыкание (habituation).

4.4.2. Биохимические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические маркеры нейротоксичности

Биохимические маркеры нейротоксичности

Основной белок миелина (MBP)

MBP выделяется в спинно-мозговую жидкость (СМЖ) при

любом повреждении нервной ткани. Уровень MBP повышается при травмах ЦНС, опухолях, рассеянном склерозе, подостром склерозирующем панэнцефалите, вирусных энцефалитах, других неврологических расстройствах. Также уровень MBP повышается в течение нескольких дней после инсульта и отражает деструкцию миелиновых оболочек.

Белок S-100

S-100 является специфическим белком астроцитарной глии, способным связывать кальций. Астроглиальные клетки - это наиболее многочисленные клетки в мозговой ткани. Они образуют трехмерную сеть, которая является опорным каркасом для нейронов. Увеличение концентрации S-100 в СМЖ и плазме является маркером повреждения головного мозга.

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)

Белок BDNF экспрессируется в фибробластах, астроцитах, нейронах различного фенотипа и локализации, мегакариоцитах/тромбоцитах, шванновских клетках (в районах повреждения). Функциональная активность BDNF довольно велика. В период развития он участвует в дифференцировке нейронов, созревании, выживании и формировании синапсов. Во взрослом организме основная функция BDNF – нейропротекция, защита нейронов головного мозга от ишемических атак и мотонейронов от гибели, индуцируемой удалением аксонов.

Пигментный фактор эпителиального происхождения (PEDF)

PEDF – это гликопротеин, обладающий множеством биологических функций. Это нейропротективный и нейротрофический фактор, который воздействует на различные типы нейронов. У крыс PEDF является фактором выживаемости зернистых нейронов мозжечка, защищая их от апоптоза и нейротоксичности глутамата. Он также защищает двигательные нейроны и развивающиеся нейроны гиппокампа от дегенерации, индуцированной глутаматом.

Глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP)

GFAP является членом семейства белков цитоскелета в зрелых астроцитах ЦНС. Это высоко специфичный белок мозга, который не обнаружен за пределами ЦНС. В ЦНС после повреждения (будь то результат травмы, заболевания, генетического нарушения или химического инсульта) астроциты в результате типичного поведения отвечают астроглиозом. Астроглиоз характеризуется быстрым синтезом GFAP.

Иммуногистохимические маркеры нейротоксичности

Экспрессия каспазы 9

Каспаза 9 – инициирующий компонент в развитии апоптоза, связанный с митохондриями. Стимулом запуска каспазы 9 является освобождаемый из митохондрий цитохром С, последовательно активирующий белок Apaf1, который в свою очередь активирует инициирующую каспазу 9. Каспаза 9 принимает наиболее активное участие в разборке ядра. В процессе активации каспазы 9 высвобождается модуль CARD, который повышает экспрессию фактора транскрипции NF-kB и генов, кодирующих антиапоптозные белки. Высвобождаемые при активации каспазы 9 продомены обладают антиапоптозным эффектом, ингибируя активацию каспазы 9, что демонстрирует существование механизма обратной связи в работе каспазных каскадов.

Экспрессия каспазы 3

Каспаза 3 является ведущей эффекторной каспазой. Каспаза 3 – это цитозольный фермент, который регистрируется в цитоплазме клеток при некоторых видах апоптоза. Каспаза 3 расщепляет ключевые клеточные белки, разные формы протеинкиназ, факторы транскрипции, а также блокирует передачу сигналов факторов роста инициации апоптоза и останавливает клеточный цикл. Фрагментация ДНК при апоптозе также регулируется каспазой 3 за счет протеолиза комплексов с образованием каспазозависимой эндонуклеазы. Активация каспазы 3 необходима для быстрой кинетики расщепления белков, когда сигнал апоптоза замедлен.

Экспрессия белка p53

Гены опухолевых супрессоров p53, p16, p21, p27, детерминирующих соответствующие белки, являются регуляторными генами апоптоза. Наиболее интенсивно изучающийся в последние годы является белок p53. Функции белка p53 связаны, прежде всего, с его ведущей ролью в онкопротекции, распознавании и проведении внутриклеточных сигналов, регуляции межклеточных взаимодействий, координации метаболических процессов, регуляции клеточных делений и апоптоза. В целом, роль этого белка заключается в обеспечении стабильности генома и генетической однородности клеток, а его недостаточность ведет к развитию тяжелых заболеваний.

Экспрессия белка bcl-2

Белок bcl-2 принадлежит к группе ингибиторов апоптоза и является антиапоптозным белком. Bcl-2 подавляет апоптоз во многих клеточных системах, включая лимфогематопоэтические и нейрональные клетки, регулирует клеточную гибель, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны, ингибирует каспазы за счёт предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий и/или за счёт связывания фактора Apaf1, активирующего апоптоз. Окислительный стресс изменяет экспрессию этого белка в спинном мозге и гиппокампе мышей. Bc1-2 принимает участие в механизмахрегуляции депрессивно-подобных состояний у крыс, вызванных пренатальным стрессом, что показано на клетках гиппокампа и префронтальной коры.

Молекулярно-генетические маркеры нейротоксичности в плазме и тканях экспериментальных животных

Оценка экспрессии генов белков, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков.

Изменение экспрессии гена *Nfe2l2*, кодирующего белок NRF2 (Ядерный фактор-2, подобный эритроидному фактору 2, nuclear factor, erythroid 2-like 2).

Белок NRF2 – транскрипционный фактор, относящийся к семейству транскрипционных факторов типа лейциновых молний. NRF2 связывается с мотивом ARE (antioxidant response elements – антиоксидант-респонсивный элемент) в промотерной области гена, модулируя транскрипцию гена. Регуляторный элемент ARE обнаружен в нескольких сотнях генах млекопитающих. Основной функцией белков, кодируемых NRF2-индуцируемыми генами, являются поддержание внутриклеточного гомеостаза, защита клетки от потенциально опасных химических агентов и физических воздействий, распознавание поврежденных макромолекул и их утилизация, инициация апоптоза. К числу генов активируемых ARE относятся ферменты всех фаз биотранформации ксенобиотиков. Большинство этих ферментов проявляют антиоксидантные свойства, и повышение уровня их синтеза в условиях окислительного стресса оказывает протективное действие на клетку.

Изменение экспрессии гена *Pprc1*, кодирующего белок PRC (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1 – PGC-1-related coactivator; ген коактиватора гамма-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, тип 1).

Белок PRC, является членом семейства коактиваторов PGC-1, обладает двойной функцией. Он контролирует митохондриальный биогенез, а также служит сенсором при метаболическом стрессе. PRC обеспечивает надежный ответ на метаболический стресс путем модуляции экспрессии множества генов, отвечающих за воспалительный ответ, пролиферацию клеток, преждевременное старение и апоптоз. Кроме, того установлена важная роль PRC в поляризации микроглии M2, которая продуцирует противовоспалительные цитокины оказывая нейропротекторное действие.

Изменение экспрессии генов, кодирующих глутатион S-трансферазы (GST).

Глутатион S-трансферазы катализируют реакцию конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с молекулами, имеющими электрофильные центры. Эта реакция – одна из важнейших в метаболическом пути деградации множества токсичных соединений, в том числе образующихся в ходе окислительного стресса. Три изоформы (α, μ, и π) были обнаружены в нейронах и глиальных клетках: присутствие GST-α показано в ядрах нейронов, а также в нейроглии и эндотелиальных клетках мозга крысы, GST-μ – в астроцитах, клетках субвентрикулярной зоны и клетках эпендимы из мозга крыс, GST-π – в астроцитах, эндотелиальных клетках, цитоплазме зрелых олигодендроцитов в коре головного мозга грызунов.

Изменение экспрессии генов цитохромов Р450.

К наиболее важным по каталитической активности ферментам первой фазы биотрансформации ксенобиотиков относятся монооксигеназы семейства цитохромов Р450 (CYP1-CYP3). Уровень экспрессии цитохромов Р450 выше в печени, однако, их активность обнаруживается и в тканях других органов, в частности в тканях мозга. В мозге крыс обнаруживаются такие изоформы Р450, как CYP1A1/2, CYP2B1, CYP2C11, CYP2D1–6, CYP2E1, CYP3A1. Несмотря на то, что общая активность цитохромов в мозге низкая, в отдельных регионах мозга наблюдается повышенная активность определенных изоформ этих ферментов. Изменение экспрессии определенных изоформ Р450 в разных участках мозга может служить как маркером нейротоксичности, так и маркером оценки нейропротекторного действия фармакологических веществ.

Оценка уровней экспрессии генов циркадианного ритма *Bmal1, Clock, Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Rorα/β/γ и Rev-erbα/β*

Современная молекулярная модель циркадианных часов млекопитающих основана на двух основных взаимосвязанных транскрипционных/трансляционных петлях обратной связи, которые функционируют вместе для генерации суточной циклической экспрессии генов. В основе молекулярных часов лежат два белка CLOCK и BMAL1, которые являются активаторами транскрипции. В первой петле, димер CLOCK/BMAL1 транслоцируется в ядро и инициирует транскрипцию генов, кодирующих белки-репрессоры PERs и CRYs генов *Bmal1* и *Clock (Per1, Per2, Per3* и *Cry1, Cry2)*. Во второй петле, димер CLOCK/BMAL1 регулирует собственную транскрипцию через экспрессию генов *Rorα/β/γ* и *Rev-erbα/β*, которые кодируют белки RORs и REV-ERBs, соответственно. При этом RORs активируют экспрессию *Bmal1*, а REV-ERBs, наоборот, подавляют.

Циркадианные ритмы влияют на регуляцию многих физиологических процессов, включая энергетический метаболизм, иммунную систему, сердечнососудистую систему, секрецию гормонов, репродуктивную функцию, выделительную систему, пролиферацию клеток и когнитивные процессы. Нарушения циркадианных ритмов играют важную роль в патогенезе нейродегенеративных патологий, в частности при воздействии нейротоксикантов. Имеются данные о более тяжелом течение нейродегенеративных заболеваний в условиях десинхроноза.

Оценка уровня экспрессии генов нейроспецифичных белков

Экспрессия гена *Bdnf*, кодирующего нейротрофический фактор головного мозга (BDNF).

BDNF высоко консервативный нейротрофин, играющий ключевую роль в выживаемости нейронов, нейрогенезе, формировании новых синапсов, нейропластичности. Экспрессия гена Bdnf тесно связана со всеми аспектами функционирования нейронов, в том числе со сложными когнитивными процессами, а также с центральными и периферическими механизмами энергетического

гомеостаза. Предполагается, что BDNF может служить маркером нейродегенеративных процессов, а также маркером эффективности терапии, за счет значительного изменения уровня BDNF в крови.

Экспрессия гена *Gfap*, кодирующего глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP).

GFAP – белок цитоскелета астроглиальных клеток. Это главный промежуточный филамент зрелых астроцитов, который принимает участие в таких функциях астроцитов, как подвижность, митоз, синаптическая пластичность. Астроциты вовлечены в развитие широкого спектра патологий ЦНС, включая механические травмы, ишемию, нейродегенеративные процессы. В ответ на практически любую патологию астроциты отвечают гиперпродукцией глиальных волокон. Повышенная экспрессия Gfap, может отражать степень поражения ЦНС.

Экспрессия гена *S100b*, кодирующего белок S100B.

Белок S100B – цитоплазматический белок астроцитов. Проявляет свои функции как внутри, так и вне клетки. Внутри клетки S100b влияет на разные физиологические функции, включая гомеостаз Ca^{2+}, регуляцию клеточной морфологии путем взаимодействия с цитоскелетом. S100B действует как стимулятор пролиферации и миграции, ингибитор апоптоза и дифференцировки. В межклеточном пространстве S100B может выступать в качестве сигнальной молекулы. В высоких концентрациях является маркером повреждения мозга, так как его уровень в спинномозговой жидкости и плазме крови повышается при таких патофизиологических состояниях как, старение мозга, черепно-мозговые травмы, нейродегенеративные процессы, воздействие нейротоксикантов.

Экспрессия гена *Eno2*, кодирующего нейрон-специфическую энолазу (NSE).

Нейронспецифическая энолаза – это цитоплазматический фермент гликолитического пути в нейронах. В норме NSE присутствует в большом количестве в нейронах центральной и периферической нервной системы. Ее концентрация значительно

повышается при повреждении нервной ткани в результате механической травмы головного мозга, гипоксии, а также при остром и хроническом воздействии нейротоксикантов.

Выбор исследуемого гена и материала для исследования (ткани, органа, клеток) определяется фармакокинетическими и фармакодинамическими особенностями нейротоксиканта, а также целями и задачами исследования.

4.4.3. Морфологическая картина хронического поражения ЦНС нейротоксикантами

Одним из наиболее распространенных хронических поражений ЦНС нейротоксикантами являются наркотические отравления. Наркомания вызывает необратимое повреждение практически всех органов и систем, и поражение нервной системы является одним из ключевых факторов высокой летальности в результате развития тяжелых неврологических осложнений [43].

Употребление наркотических и психотропных веществ (НПВ) чаще всего приводит к развитию гипоксических и ишемических повреждений структур головного мозга, что у пациентов может проявляться в виде разнообразных психоневрологических расстройств [44, 45].

При изучении головного мозга 238 умерших потребителей наркотических препаратов, умерших в результате соматоневрологических осложнений и передозировок психо-активных веществ (ПАВ), были получены следующие результаты [46]. При секционном исследовании головного мозга обнаружены венозное полнокровие, отек и набухание, кровоизлияния в ткань и оболочки, фиброз мягкой мозговой оболочки. Гистологический анализ показал наличие периваскулярного отека в сочетании с нарушениями микроциркуляции (стаза эритроцитов в капиллярах, общее венозное полнокровие, парез резистивного звена микроциркуляции, сладж эритроцитов, иногда образование фибриново-эритроцитарных тромбов с множественными мелкими диапедезными кровоизлияниями в субкортикальных отделах и в стволе, изредка в мягкой мозговой оболочке). Выявлены набухание,

ишемическое изменение кортикоцитов, значительные изменения набухших нейронов подкорковых ядер и ствола с умеренным сателлитозом (окраска по Нисслю). В черной субстанции наблюдалась депигментация нейронов, очевидно, вследствие первичного поражения субкортикальных структур мозга с последующей ишемизацией коры, наступающей после поражения вегетативных ядер. Основными признаками хронической интоксикации (наркомании) головного мозга являются скопления липофусцина в нейронах подкорковых ядер, глиальная пролиферация (скопления микро- и олигодендроглии в подкорковых ядрах («глиальные узелки»)), демиелинизация в стволовых структурах, васкулиты разных типов, макро- и микроабсцессы головного мозга, фиброз мягкой мозговой оболочки.

Нейрогистологические исследования на фоне хронического употребления ПАВ иногда позволяют выявить специфические нарушения. Так, при хронической морфинной интоксикации наблюдаются следующие ультраструктурные изменения нервной системы – нарушения в основном в ядрах вентромедиального гипоталамуса, ретикулярной формации ствола мозга и коры больших полушарий. Вероятно, в развитии наркомании лежит стойкая реорганизация синаптоархитектоники вследствие повреждения и исчезновения некоторого количества межнейрональных контактов и, одновременно, активации части синапсов с образованием новых нейронных связей. При прогрессировании наркотической зависимости обнаружено усиление деструкции ультраструктуры нейронов и межнейрональных связей [47].

При хронической морфинной интоксикации в головном мозге крыс отмечены дистрофические и некробиотические изменения нейронов (конденсация цитоплазмы и уплотнение клеточных структур с образованием мелкозернистых глыбок, наличие в цитоплазме глиальных клеток вакуольных структур, кариорексис, кариолизис ядер нейронов). Наблюдались эритростазы, сладжи (нарушения микроциркуляции). Электронно-микроскопическое исследование ретикулярной

формации выявило диффузный отек отдельных гигантских нервных клеток [48].

Показано, что морфин может накапливаться в гипоталамусе. На примере изучения таламуса при хроническом отравлении морфином у крыс выявлены ультраструктурные деструктивные изменения в нейронах и нейропиле [49, 50]. Морфинная интоксикация оказывала влияние на потомство матери (нарушение глиогенеза, деструктивные изменения астроцитов гипоталамуса и олигоденроглии). Задержка развития олигодендроцитов приводит к нарушению миелинизации аксонов, развития синапсов и нейронов, замедляет зрелость медиаторных систем, преимущественно эндогенных опиоидных пептидов, что приводит к патологическим изменениям интегративной функции мозга.

Исследование нейронов мезоаккумбоцингулярной (МАЦ) системы (вентральная область покрышки, черное вещество – прилежащее ядро – передняя цингулярная кора) крыс, где опиатные рецепторы расположены совместно с рецепторами дофамина, показало, что повреждение нейронов МАЦ-системы наиболее выражено при пренатальном воздействии морфина и проявляется снижением количества и уменьшением объема тел нормо- и гиперхромных несморщенных нейронов. Предполагается, что повреждение нейронов связано с их фагоцитозом макро- и микроглиоцитами [51].

Очевидно, что регуляция нейрогенеза в гиппокампе может быть единственным механизмом, посредством которого морфин и героин влияют на его функцию (показано значительное угнетение нейрогенеза (на 42%) в гиппокампе взрослых крыс) [52]. Повреждение стриатума и прилежащего ядра снижает потребность во введении кокаина и морфина, причем в случае прилежащего ядра эта тенденция была более выраженной, как показано в серии опытов на крысах [53].

Выявлены ультраструктурные изменения префронтальной коры крыс при длительном (в течение 3 недель) воздействии амфетамина, при отсутствии изменений на световой микроскопии. Обнаружены изменения митохондрий, осмиофилия и увеличение

липидных гранул в олигодендроцитах, повышение числа полисом в цитоплазме, гипертрофия отростков астроцитов (электронно-микроскопическое исследование). Изменения в ультраструктуре пресинаптических терминалей прослеживались во всех слоях префронтальной коры, отмечены увеличение длины постсинаптического уплотнения, увеличение числа синаптических пузырьков в пресинаптической терминали, потемнение матрикса митохондрий и набухание их крист. Число и плотность расположения аксо-дендритных синапсов возрастают, а количество аксошипиковых контактов, трансформация которых, возможно, происходит в результате действия амфетамина, активирующего дофаминергическую систему, снижается. Данные изменения ультраструктуры нейронов и нейропиля префронтальной коры свидетельствуют о комплексной реакции всех элементов нервной ткани на длительное возбуждение дофаминергической системы. Вероятно, возрастание активности некоторых афферентных входов в префронтальную кору является важным компонентом изменений поведения в амфетаминовой модели [54].

Хроническая интоксикация амфетаминами, как показано в различных исследованиях, проявляется нейротоксичностью и обусловлена разрушающим действием психостимуляторов на дофаминергическую и серотонинергическую системы [55].

Хроническое введение метамфетамина (первитина) приводит к накоплению специфических белковых маркеров в богатых дофамином зонах – в коре лобной доли и полосатом теле, что было выявлено при исследовании головного мозга 20 умерших наркоманов, смерть половины из которых наступила в результате передозировки. Изменения астроглии указывали на нейротоксичность метамфетамина и на процессы ремоделирования нейропластичности [56].

При хроническом отравлении эфедроном часто встречаются обширные кровоизлияния в мозг, более тяжелые, чем при других формах наркотических интоксикаций. Это связано с тем, что эфедрон является синтетическим психостимулятором на основе эфедрина и его действие сопровождается артериальной

гипертензией, что и приводит к геморрагическим повреждениям ЦНС [57].

Выраженные патоморфологические изменения и цитотоксический эффект наблюдался у крыс, длительно вдыхавших пары клея «Момент» и бензина к исходу 30 суток экспозиции. Наиболее чувствительными к интоксикации паров клея «Момент» оказались нейроны коры больших полушарий головного мозга и клетки Пуркинье коры мозжечка, а к цитотоксическим эффектам паров бензина – нейроны таламуса. Наблюдались также отдаленные последствия длительных ингаляций, выраженные в развитии морфологических признаков хронической токсической энцефалопатии. В первую очередь, это было застойное полнокровие сосудов головного мозга, продуктивный церебральный васкулит, глиофиброз, деформация и нарушения целостности аксональных отростков нейронов коры и ствола мозга, сопровождающиеся липофусцинозом тел нейронов, наличием нейронофагических узелков и слоистых глиальных макрофагов в различных отделах мозга. Через 1 месяц после прекращения данных воздействий морфометрические показатели сморщивания нейронов и образования клеток-теней остались на уровне, превышающем контрольные значения. Показатели фагоцитарной активности снизились во всех отделах головного мозга в 3 раза. Таким образом, результаты показали высокую стойкость патоморфологических изменений головного мозга, вызванных бензином и клеем «Момент» [58].

Хроническая интоксикация с использованием летучих растворителей, как и отравление НПВ, приводит к развитию глиоза (разрастание микроглии и астроглии, утраты значительного числа нейронов коры головного мозга, гиппокампа, мозжечка и ствола) [59, 60]. Специфическими нейрогистологическими особенностями отравления летучими растворителями являются хроматолиз нейронов ретикулярной формации и коры мозга, гибель клеток Пуркинье, клеток зернистого слоя мозжечка и части гиппокампа [59].

Сравнительная оценка нейрогистологических изменений при героиновой наркомании с другими умершими указывает на некоторые отличительные особенности нарушений у потребителей ПАВ.

В сравнительных исследованиях реакции глии белого вещества головного мозга при болезни Альцгеймера, героиновой наркомании без СПИДа и со СПИДом, дисциркуляторной энцефалопатии и рассеянном склерозе с группой контроля обнаружено значительное снижение глии при наркомании со СПИДом и болезни Альцгеймера – глиоцитопения [61].

В настоящее время существует классификация патоморфологических изменений нервной системы, развивающихся на фоне острой и хронической наркотической интоксикации [57], где выделено 7 групп нейрогистологических нарушений:

1. Изменения, связанные с непосредственным токсическим и токсико-гипоксическим действием наркотических средств на ЦНС: проявления острого нарушения мозговой циркуляции и острого повреждения нейронов.

2. Признаки хронической наркотической интоксикации, наиболее выраженные в таламических ядрах и черной субстанции: ишемия и сморщивание нейронов, обнаружение нейронов с тигролизом вещества Ниссля и признаками острого набухания, явления нейронофагии, очаги скопления «глиальных узелков» и т.д.

3. Острые и хронические токсические, токсико-аллергические и микроэмболические поражения мозга, вызванные действием примесей и фальсификатов.

4. Мозговые проявления сепсиса как доказательство хронической наркотизации.

5. Острые и хронические энцефалиты грибковой или вирусной этиологии, токсоплазмоз.

6. Вторичные изменения ЦНС при сопутствующей органной патологии.

7. Изменения рецепторного нейромедиаторного аппарата на фоне употребления ПАВ.

4.5. Возможные направления фармакологической коррекции поражений ЦНС при хроническом воздействии нейротоксикантами

Поражения нервной системы после хронических нейроинтоксикаций разнообразны и характеризуются различной

морфологической картиной поражений ткани мозга и клинической симптоматикой в зависимости от локализации патологического процесса, степени нейротропности токсиканта и чувствительности определенных отделов нервной системы к тому или иному нейротоксическому яду, тяжести интоксикации, индивидуальной чувствительности пострадавшего к нейротоксическому воздействию, наличия других заболеваний и сопутствующих или предшествующих травм ЦНС. В клинической картине хронических нейротоксикозов преобладают начальные формы поражения ЦНС, выявить которые возможно лишь при тщательном обследовании нервной системы с оценкой основных психических функций и состояния высшей нервной деятельности. Изменения со стороны ЦНС могут быть вторичными, т.е. развиваться как следствие первичных сосудистых расстройств, нарушений иннервации сосудов, гипоксии головного мозга, биохимических сдвигов с последующим поражением нейронов и других нервных образований [62].

В клинической картине хронических нейроинтоксикаций лидирующее положение занимают симптомы поражения центральной нервной системы. Основной жалобой является головная боль. Данный симптом отмечается практически у всех. Характер боли диффузный, тупой, в тяжелых случаях – постоянный с периодическими головокружениями. Практически у всех больных отмечаются жалобы на общую слабость, повышенную утомляемость, раздражительность [63].

Отмечаются признаки вегетативной дисфункции: усиленное потоотделение, усиление и асимметрия сухожильных рефлексов, тремор пальцев вытянутых рук, диффузное понижение мышечного тонуса. Вегетативная дисфункция сопровождается симптомами повышенной возбудимости или истощаемости корковых процессов и нарушениями взаимоотношений корково-подкорковой регуляции. Когнитивные расстройства сопровождаются резким ухудшением памяти, нарушением внимания [64].

Хроническое отравление нейроинтоксикантами может сопровождаться астеническим и астено-невротическим синдромами.

Симптомы вегетативной дисфункции в клинике этих синдромов уже не являются ведущими. При воздействии дополнительных неблагоприятных факторов (инфекции, интоксикации, психотравмы и другие) и отсутствии адекватной фармакологической поддержки прогрессирование токсического поражения нервной системы приводит к развитию выраженного и стойкого астено-вегетативного синдрома.

Рисунок 2 – Структура астенического синдрома [65].

Астенический синдром – это проявление многих функциональных расстройств и заболеваний различного генеза, как соматического, так и психогенного характера [66]. Астения является полиморфным синдромом (рисунок 2). Кроме слабости и утомляемости, как правило, наблюдаются и иные расстройства, спектр которых достаточно широк:

– когнитивные симптомы (нарушение внимания, рассеянность, снижение памяти);

– болевые расстройства (кардиалгии, абдоминалгии, дорсалгии);

– вегетативная дисфункция (тахикардия, гипервентиляционные расстройства, гипергидроз);

– эмоциональные расстройства (чувство внутреннего напряжения, тревожность, лабильность или снижение настроения, страхи);

– мотивационные и обменно-эндокринные расстройства (диссомнии, снижение либидо, изменения аппетита, похудание, отечность, дисменорея, предменструальный синдром);

– гиперестезии [67].

Как следует из схемы, приведенной на рисунке 3, ключевыми звеньями психоорганического синдрома являются интеллектуально-мнестическое снижение и расстройства эмоций. Неизменно присутствуют сдвиги со стороны вегетативной нервной системы, иногда выявляются эндокринные дисфункции, а также метаболические нарушения. Очевидно, что в данном случае должна идти речь не только о психопатологическом, но и о неврологическом феноменах [68].

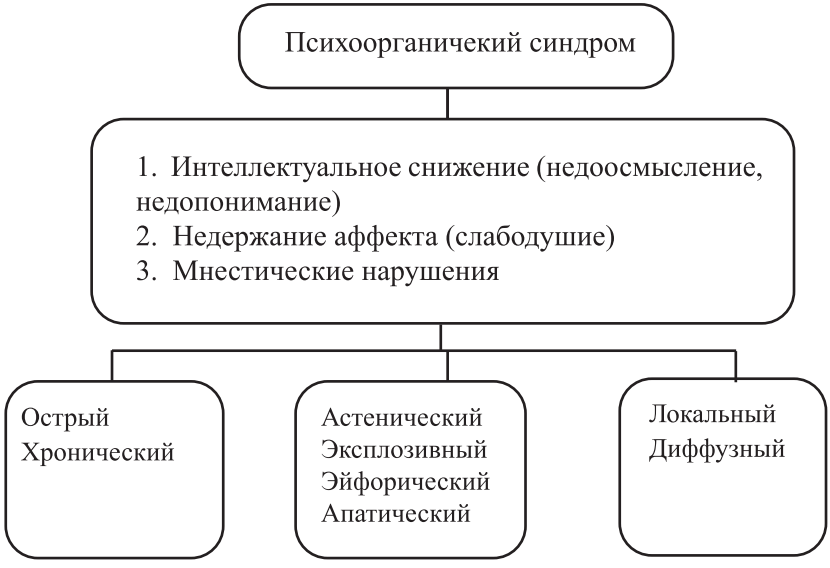

Рисунок 3 – Структура психоорганического синдрома [65].

Различают следующие уровни развития психоорганического синдрома:

– астенический тип – наиболее простой и легкий по своей структуре;

– эксплозивный тип – наличие более грубых изменений личности с характерной взрывчатостью и конфликтностью;

– апатический тип – наличие резкого снижения психической активности с наиболее выраженной социальной дезадаптацией;

– смешанный тип – включает особенности всех типов.

Астено-органический синдром сопровождается необратимым нарушением психоэнергетического потенциала, что приводит к нарушениям в психической сфере пациентов. Усиление истероформных, ипохондрических, сенестопатических проявлений синдрома обычно отражает влияние дополнительных факторов на течение заболевания и является отражением личностных особенностей конкретного пациента.

Возможные направления коррекции поражений ЦНС при хронической нейроинтоксикации, подробно изложены в различных пособиях по клинической токсикологии и заключаются в следующем [69-73]:

– восстановление и поддержание жизненно важных функций;

– прекращение дальнейшего поступления и удаление из организма не всосавшегося яда;

– форсированное выведение из организма всосавшегося яда;

– применение специфических противоядий (антидотов);

– активное использование лекарственных средств патогенетической и симптоматической терапии, восстановление гомеостаза организма.

Обычно практика фармакотерапии нейропротекторами при назначении тех или иных лекарственных препаратов этой фармакологической группы ориентирова-на на учет конкретных для каждого лекарственного средства особенностей биологи-ческой активности [74]:

– наличие ноотропного (ноотропоподобного) действия,

заключающегося в способности препарата повышать устойчивость организма и избирательно центральной нервной системы к действию различных повреждающих факторов при сохранении или повышении высших функций мозга;

– способность препарата сохранять (оптимизировать) метаболическую актив-ность нервных клеток при воздействии повреждающих факторов;

– способность препарата восстанавливать нарушенный метаболизм и компенсировать энергетический дефицит в нервных клетках;

– способность препарата оказывать антиоксидантный эффект;

– способность препарата прямо активировать нейротрофические процессы;

– способность препарата препятствовать развитию нейрональной дегенерации вследствие различных патологических процессов (аутоиммунных, токсических, возрастных, ускоренного апоптоза).

Одним из наиболее распространенных нейропротекторов считается цитофлавин [75-77]. Комплексный препарат, включающий рибоксин (инозин), янтарную кислоту, рибофлавин (витамин В2) и никотинамид (витамин РР). Механизмы фармакологической активности цитофлавина весьма многочисленны, подтверждены антиоксидантный, антигипоксантный, репаративный и иные эффекты препарата. Имеются сведения об эффективности цитофлавина в условиях хронической алкогольной интоксикации [78, 79].

К сукцинатсодержащим нейропротекторам относятся также реамберин, мексидол, мексикор, ремаксол, эмоксипин, метапрот и другие лекарственные препараты [76, 80]. Мексидол является ингибитором свободнорадикальных процессов, мембранопротектором, обладающим антигипоксическим, стресспротекторным, ноотропным, противосудорожным и анксиолитическим действием.

Существенно расширяет возможности клинического использования сукцинатсодержащих препаратов их комбинация

с аминокислотами, с другими антиоксидантами, блокаторами кальциевых каналов, с препаратами, восполняющими дефицит калия и магния в организме, холином альфосцератом (глиатилином) и другими лекарственными препаратами [75].

Глиатилин является нейропротектором, содержащим прекурсоры биологически активных веществ холин и глицерофосфат. Он усиливает центральную холинергическую передачу и стабилизирует нейрональные мембраны [81]. Улучшает церебральный кровоток, усиливает метаболические процессы в головном мозге, активирует структуры ретикулярной формации головного мозга.

В фармакологическую группу нейропротекторов природного происхождения обычно включают и препараты, содержащие полипептидные комплексы (церебролизин, кортексин), короткие пептиды (семакс, кортаген, пинеалон, селанк и другие) [82 - 84].

Семакс – синтетический пептид, созданный на основе фрагмента АКТГ (85 - 88) с дополнительно включенным в состав трипептидом Pro-Gly-Pro, обеспечивающим защиту от гидролизующего действия пептидаз. Данный препарат является физиологическим стимулятором памяти. Он ослабляет психическую усталость, улучшает адаптацию к разрушительному воздействию ишемии на головной мозг, что обычно сопутствует цереброваскулярным расстройствам, болезни Паркинсона, длительным стрессам.

Одним из представителей группы пептидных нейропротекторов является также препарат селанк, представляющий собой синтетический аналог регуляторного пептида тафцина (0,15% раствор, назальные капли). Механизм действия селанка на ЦНС во-первых, связан с изменением кругооборота катехоламинов (норадреналин, дофамин) и серотонина в эмоциогенных структурах мозга, что обусловлено влиянием на активность ключевых ферментов, контролирующих биосинтез моноаминов de novo (тирозин- и триптофангидроксилазу); во-вторых, являясь ингибитором энкефалиназ, он препятствует ускоренному распаду энкефалинов.

Установлено также протекторное действие препарата на норадренергическую систему мозга. Таким образом, селанк восстанавливает активность нейромедиаторных систем, вызывающих формирование чувства беспокойства, тревожности, страха и раздражительной слабости.

Церебролизин, относящийся к группе нейротрофических пептидных препаратов, является гидролизатом белковой вытяжки из головного мозга молодых свиней, препарат на 85% состоит из аминокислот и на 15% из пептидов. Основными механизмами действия активной пептидной фракции церебролизина являются: регуляция энергетического метаболизма мозга, собственное нейротрофическое воздействие (аналогичное действию эндогенных нейропетидов – фактора роста нервов NGF, мозгового нейротрофического фактора BDNF) и модулирование активности эндогенных факторов роста, а также взаимодействие с системами нейропептидов и нейромедиаторов.

Кортексин – отечественный препарат пептидной природы (структуры), полученный путем ферментативного гидролиза тканей мозга молодых (не старше 12 месяцев) телят или свиней. Содержит комплекс левовращающихся аминокислот, биологически активных полипептидов с молекулярной массой от 1 до 10 кДа и микроэлементов. Механизм действия кортексина связан с его метаболической активностью: компоненты препарата, свободно преодолевая гематоэнцефалический барьер, регулируют соотношение тормозных и возбуждающих нейромедиаторов, уровень серотонина и дофамина, оказывают ГАМК-ергическое воздействие на чувствительные синапсы, обладают антиоксидантной активностью, нормализуют глутамат-кальциевые каскады, замедляют процессы апоптоза.

Актовегин и солкосерил, которые представляют собой депротеинизированные диализаты крови молодых телят, относят к группе фармпрепаратов, получаемых из депротеинизированной крови. Препараты повышают обмен высокоэнергетических фосфатов, усиливают окислительное фосфорилирование (под их влиянием активируются ферменты окислительного

фосфорилирования пируват-, сукцинатдегидрогеназа, цитохром-С-оксидаза), увеличивают активность фосфатаз, приток калия в клетки и повышают активность калийзависимых ферментов - каталаз, сахараз, гликозидаз, увеличивают скорость распада продуктов анаэробного гликолиза - лактата и γ-гидроксибутирата, проявляют антиоксидантное и антигипоксантное действие. Эти препараты активируют клеточный метаболизм путем увеличения транспорта и накопления глюкозы и кислорода, а также усиливая их внутриклеточную утилизацию. Данные процессы приводят к ускорению метаболизма АТФ и повышению энергетических ресурсов клетки.

Таким образом, нейропротекторы представляют важнейший класс препаратов, использование которых необходимо для фармакологической коррекции нарушений ЦНС после хронических отравлений нейротоксикантами.

Для уменьшения выраженности тревоги, страха и эмоциональной напряжённости назначаются транквилизаторы (анксиолитики). В зависимости от характера фармакологического действия их делят на дневные транквилизаторы, не вызывающие значительной сонливости и миорелаксации, и транквилизаторы с выраженным седативным эффектом, которые применяют как снотворные средства.

Основные эффекты транквилизаторов:

– анксиолитический, или транквилизирующий;
– седативный;
– миорелаксирующий;
– снотворный;
– вегетостабилизирующий;
– противосудорожный.

В настоящее время в клинической практике терапии поражений ЦНС отдается предпочтение транквилизаторам бензодиазепинового ряда: диазепаму, лоразепаму и снотворным средствам бензодиазепинового ряда, например, нитразепаму.

Преимущества бензодиазепинов перед другими психотропными средствами, применяемыми при лечении

токсической энцефалопатии:

– относительная безопасность и более низкий наркотический потенциал по сравнению с другими гипноседативными препаратами;

– возможность устранения психопатологических расстройств (например, тревоги, возбуждения) без существенного угнетения дыхания;

– наличие противосудорожной активности;

– при использовании не развиваются экстрапирамидные нарушения, отсутствуют фармакологические эффекты, подобные активности холиноблокаторов.

Нейрометаболические стимуляторы (ноотропы, церебропротекторы) – средства психоаналептического действия, активизирующие метаболические процессы в головном мозге и обладающие антигипоксическим эффектом. Эти лекарственные препараты повышают общую устойчивость организма к действию экстремальных факторов. Терапевтическая селективность ноотропов представлена в таблице 2.

Ноотропы противопоказаны при психомоторном возбуждении, тяжёлых нарушениях функции печени и почек, повышенной чувствительности к подобным препаратам, аллергической реакции на их приём. Эти препараты не рекомендуется принимать в период беременности и лактации.

Наилучший эффект при лечении энцефалопатии оказывает сочетание ноотропов (пирацетама, фенибута, пиритинола (энцефабол, энербол), холина альфосцерата, кортексина, танакана, актовегина) с вазоактивными средствами (платифиллин, пентоксифиллин, винпоцетин, инстенон).

Когда на ведущее место в психосоматической патологии выходит сочетание тревожно-депрессивных проявлений, то в ряде случаев приходится прибегать к назначению антидепрессантов. Тианептин (коаксил) – современный препарат с высокой антидепрессивной эффективностью, оказывает благоприятный эффект на когнитивные функции, вегетативную симптоматику, потенцирует действие гипотензивных препаратов и уменьшает частоту гипертонических кризов. Препарат можно комбинировать

почти со всеми лекарственными препаратами (исключая ингибиторы МАО).

Таблица 2 – Терапевтичекая селективность нейропротекторов

Действие	Симптомы	Препараты
Психостимулирующее	Апатия, психическая инертность, психомоторная заторможенность	Пирацетам, пиритинол, пикамилон, фенотропил, меклофеноксат, инстенон
Антиастеническое	Слабость, вялость, истощаемость, явления психической и физической астении	Пирацетам, пиритинол, пикамилон фенотропил, фенибут, аминалон, инстенон
Седативное (транквилизирующее)	Раздражительность, эмоциональная слабость	Фенибут, пикамилон, пирацетам, пиритинол
Антидепрессивное	Сниженное настроение	Пиритинол, пирацетам, фенотропил, инстенон'
Ноотропное	Нарушение высших корковых функций, снижение уровня суждений, критических возможностей, кортикального контроля, субкортикальной активности	Все классы ноотропных препаратов
Мнемотропное	Нарушение памяти, обучаемости	Все классы ноотропных препаратов
Адаптогенное	Толерантность к различным экзогенным факторам, в том числе к лекарственным средствам	Все классы ноотропных препаратов
Вазовегетативное	Головные боли, головокружение, вегетативная неустойчивость в рамках церебрастенических синдромов	Пирацетам, пиритинол, пикамилон, инстенон, фенотропил, фенибут

При наличии показаний (психические и эмоциональные расстройства, сопровождающиеся страхом, напряжением, возбуждением) назначают нейролептики (антипсихотики). Среди них предпочтительны те, которые в относительно меньшей степени вызывают побочные экстрапирамидные эффекты. Тиоридазин (сонапакс) обладает избирательной антипсихотической активностью и адресуется в основном к состояниям тревоги, страха, выраженной напряженности.

Значительное место в терапевтических программах занимают препараты с антиоксидантной активностью. К их числу относятся: α-липоевая кислота (тиоктовая кислота), метадоксил, мексидол, цитофлавин.

Следует подчеркнуть, что длительное течение процесса нейродегенеративных поражений может сопровождаться развитием аутоиммунного синдрома с участием иммунных факторов и механизмов в альтерации морфологических структур нервной ткани. Это требует применения технологий экстракорпоральной иммунокоррекции или назначения глюкортикоидов, а также иммуносупрессантов.

Библиография

1. Великородная Ю.И., Мамулайшвили Н.И., Почепцов А.Я. Нейротоксические эффекты в центральной нервной системе при хронической интоксикации ФОС (экспериментальное исследование) // Вестник ВолгГМУ. – 2013. - №3. – С. 56-60.

2. Куценко С.А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание. – СПб: ООО «Из-дательство Фолиант», 2004. – 720 с.

3. Atchison W.D., Hare M.F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity // FASEB J. – 1994. – Vol. 8, № 9. – P. 622–629.

4. Ynalvez R., Gutierrez J., Gonzalez-Cantu H. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration // Biometals. – 2016. – Vol. 29, № 5. – P. 781–788.

5. Kozlowski H., Kolkowska P., Watly J., Krzywoszynska K., Potocki S. General aspects of metal toxicity // Curr. Med. Chem. – 2014. – P. 21, № 33. – P. 3721–3740.

6. Angoa-Pérez M., Anneken J.H., Kuhn D.M. Neurotoxicology of synthetic cathinone analogs // Curr Top Behav Neurosci. – 2017. – Vol. 32. – P. 209–230.

7. Chen Y. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies // Neurotoxicology. – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 391–400.

8. Banks C.N., Lein P.J. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation // Neurotoxicology. – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 575–584.

9. Gonçalves J., Baptista S., Silva A.P. Psychostimulants and brain dysfunction: a review of the relevant neurotoxic effects // Neuropharmacology. – 2014. – Vol. 87. – P. 135–149.

10. Carocci A., Rovito N., Sinicropi M.S., Genchi G. Mercury toxicity and neurodegenerative effects // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 2014. – Vol. 229. – P. 1–18

11.Farina M., Rocha J.B., Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies // Life Sci. – 2011. – Vol. 89, № 15–16. – P. 555–563.

12. Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P., Skalnaya M.G., Popova E.V., Sinitskii A.I., Nemereshina O.N., Gatiatulina E.R., Nikonorov A.A., Skalny A.V. Mercury and metabolic syndrome: a review of experimental and clinical observations // Biometals. – 2015. – Vol. 28, № 2. – P. 231–254.

13. Zahir F., Rizvi S.J., Haq S.K., Khan R.H. Effect of methyl mercury induced free radical stress on nucleic acids and protein: Implications on cognitive and motor functions // Indian J. Clin. Biochem. – 2006. – Vol. 21, № 2. – P. 149–152.

14. Ali S.F., LeBel C.P., Bondy S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity // Neurotoxicology. – 1992. – Vol. 13, № 3. – P. 637–648.

15. LeBel C.P., Ali S.F., Bondy S.C. Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1992. – Vol. 112, № 1. – P. 161–165.

16. LeBel C.P., Ali S.F., McKee M., Bondy S.C. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescin diacetate as an index of neurotoxic damage // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1990. – Vol. 104, № 1. – P. 17–24.

17. Shanker G., Aschner J.L., Syversen T., Aschner M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury // Mol. Brain Res. – 2004. – Vol. 128, № 1. – P. 48–57.

18. Русецкая Н.Ю., Бородулин В.Б. Биологическая активность селеноорганических соединений при интоксикации солями тяжелых металлов // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 64, вып. 4. – С. 449–461.

19. Sears M.E. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification – a review // Scientific World Journal. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 219840. – 13 p.

20. Houston M.C. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke // J. Clin. Hypertens. (Greenwich). – 2011. – Vol. 13, № 8. – P. 621–627.

21. Aschner M., Syversen T., Souza D.O., Rocha J.B., Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury

neurotoxicity // Braz J Med Biol Res. – 2007. – Vol. 40, № 3. – P. 285–291.

22. Featherstone D.E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond // ACS Chem. Neurosci. – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 4–12.

23. Kim H.K., Isaacs-Trepanier C., Elmi N., Rapoport S.I., Andreazza A.C. Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat frontal cortex by chronic NMDA administration can be partially prevented by lithium treatment // J. Psychiatr. Res. – 2016. – Vol. 76. – P. 59–65.

24. Yan M., Zhu W., Zheng X., Li Y., Tang L., Lu B., Chen W., Qiu P., Leng T., Lin S., Yan G., Yin W. Effect of glutamate on lysosomal membrane permeabilization in primary cultured cortical neurons // Mol. Med. Rep. – 2016. – Vol. 13, № 3. – P. 2499–2505.

25. Ceccatelli S., Daré E., Moors M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis // Chem. Biol. Interact. – 2010. – Vol. 188, № 2. – P. 301–308.

26. Anderson C.M., Swanson R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions // Glia. – 2000. – Vol. 32, № 1. – P. 1–14.

27. Maragakis N.J., Rothstein J.D. Glutamate transporters in neurologic disease // Arch. Neurol. – 2001. – Vol. 58, № 3. – P. 365–370.

28. Porciúncula L.O., Rocha J.B., Tavares R.G., Ghisleni G., Reis M., Souza D.O. Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain // Neuroreport. – 2003. – Vol. 14, № 4. – P. 577–580.

29. Fonfría E., Vilaró M.T., Babot Z., Rodríguez-Farré E., Suñol C. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells // J. Neurosci. Res. – 2005, - Vol. 79, № 4. – P. 545–553.

30. Juarez B.I., Martinez M.L., Montante M., Dufour L., Garcia E., Jimenez-Capdeville M.E. Methylmercury increases glutamate extracellular levels in frontal cortex of awake rats // Neurotoxicol. Teratol. – 2002. – Vol. 24, № 6. – P. 767–771.

31. Xu F., Farkas S., Kortbeek S., Zhang F.X., Chen L., Zamponi G.W., Syed N.I. Mercury-induced toxicity of rat cortical neurons is mediated through N-methyl-D-Aspartate receptors // Mol. Brain. – 2012. – Vol. 5. – Article 30. – 14 p.

32. Арефьева А.С., Барыгина В.В., Зацепина О.В. Современные представления о влиянии соединений ртути на клеточном и системном уровне (обзор) // Экология человека. – 2010. – № 8. – С. 35–41.

33. Carranza-Rosales P., Said-Fernández S., Sepúlveda-Saavedra J., Cruz-Vega D.E., Gandolfi A.J. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage // Toxicology. – 2005. – Vol. 210, № 2–3. – P. 111–121.

34. Lohren H., Blagojevic L., Fitkau R., Ebert F., Schildknecht S., Leist M., Schwerdtle T. Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2015. – Vol. 32. – P. 200–208.

35. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция (обзор) // Биохимия. – 2004. – Т. 60, вып. 10. – С. 1301–1313.

36. Савицкая М.А., Онищенко Г.Е. Механизмы апоптоза (обзор) // Биохимия. – 2015. – Т. 80, вып. 11. – С. 1613–1627.

37. Branco V., Coppo L., Solá S., Lu J., Rodrigues C.M.P., Holmgren A., Carvalho C. Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to mercury // Redox Biol. – 2017. – Vol. 13. – P. 278–287.

38. Eto K., Takizawa Y., Akagi H., Haraguchi K., Asano S., Takahata N., Tokunaga H. Differential diagnosis between organic and inorganic mercury poisoning in human cases – the pathologic point of view // Toxicol. Pathol. – 1999. – Vol. 27, № 6. – P. 664–671.

39. Philbert M.A., Billingsley M.L., Reuhl K.R. Mechanisms of injury in the central nervous system // Toxicol. Pathol. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 43–53.

40. Takahashi T., Fujimura M., Koyama M., Kanazawa M.,

Usuki F., Nishizawa M., Shimohata T. Methylmercury causes blood-brain barrier damage in rats via upregulation of vascular endothelial growth factor expression // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 1. – Article e0170623. – 10 p.

41. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). – Москва .-1970.- 315 с.

42. Н.А.Лошадкин, Б.А. Курляндский, Г.В. Беженарь, Л.В. Дарьина Военная токсикология.- М.: Медицина, 2006. – 207 с.

43. Mirloy, C.M., J.L. Parai. The histopathology of drugs of abuse. Histopathology. 2011. V. 59, N 4. P. 579–593.

44. Andersen, S.N., K. Skullerud. Hypoxic/ischaemic brain damage, especially pallidal lesions, in heroin addicts. Forensic Sci. Int. 1999. V. 102, N 1. P. 51–59.

45. Oehmichen M., Meissner C., Reiter A., Birkholz M. Neuropathology in non-human im-munodeficiency virus-infected drug addicts: hypoxic brain damage after chronic intravenous drug abuse. Acta Neuropathol. (Berl). 1996. V. 91. N6. P. 642–646.

46. Сорокина, В.В., А.В. Кононов, Е.Г. Поморгайло. Висцеропатология и непосредственные причины 306 смерти при интоксикации опийными наркотиками и генетический полиморфизм CYP и системы цитокинов. Сибирский медицинский журнал. 2011. 26, № 1, вып. 2. С. 49–53.

47. Морозов Г.В., Боголепов Н.Н. Морфинизм. М.: Медицина, 1984. 173 с.

48. Кабдрахманова Г.Б. Клиника и патогенетические механизмы неврологических про-явлений опийной наркомании: Автореф. дис.. докт. мед. наук. Алматы, 2002. 46 с.

49. Колушева, Г.В. Динамика субмикроскопических изменений ткани мозга крыс при хронической морфинной интоксикации и абстиненции: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.11 / М., 1987. 22 с.

50. Колушева, Г.В. Изменение ультраструктуры таламуса при хронической морфинной интоксикации и абстиненции. Невропатология. 1990. Т. 3, № 10. С. 67–71.

51. Дробленков, А.В., Н.Р. Карелина, П.Д. Шабанов. Изменения нейронов и глиоцитов мезоаккумбоцингулярной системы при перинатальном воздействии морфина у крыс. Морфология. 2009. 136, № 6. С. 35–37.

52. Eisch, A.J., M. Barrot, C.A. Schad [et al.]. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. PNAS. 2000. V. 97, N 13. P. 7579-7584.

53. Suto, N., R.A. Wise, P. Vezina. Dorsal as well as ventral striatal lesions affects levels of intravenous cocaine and morphine self-administration in rats. Neurosci. Lett. 2011. V. 493, N 1–2. P. 29–32.

54. Клинцова, А.Ю., Н.А. Уранова, В.В. Истомин [и др.]. Ультраструктура префрон-тальной коры мозга при длительном введении амфетамина. Неврология и психиатрия. 1988. 89, № 7. С. 71–76.

55. Stumm, G., J. Shlegel, T. Shefer [et al.]. Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. FASEB J. 1999. V. 13, N 9. P. 1065–1072.

56. Tong, J., P. Fitzmaurise, Y. Furukawa [et al.]. Is brain gliosis a characteristics of chronic methamphetamine use in the human? Neurobiol. Dis. 2014. V. 67. P. 107–118.

57. Пиголкин, Ю.И. Морфологическая диагностика наркотических интоксикаций в судебной медицине. М.: Медицина, 2004. 304 с.

58. Манекенова, К.Б., Р.Б. Тультаев, Т.М. Омаров. Сравнительная патоморфологическая характеристика экспериментальной токсической энцефалопатии при длительных ингаляциях токсикоманическими веществами. Профилактическая и клиническая медицина. 2011. 1 (39), № 2. С. 240.

59. Maruff, P., C.B. Burns, P. Tyler et al. Neurological and cognitive abnormalities associ-ated with chronic petrol sniffing. Brain. 1988. V. 121, N 10. P. 1903–1917.

60. O'Callaghan, J.P., W.C. Daughtrey, C.R. Clark et al. Health assessment of gasoline and fuel oxygenate vapors: neurotoxicity evaluation. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2014. V. 70, Suppl. 2. P. 35–42.

61. Зайчиков, Д.А. Морфологическая и морфометрическая оценка реакций глии белого вещества головного мозга при некоторых неврологических заболеваниях: автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.03.02 / СПб., 2011. 20 с.

62. Диагностика и медицинская реабилитация в отдаленном периоде профессиональной нейроинтоксикации у пожарных: Пособие для врачей / Сост.: Колесов В.Г., Бодиенкова Г.М., Бенеманский В.В. и др. – Иркутск, 2004. – 36 с.

63. Янно Л.В. Острые отравления веществами нервно-паралитического действия и Рiх отдаленные последствия // Медицина труда и промышленная экология.–1997.–№ 6. – С. 5–7.

64. Безопасность, медицина труда и экология человека при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ: учебное пособие в помощь практическому врачу регионов уничтожения химического оружия / Под ред. А.А. Каспарова, В.Д. Ревы. – М., 2007. – 419 с.

65. Шамрей В.К., Рустанович А.В. Военная психиатрия в схемах, таблицах и рисунках. – СПб., 2000. – 223 с.

66. Ахапкина В.И., Федин А.И., Аведисова А.С., Ахапкин Р.В. Эффективность фенотропила при лечении астенического синдрома и синдрома хронической усталости // Нервные болезни. – 2004. – № 3. – С. 28–32.

67. Дюкова Г.М. Астенический синдром: проблемы диагностики и терапии // Лечение заболеваний нервной системы. – 2012. – Т. 2, № 2 (10). – С. 8–14.

68. Краснов В.Н. Психоорганический синдром как предмет нейропсихиатрии // Доктор.Ру. – 2011. – № 4 (63). – С. 34–42.

69. Софронов Г.А., Александров М.В., Головко А.И. и др. Экстремальная токсикология: Учебник / Под ред. Г.А. Софронова, М.В. Александрова / 2-е изд., исправ. – СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2016. – 256 с.

70. Острые отравления лекарственными средствами и наркотическими веществами. Часть 1 // Е.Ю. Бонитенко, Ю.Ю. Бонитенко, Е.С. Бушуев, С.А. Куценко, А.И. Головко, Т.В. Горбачева, С.П. Нечипоренко / Под ред. проф. Ю.Ю. Бонитенко и проф. С.П. Нечипоренко. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2010. – 440 с.

71. Могош Г. Острые отравления. Диагноз. Лечение. – Бухарест: Медицинское издательство, 1984. – 580 с.
72. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. – М.: Медицина, 1994. – 256 с.
73. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления. – М.: Медицина, 1989. – С. 290–312.
74. Шабанов П.Д. Доказательность нейропротекторных эффектов полипептидных препаратов: нерешенные вопросы // Нервные болезни. – 2011. – № 1(4). – С. 17–20.
75. Афанасьев В.В. Цитофлавин в интенсивной терапии: Пособие для врачей. – СПб., 2005. – 36 с.
76. Васильев С.А. Нейрометаболическая терапия острых тяжелых отравлений: автореф. дис. … д-ра мед. наук / Петербургский НИИ скорой помощи имени И.И. Джанелидзе. – СПб., 2008. – 35 с.
77. Шабанов П.Д. Сукцинатсодержащие нейропротекторы // Поликлиника. – 2014. – № 5–1. – С. 32–34.
78. Чухрова М.Г., Федоров А.В., Захаров В.В. Цитофлавин в комплексном лечении больных с алкагольной зависимостью // Профилактическая и клиническая медицина. – 2005. – № 4. – С. 104–107.
79. Шевчук М.К., Лычаков А.В., Колбасов С.Е., Саватеева Т.Н., Любимов Ю.А., Мелихова М.В., Саватеев А.В. Цитофлавин в экспериментальной терапии хронической алкогольной интоксикации // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2005. – Т. 105, № 6. – С. 80.
80. Ивницкий Ю.Ю., Головко А.И., Софронов Г.А. Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма: Учебное пособие для слушателей факультета руководящего состава медицинской службы. – СПб.: Изд-во ВМедА им. С.М.Кирова, 1998. – 82 с.
81. Виноградов О.И., Даминов В.Д., Рыбалко Н.В. Применение холина альфосцерата (глиатилин) у пациентов с ишемическим инсультом // Новости медицины и фармации. – 2014. – № 518. – С. 17–19.

82. Шабанов П.Д. Доказательность нейропротекторных эффектов полипептидных препаратов: нерешенные вопросы // Нервные болезни. – 2011. – № 1(4). – С. 17–20.

83. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные и нейропротекторные средства // Экспер. и клинич. фармакол. – 2007. – Т. 70, № 4. – С. 44–58.

84. Соловьев В.Б., Генгин М.Т. Роль нейропептидов и ферментов их обмена в адаптационных процессах и регуляции метаболизма при физической работе. – М., 2015. – 220 с.

85. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. – Л.: Медицина, 1986. – 280 с.

86. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. – М.: Медицина, 1982. – 368 с.

87. Cunha-Oliveira T., Rego A.C., Oliveira C.R. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs // Brain Res. Rev. – 2008. – Vol. 58, №1. – P. 192–208.

88. Cheng G.L., Zeng H., Leung M.K., Zhang H.J., Lau B.W., Liu Y.P., Liu G.X., Sham P.C., Chan C.C., So K.F., Lee T.M. Heroin abuse accelerates biological aging: a novel insight from telomerase and brain imaging interaction // Transl. Psychiatry. – 2013. – Vol. 3, № 5. – Article e260. –10 p.

Приложение А

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ РТУТИ В ПРОБАХ КРОВИ АТОМНО-АБСОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ

А.1. Метод измерений

Метод измерений основан на атомизации содержащейся в пробе ртути в процессе термодеструкции пробы при контролируемой температуре, перено се ее потоком газа-носителя в нагреваемую аналитическую кювету анализатора и измерении атомного поглощения при резонансной длине волны 253,7 нм с коррекцией неселективного поглощения на основе эффекта Зеемана.

Массовую долю ртути в пробе определяют с использованием предварительно установленной градуировочной характеристики.

А.2. Требования к показателям точности измерений

Методика измерений обеспечивает получение результатов измерений с погрешностью, не превышающей значений, приведённых в таблице 1.

Таблица А.1 – Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности

Диапазон измерений, мкг/дм^3	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), (r, %)	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), (R, %)	Показатель правильности (границы относительной систематической погрешности при доверительной вероятности P=0.95), (c, %)	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности P=0.95), (%)
От 1,0 до 3,0 включительно	46	55	22	27
От 3,0 до 5,0 включительно	15	18	8	10
От 5,0 до 30,0 включительно	9	11	4	5

Значения показателя точности методики используют при:

– оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;

– оценке деятельности лабораторий на качество проведения измерений;

– оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики измерений в конкретной лаборатории.

А.3. Средства измерений, государственные стандартные образцы, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, государственные стандартные образцы, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

А.3.1. Средства измерений

Анализатор РА-915+ ТУ 4215-951-20506233-99, № по Госреестру 18795-99.

Весы по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,1 мг.

Колбы мерные: 2-500-2, 2-100-2, 2-50-2 по ГОСТ 1770-74.

Пипетки мерные с одной отметкой: 2-2-5, 2-2-10 по ГОСТ 29169-91.

Пипетки градуированные 2-го класса точности объемом 1, 2, 5,10 $см^3$ по ГОСТ 29227-91.

Одноканальная пипетка переменного объема «Классик» (дозатор) объемом 5-50 $мм^3$ ТУ 9452-001-33189998-95.

Одноканальная пипетка переменного объема «Классик» (дозатор) объемом 100-1000 $мм^3$ ТУ 9452-002-33189998-2006.

Цилиндры вместимостью 10 и 500 $см^3$ по ГОСТ 1770-74.

А.3.2. Государственные стандартные образцы

Государственный стандартный образец массовой доли ртути ГСО 8004-93 ООО «ЦСОВВ», концентрация ртути в растворе составляет 1г/$дм^3$.

Стандартный образец следовых количеств элементов в крови, уровень 3 (Seronorm T.Elem. Whole Blood L-3).

А.3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Приставка «ПИРО-915+» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия) и комплект кварцевых ложечек-дозаторов для ввода пробы.

Система для получения ультрачистой воды MilliQ Advantage A 10 (Millipore, Франция).

Шкаф сушильный любой марки, обеспечивающий температуру до 200 ^{0}C.

Одноразовые вакуумные системы для взятия крови, антикоагулянт – гепарин-литий.

Сумка-холодильник, поддерживающая температуру ≤ 4 ^{0}C не менее 4 часов

Холодильный шкаф, поддерживающий температуру холодильной камеры 0-2 ^{0}C, морозильной камеры -18 ^{0}C.

А.3.4. Реактивы

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

Вода для лабораторного анализа, степень чистоты 2 (бидистиллированная или деионизированная) по ГОСТ Р 52501-2005.

Кислота азотная концентрированная, осч. по ГОСТ 11125-84.

Уголь активированный дробленый, например Carbon NWC 12-40 меш (1,70-0,42 мм).

Калий двухромовокислый, чда по ГОСТ 4220-75.

Примечания

1. Бидистиллированную воду получают путем перегонки дистиллированной воды в бидистилляторе или в кварцевом (стеклянном) приборе.

2. Допускается использование других средств измерений и вспомогательного оборудования, с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных. Допускается использование реактивов аналогичной или более высокой квалификации, изготовленных по другой нормативной документации, в том числе импортных.

А.4. Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79, а также требования, изложенные в технической документации на анализатор ртути «РА-915+».

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно

превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005-88. Организация обучения работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90.

А.5. Требования к условиям измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

температура воздуха	(20±5)°С;
атмосферное давление	84,0 – 106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);
влажность воздуха	не более 80 % при температуре 25°С;
напряжение в сети	(220±10) В;
частота переменного тока	(50±1) Гц.

А.6. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное химическое образование или опыт работы в химической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж, освоившего метод в процессе обучения и получившего удовлетворительные результаты при выполнении процедур оперативного контроля погрешности.

А.7. Отбор проб

Отбор, транспортировку и хранение проб крови проводят в соответствии с приложением № 2 к приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 40 от 27.01.2006 г.

Кровь для проведения химико-токсикологических исследований отбирается из поверхностной вены одним из следующих способов:

– самотеком в сухой флакон с раствором гепарина. Отбирается 15 $см^3$ крови в два флакона объемами 10 и 5 $см^3$. Флаконы закрываются стандартной резиновой пробкой, которая фиксируется алюминиевым колпачком. Содержимое флаконов сразу же перемешивается. Флаконы опечатываются и направляются для проведения химико-токсикологических исследований.

– с использованием вакуумных пробирок (одноразовых устройств для ускоренного взятия крови с содержанием гепарина и иглами в двух концов). Один конец вводится в вену, другим прокалывается резиновая мембрана пробирки. Отбирается 15 $см^3$ крови в две вакуумные пробирки вместимостью 5 и 10 $см^3$. Пробирки опечатываются и направляются в лабораторию.

Кровь в сопроводительной документацией направляется

в химико-токсикологическую лабораторию в опечатанных флаконах, в вакуумных пробирках в специальном контейнере в сумке-холодильнике на транспорте медицинской организации в сопровождении медицинского работника, ответственного за доставку биологического материала.

Срок хранения анализируемых образцов крови при температуре 0-2 ^{0}C не более двух суток, далее – при температуре не менее -18 ^{0}C в холодильных шкафах в течение двух месяцев.

А.8. Подготовка к выполнению измерений

А.8.1. Подготовка химической посуды для выполнения измерений

При выполнении измерений необходимо тщательно соблюдать чистоту химической посуды, руководствуясь следующими правилами.

А.8.1.1. Посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и высушивают при температуре от 105 ^{0}C до 120 ^{0}C.

А.8.1.2. Посуду после сильно загрязненных проб дополнительно промывают горячим раствором азотной кислоты (1:1), затем снова ополаскивают дистиллированной водой и сушат при указанной выше температуре.

А.8.1.3. Для каждого раствора необходимо использовать отдельную пипетку. Раствор из колбы наливают в стаканчик и из него набирают в пипетку. Запрещается погружать пипетку во весь объем раствора во избежание загрязнения.

А.8.1.4. Рекомендуется иметь отдельный набор посуды, который используется только для проведения анализов в соответствии с данной методикой измерений.

А.8.2. Приготовление растворов

Растворы готовят на деионизованной или бидистиллированной воде.

А.8.2.1. Приготовление раствора разбавления

В термостойкий стакан помещают 1000-1200 см^3 дистиллированной воды и осторожно приливают, тщательно перемешивая, 100 см^3 концентрированной азотной кислоты (плотность 1,37 г/см^3). Когда раствор остынет, его переносят в мерную колбу вместимостью 2000 см^3, добавляют 400 мг калия двухромовокислого и доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения в емкости из темного стекла с притертой пробкой – 3 мес.

А.8.2.2. Приготовление основного раствора ртути массовой концентрации 1 мг/дм^3

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 помещают 30 см^3 раствора разбавления, дозатором вносят 0,5 см^3 ГСО состава раствора ионов ртути массовой концентрации 1 г/дм^3 и доводят до метки раствором разбавления, тщательно перемешивают.

Срок хранения при температуре от 2^{0}С до 8^{0}С – 3 мес.

А.8.2.3. Приготовление градуировочных растворов

А.8.2.3.1. Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией ртути 100 мкг/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают при помощи пипетки 10 см^3 основного раствора ионов ртути концентрации 1 мг/дм^3, доводят до метки раствором разбавления и тщательно перемешивают.

Раствор устойчив при хранении при температуре от 2^{0}С до 8^{0}С в течение 1 месяца.

А.8.2.3.2. Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией ртути 50 мкг/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают при помощи пипетки 5 см^3 основного раствора ионов ртути концентрации 1 мг/дм^3, доводят до метки раствором разбавления и тщательно перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

А.8.2.3.3. Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией ртути 20 мкг/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают при помощи пипетки 2 см^3 основного раствора ионов ртути концентрации 1 мг/дм^3, доводят до метки раствором разбавления и тщательно перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

А.8.2.3.4. Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией ртути 10 мкг/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают при помощи дозатора 1 см^3 основного раствора ионов ртути концентрации 1 мг/дм^3, доводят до метки раствором разбавления и тщательно перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

А.8.2.3.5. Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией ртути 5 мкг/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают при помощи дозатора 0,5 см^3 основного раствора ионов ртути концентрации 1 мг/дм^3, доводят до метки раствором разбавления и тщательно перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

А.8.2.3.6. Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией ртути 1 мкг/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают при помощи дозатора 1 см^3 градуировочного раствора ионов ртути концентрации 100 мкг/дм^3, доводят до метки раствором разбавления и тщательно перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

А.8.3. Проверка пригодности активированного угля

В ложечку-дозатор помещают от 200 до 300 мг порошка активированного угля и измеряют аналитический сигнал. По завершении регистрации сигнала остатки угля удаляют. Если был зарегистрирован пик аналитического сигнала, то проводят интегрирование аналитического сигнала в пределах пика.

Далее в ложечку дозатор помещают новую порцию порошка активированного угля (200-300 мг) и пипеточным дозатором на него равномерно наносят 10 мм^3 градуировочного раствора ртути с массовой концентрацией ртути 100 мкг/дм^3.

В случае если аналитический сигнал от пробы угля без добавки не превышает 10% от сигнала пробы сравнения, уголь можно считать чистым и использовать для калибровки аналитического комплекса. В противном случае необходимо заменить партию угля или провести его очистку.

Для очистки навеску угля помещают в фарфоровую чашку и прокаливают в муфельной печи при 300^{0}С в течение 3-6 ч. После остывания проводят повторную проверку чистоты порошка активированного угля.

Хранить уголь необходимо в сухой герметично закрывающейся таре.

А.8.4. Подготовка анализатора ртути «РА-915+» к работе

Подготовку анализатора к работе проводят в соответствии с Руководством по эксплуатации. Рекомендуемые температурно-временные режимы работы анализатора при анализе крови приведены в таблице А.2.

Таблица А.2 – Температурно-временные режимы анализа проб крови

Параметр	Значение
Скорость прокачки воздуха, $дм^3$/мин	0,8-1,2
Температура испарителя, ^0C	520-580
Температура аналитической кюветы, ^0C	680-730
Температура дожигателя, ^0C	650-750

А.8.5. Построение градуировочной характеристики

Градуировку анализатора ртути проводят перед началом эксплуатации, после длительных перерывов в работе, а также при отрицательных результатах контроля стабильности градуировочной характеристики.

А.8.5.1. Градуировка анализатора с использованием стандартного образца состава раствора ионов ртути.

А.8.5.1.1. Для построения градуировочной характеристики (ГХ) в ложечку-дозатор проб помещают от 200 до 300 мг активированного угля. Затем пипеточным дозатором равномерно наносят на активированный уголь 100 $мм^3$ градуировочного раствора ртути с массовой концентрацией ртути 1 мкг/$дм^3$ (см. 8.2.3.6). Вводят ложечку-дозатор в устройство для термической деструкции и регистрируют аналитический сигнал в соответствии с руководством по эксплуатации анализатора и руководством пользователя программного обеспечения. По завершении регистрации сигнала удаляют остатки угля из дозатора проб и проводят интегрирование аналитического сигнала в пределах зарегистрированного пика.

Массу ртути mi, нг, в дозируемом объеме градуировочного раствора вычисляют по формуле:

$$m_i = 0{,}001 \cdot C_{гр} \cdot V_{гр},$$

где 0,001 – коэффициент согласования размерности единиц объема;

$C_{гр}$ – массовая концентрация ртути в градуировочном растворе, мкг/$дм^3$;

$V_{гр}$ – дозируемый объем градуировочного раствора, $мм^3$.

А.8.5.1.2. Повторяют процедуры по 8.5.1 с градуировочными растворами ртути концентрации 5,10,20, 50,100 мкг/дм^3 (см. 8.2.3).

А.8.5.2. Градуировка анализатора с использованием стандартного образца состава массовой доли ртути в крови.

А.8.5.2.1. Помещают от 25 до 200 мм^3 стандартного образца состава массовой доли ртути в крови в ложечку-дозатор проб. Вводят дозатор в устройство для термической деструкции и регистрируют аналитический сигнал в соответствии с руководством по эксплуатации анализатора и/или руководством пользователя программного обеспечения.

По завершении регистрации сигнала удаляют остатки стандартного образца из дозатора проб и проводят интегрирование аналитического сигнала в пределах зарегистрированного пика.

Массу ртути в стандартном образце m_i, нг, вычисляют по формуле:

$$m_i = 0{,}001 \cdot C_{co} \cdot V_{co},$$

где 0,001 – коэффициент согласования размерности единиц объема;

C_{co} – аттестованное значение массовой концентрации ртути в растворе стандартного образца состава, мкг/дм^3;

V_{co} – дозируемый объем раствора стандартного образца массовой доли в крови, мм^3.

А.8.5.2.2. Повторяют процедуры по 8.5.2.1, варьируя объем стандартного образца таким образом, чтобы получить не менее четырех результатов измерений.

А.8.5.3. Ввод градуировочного раствора состава раствора ионов ртути для каждой концентрации и стандартного образца состава массовой доли ртути в крови повторяют 5 раз. Программное обеспечение прибора рассчитывает средний аналитический сигнал и относительное стандартное отклонение аналитических сигналов.

А.8.5.4. Градуировочная характеристика выражается прямолинейной зависимостью среднего аналитического сигнала (А, усл.ед.) от массы компонента (m_i, нг) в дозируемой порции градуировочного раствора. В компьютерной программе прибора задана по умолчанию «нулевая» точка ГХ, соответствующая нулю аналитического сигнала и массы элемента.

Градуировочную характеристику считают приемлемой, если:

а) относительное стандартное отклонение аналитических сигналов для каждого градуировочного раствора не превышает 6%;

б) полученное значение массовой концентрации градуировочного раствора отличается от аттестованного значения градуировочного раствора не более чем на 15%.

А.8.6. Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики осуществляется перед анализом серии проб и через каждые 15-20 анализируемых проб. Средствами контроля являются образцы для градуировки (один из приготовленных по п.8.2.3). Градуировочную характеристику считают стабильной при выполнении для контрольного образца для градуировки следующего условия:

$$|X_{гр} - C_{гр}| \leq 0{,}01 \cdot \delta_{гр} \cdot C_{гр}$$

где $X_{гр}$ – результат контрольного измерения массовой концентрации ртути в образце для градуировки, мкг/дм^3;

$C_{гр}$ – аттестованное значение массовой концентрации ртути в образце для градуировки, мкг/дм^3;

$\delta_{гр}$ – относительная погрешность градуировочной характеристики, % ($\delta_{гр}$= 15 %).

Если условие стабильности градуировочной характеристики не выполняется для контрольного образца для градуировки, необходимо выполнить повторное измерение этого образца для исключения результата, содержащего грубую погрешность.

Если градуировочная характеристика нестабильна, выясняют причины и повторяют контроль с использованием других образцов для градуировки, предусмотренных методикой. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики строят новый градуировочный график.

Рекомендуется повторить анализ проб, проанализированных после предыдущего контроля стабильности.

При смене реактивов, длительном перерыве работы прибора осуществляется повторное определение градуировочных характеристик.

А.8.7. Подготовка проб к выполнению измерений

Температура анализируемых проб крови должна соответствовать температуре окружающей среды в лаборатории. Пробы крови должны быть

тщательно перемешаны.

А.9. Обработка результатов измерений

А.9.1. Обработка и хранение результатов измерений проводится с помощью программного обеспечения анализатора.

А.9.2. За результат измерений массовой концентрации определяемого компонента в пробе ($\overline{X}$) принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений X_1 и X_2, полученных в условиях повторяемости:

$$\overline{X} = \frac{(X_1 + X_2)}{2} \qquad (4)$$

для которых выполняется следующее условие:

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r \cdot \overline{X} \qquad (5)$$

где r – значение предела повторяемости для двух результатов параллельных определений, % (таблица 3).

При невыполнении условия (5) необходимо дополнительно получить еще два результата параллельных определений. Если при этом расхождение ($X_{max} - X_{min}$) результатов четырех параллельных определений равно или меньше критического диапазона $CR_{0,95}$ (6), то в качестве окончательного результата принимают среднее арифметическое значение результатов четырех параллельных определений. Значение критического диапазона для четырех результатов параллельных определений рассчитано по формуле (6) и приведено в таблице 3:

$$CR_{0,95}(4) = Q(0{,}95; 4)\,\sigma_t, \qquad (6)$$

где Q (0,95;4) – коэффициент, зависящий от числа результатов единичных определений, полученных в условиях повторяемости и доверительной вероятности 0,95;Q (0,95;4)=3,63;

σ_t – среднеквадратическое отклонение повторяемости, % (таблица А.1).

Если расхождение ($X_{max} - X_{min}$) больше $CR_{0,95}$ (4), в качестве окончательного результата измерений может быть принята медиана четырех результатов параллельных определений. Кроме того, целесообразно выяснить причины появления неприемлемых результатов параллельных определений и устранить их.

А.9.3. Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости.

При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение. Значения предела воспроизводимости приведены в таблице А.3.

При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно раздела 5 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 и МИ 2881-2004.

Таблица А.3 – Диапазон измерений, значения пределов повторяемости, воспроизводимости и критического диапазона при доверительной вероятности Р=0,95

Диапазон измерений, мкг/дм^3	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения для двух результатов параллельных определений), r ,%	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения для четырех результатов параллельных определений), $CR_{0,95}$ (4),%	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения для двух результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости), R,%
От 1,0 до 3,0 включительно	128	166	154
От 3,0 до 5,0 включительно	39	54	46
От 5,0 до 30,0 включительно	26	33	29

А.10. Оформление результатов измерений

Результаты измерений регистрируют в протоколе испытаний.

Результаты измерений массовой концентрации определяемого компонента, мкг/дм^3, представляют в виде (при подтвержденном в лаборатории соответствии аналитической процедуры требованиям настоящего документа):

$$\overline{X} \pm \Delta \text{ мкг/дм}^3 \qquad (7)$$

где – результат измерений массовой концентрации ртути, полученный в соответствии с процедурами разделов 9, 10;

Δ – абсолютная погрешность измерений массовой концентрации ртути, мкг/дм^3, вычисляемая по формуле:

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X} \qquad (8)$$

где δ – относительная погрешность измерений массовой концентрации ртути, по таблице 1, %.

Допустимо результат измерений представлять в виде:

$$\overline{X} \pm \Delta_л \text{ мкг/дм}^3 \qquad (9)$$

при условии $\Delta_л < \Delta$, где $\Delta_л$ – значение показателя точности измерений (доверительные границы абсолютной погрешности измерений), установленное при реализации настоящего метода в лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений.

Примечания

1 При необходимости (в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002, раздел 5.2) для результата измерений указывается количество параллельных определений и способ установления результата измерений.

2 Числовые значения результата измерений оканчиваются цифрой того же разряда, что и значение показателя точности методики измерений (в абсолютных единицах). Результат измерений X выражают числом с одним десятичным знаком в интервале от 1,0 до 10,0 мкг/дм^3, целым числом в интервале от 10 до 100 мкг/дм^3.

А.11. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

А.11.1. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

– оперативный контроль процедуры измерений;

– контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности, погрешности).

А.11.2. Оперативный контроль процедуры измерений проводят на основе контроля внутрилабораторной прецизионности и погрешности.

А.11.2.1. Контроль внутрилабораторной прецизионности осуществляют путем сравнения результатов измерений массовой концентрации определяемого компонента в пробе, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности. Расхождение между результатами

измерений не должно превышать предела внутрилабораторной прецизионности (Rл), выраженного в единицах измеряемых содержаний:

$$|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \le 0{,}01 \cdot R_л \cdot \overline{\overline{X}} \qquad (10)$$

где $\overline{X}_1$, $\overline{X}_2$, – результаты измерений массовой концентрации определяемого компонента, полученные в условиях внутрилабораторной прецизионности, мкг/дм^3;

$\overline{\overline{X}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений массовой концентрации определяемого компонента, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности, мкг/дм^3;

$R_л$ – значение предела внутрилабораторной прецизионности, мкг/дм^3 .

Значение $R_л$ может быть приведено в Протоколе установленных показателей качества результатов анализа при реализации методики измерений в лаборатории.

При невыполнении условия (10) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (10) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

А.11.2.2. Контроль погрешности с использованием метода добавок Величину добавки выбирают в соответствии с требованиями п.5.7 РМГ 76-2004.

Контроль исполнителем процедуры выполнения измерений проводят путем сравнения результата отдельно взятой контрольной процедуры $К_к$ с нормативом контроля К.

Результат контрольной процедуры $К_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \overline{X}' - \overline{X} - C, \qquad (11)$$

где $\overline{X}'$ – результат контрольного измерения массовой концентрации определяемого компонента в пробе с известной добавкой, мкг/дм^3;

$\overline{X}$ – результат контрольного измерения массовой концентрации определяемого компонента в рабочей пробе, мкг/дм^3;

С – величина добавки, мкг/дм^3.

Норматив контроля К рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л,\overline{X}'} + \Delta^2_{л,\overline{X}}} \qquad (12)$$

где $\Delta_{л,\overline{X}'}$, $\Delta_{л,\overline{X}}$ – значения характеристик погрешности результатов измерений, установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие массовой концентрации определяемого компонента

в рабочей пробе с добавкой и в рабочей пробе соответственно, мкг/дм^3:

$$\Delta_{л,\bar{X}'} = 0{,}01 \bullet \delta_{л,\bar{X}'} \bullet X' \qquad (13)$$

$$\Delta_{л,\bar{X}} = 0{,}01 \bullet \delta_{л,\bar{X}} \bullet X \qquad (14)$$

где $\delta_{л,\bar{X}'}$, $\delta_{л,\bar{X}}$ – значения характеристик погрешности результатов измерений, установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие массовой концентрации определяемого компонента в рабочей пробе с добавкой и в рабочей пробе соответственно, в относительных процентах.

Качество контрольной процедуры признают удовлетворительным, при выполнении условия:

$$| К_к | \leq К \qquad (15)$$

При невыполнении условия (15) эксперимент повторяют. При повторном невыполнении условия (15) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Периодичность контроля исполнителем процедуры выполнения измерений, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВОГО СОСТАВА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Б.1. Реактивы и оборудование для выполнения исследований:

1. Уксусная кислота. Acetic acid ReagentPlus®, ≥99% (Sigma-Aldrich).

2. Ацетонитрил для ЖХ-МС. Acetonitrile for LC-MS (Panreac).

3. Гексан для ВЭЖХ. Hexane for HPLC, ≥95% (Merck).

4. Этанол. Ethanol 96% (Merck).

5. Трифторуксусная кислота. Trifluoroacetic acid ReagentPlus®, ≥ 99% (Sigma-Aldrich).

6. Ортофосфорная кислота. Phosphoric acid ACS regent, ≥85 wt. % in H_2O (Sigma-Aldrich).

7. Ацетат бария. Barium acetate ACS reagent, 99% (Sigma-Aldrich).

8. 2,5-Дигидроксибензойная кислота. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (Bruker Daltonics).

9. α-Циано-4-гидроксикоричная кислота. α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonics).

10. Персульфат аммония. Ammonium persulfate ACS reagent, ≥ 98,0% (Sigma-Aldrich).

11. Бикарбонат аммония. Ammonium bicarbonate ReagentPlus®, ≥ 99,0% (Sigma-Aldrich).

12. Акриламид для электрофореза. Acrylamide for electrophoresis ≥ 99% (HPLC), powder (Sigma-Aldrich).

13. N,N'-метиленбисакриламид. N,N′-Methylenebisacrylamide powder, for molecular biology, for electrophoresis, ≥99.5% (Sigma-Aldrich).

14. Трис(гидроксиметил)аминометан. Trizma® base Primary Standard and Buffer, ≥99,9% (titration), crystalline (Sigma-Aldrich).

15. Додецилсульфат натрия. Sodium dodecyl sulfate BioReagent, suitable for electrophoresis, for molecular biology, ≥98,5% (GC) (Sigma-Aldrich).

16. Глицин для электрофореза. Glycine for electrophoresis, ≥99% (Sigma-Aldrich).

17. Тетраметилэтилендиамин. TEMED Electrophoresis Grade, ≥99% (Sigma-Aldrich).

18. Кумасси бриллиантовый синий G. Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich).

19. Трипсин свиной. Trypsin from porcine pancreas, Proteomics Grade, BioReagent, Dimethylated (Sigma-Aldrich).

20. Микроколонки для твердофазной экстракции Millipore® Ziptips (Sigma-Aldrich).

21. Глицерин. Glycerol ACS reagent, ≥99,5% (Sigma-Aldrich).

22. Коктейль ингибиторов протеаз. cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Tablets provided in glass vials (Roche).

23. Коктейль ингибиторов фосфатаз. Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich)/

24. Тритон X-100. Triton™ X-100 for molecular biology (Sigma-Aldrich).

25. Хлорид натрия. Sodium chloride ReagentPlus®, ≥99% (Sigma-Aldrich).

26. Соляная кислота. Hydrochloric acid ACS reagent, 37% (Sigma-Aldrich).

27. Бычий сывороточный альбумин. Bovine serum albumin lyophilized powder, essentially fatty acid free, ≥96% (agarose gel electrophoresis) (Sigma-Aldrich).

28. Дитиотреитол. Dithiotreitol for electrophoresis, ≥99% (Sigma-Aldrich).

29. Йодоацетамид. Iodoacetamide ≥99% (NMR), crystalline (Sigma-Aldrich).

30. Бромфеноловый синий. Bromphenol Blue (Sigma-Aldrich).

31. MALDI-TOF/TOF масс-спектрометр.

32. Спектрофотометр сканирующий Shimadzu UV mini-1240 (Shimadzu).

33. Камера для вертикального электрофореза Mini-Protean® Tetra (Bio-Rad).

34. Программируемый ротатор Multi RS-60 (Biosan).

Б.2. Определение жирных кислот в биологических образцах

Б.2.1. Экстракция жирных кислот из биологических образцов

Б.2.1.1. Экстракция жирных кислот из тканей

Образец ткани (2-5 мг) помещают в агатовую ступку и замораживают в жидком азоте. Пестиком производят гомогенизацию образца и полученный гомогенизат переносят в микропробирку. Добавляют к гомогенизированному образцу 500 мкл н-гексана, интенсивно

перемешивают (60 об/мин) на программируемом ротаторе Multi RS-60 (Biosan, Рига, Латвия) в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем производят центрифугирование (13400 об/мин, 10 мин), после центрифугирования производят отбор органической фазы объёмом 100 мкл в чистую микропробирку для последующего масс-спектрометрического анализа.

Б.2.1.2. Экстракция жирных кислот из биологических жидкостей

Смешивают 200-500 мкл образца биологической жидкости с 200 мкл н-гексана в микропробирке, интенсивно перемешивают (60 об/мин) на программируемом ротаторе Multi RS-60 в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем производят центрифугирование (13400 об/мин, 30 мин), после центрифугирования производят отбор органической фазы объёмом 100 мкл в чистую микропробирку для последующего масс-спектрометрического анализа.

Б.2.2. Масс-спектрометрический анализ

Готовят водные растворы ацетата бария и 2,5-дигидроксибензойной кислоты (DHB) с концентрацией 0,5 мг/мл в деионизованной воде. Смешивают данные растворы в соотношении 1:1, наносят 0,6 мкл полученной смеси на МАЛДИ мишень. Затем 0,6 мкл экстракта из биологического образца в н-гексане наносят 2 раза непосредственно на поверхность капли, сформированной водным раствором смеси ацетата бария и DHB. При нанесении органической фазы наконечник дозатора должен касаться поверхности водного раствора, но не проникать в него. После распределения образца по поверхности капли и высыхания водной фазы, на сформированные монослои наносят 2 мкл 90% (об./об.) водного ацетонитрила с 0,1% (об./об.) трифторуксусной кислотой (ТФУ) и высушивают на воздухе. Масс-спектрометрический анализ проводят с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра; регистрацию масс-спектров осуществляют в режиме рефлектрона с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 150 – 800. Управление работой масс-спектрометра и интерпретацию полученных масс-спектров осуществляют с помощью программного обеспечения.

Б.3. Анализ белкового состава

Б.3.1. Приготовление лизата из ткани

Готовят буфер для лизиса (50 мл):

– 20 mM Tris-HCl pH 7,5;

– 1% (об./об.) Triton X-100;

–150 mM NaCl;

–1 таблетка коктейля ингибиторов протеаз cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail.

Отбирают необходимый для эксперимента объём раствора буфера для лизиса, добавляют к нему требуемое количество коктейля ингибиторов фосфатаз Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 из расчёта 10 мкл коктейля ингибиторов фосфатаз на 1 мл буфера для лизиса. Оставшийся буфер для лизиса расфасовывают по 1 мл, хранят при -20 °С.

Образец ткани помещают в агатовую ступку и замораживают в жидком азоте. Пестиком производят гомогенизацию образца и полученный гомогенизат переносят в пробирку, добавляют к гомогенизированному образцу охлажденный буфер для лизиса (0,5 мл/5 мг ткани). Промывают пестик и ступку 0.5 мл охлажденного буфера для лизиса. Смыв добавляют к образцу. Инкубируют пробирку с суспензией при перемешивании в течение 20 минут при +4°С. Центрифугируют суспензию при 13400 об/мин в течение 10 минут при +4°С. Отбирают полученный супернатант в чистую пробирку. Хранят при -20°С до дальнейшего анализа.

Б.3.2. Измерение концентрации белков по методу Бредфорда

Готовят реактив Бредфорда (100 мл): 10 мг красителя Coomassie blue G-250 растворяют в 5 мл этанола, добавляют 10 мл 85% (об./об.) ортофосфорной кислоты, доводят деионизованной водой до 100 мл. Фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента».

Готовят серию разбавлений раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в деионизованной воде: 5, 10, 25, 50, 100, 150 мкг/мл.

Устанавливают спектрофотометр на длину волны 595 нм. Добавляют в кювету (длина оптического пути - 10 мм) 500 мкл деионизованной воды. Добавляют 2,5 мл реактива Бредфорда, перемешивают раствор. Через 2 мин, помещают кювету в спектрофотометр и измеряют значение коэффициента поглощения раствора, нормируют это значение как нулевую точку.

Проводят измерение коэффициента поглощения разбавлений раствора БСА: смешивают в кювете 500 мкл образца и 2,5 мл реактива Бредфорда, через 2 мин измеряют значение коэффициента поглощения раствора.

Строят калибровочный график зависимости коэффициента поглощения от концентрации белка по значениям, полученным при измерении разбавлений раствора БСА.

Смешивают в кювете 500 мкл лизата ткани и 2,5 мл реактива Бредфорда, через 2 мин измеряют значение коэффициента поглощения раствора.

Рассчитывают концентрацию белков в лизате ткани с помощью калибровочного графика.

Б.3.3. Электрофорез в полиакриламидном геле

Б.3.3.1. Приготовление и заливка гелей

Помещают стеклянные пластины (длинную со спейсерами и короткую) в рамку, фиксируют их с помощью зажимов и закрепляют на заливочном столике.

Готовят раствор 12% разделяющего геля (10 мл):

– акриламид/N,N'-метиленбисакриламид (30% T, 2,67% C) – 4 мл;

– 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 – 2,5 мл;

– деионизованная вода – 3,35 мл;

– 10% (об./об.) додецилсульфат натрия (SDS) – 100 мкл;

– 10% (об./об.) персульфат аммония (ПСА) – 100 мкл;

– тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) – 10 мкл.

Полученный раствор разделяющего геля заливают между стеклами так, чтобы его уровень составлял 75% высоты меньшей стеклянной пластины. Добавляют сверху 200 мкл 70% (об./об.) этанола, оставляют гель застывать.

Готовят раствор 4% концентрирующего геля (5 мл):

– акриламид/N,N'-метиленбисакриламид (30% T, 2,67% C) – 0,67 мл;

– 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 – 1,25 мл;

– деионизованная вода – 3,05 мл;

– 10% (об./об.) SDS – 50 мкл;

– 10% (об./об.) ПСА – 50 мкл;

– ТЕМЕД – 5 мкл.

После застывания разделяющего геля удаляют этанол с его поверхности. Добавляют на поверхность застывшего разделяющего геля раствор концентрирующего геля до верха короткой пластины. Вставляют гребенку. Оставляют гель застывать.

Б.3.3.2. Подготовка электрофорезной камеры и установка пластин с гелем

Ставят электрофорезную камеру на ровную горизонтальную поверхность.

Удаляют пластины с гелем с заливочного стола и закрепляют в электрофорезной камере.

Готовят 5х стоковый раствор электродного буфера: растворяют 15 г Трис, 72 г глицина, 5 г SDS в 1 л деионизованной воды.

Добавляют 1х электродный буфер в электрофорезную камеру так, чтобы уровень электродного буфера на 0,5 см был выше уровня геля.

Удаляют гребенку из геля.

Б.3.3.3. Нанесение образцов и проведение электрофореза

Готовят 2х буфер для образцов:

– 4% (об./об.) SDS;

– 20% (об./об.) глицерин;

– 0,125 М Tris-HCl pH 6,8;

– 10% (об./об.) дитиотреитол (DTT);

– 0,002% (мас./об.) бромфеноловый синий.

Смешивают 2х буфер для образцов с анализируемым раствором в соотношении 1:1. Помещают пробирки с растворами на водяную баню при +95°С на 5 мин.

Наносят по 20 мкл полученных растворов образцов в лунки (в крайнюю лунку наносят маркер молекулярной массы).

Подключают электрофорезную камеру к источнику питания. Проводят электрофорез при постоянном напряжении 80 В для концентрирующего геля и 120 В для разделяющего геля.

По достижению фронта нижнего края геля отключают напряжение.

Удаляют пластинки с гелем из электрофорезной камеры, аккуратно отделяют гель от стеклянных пластинок.

Б.3.3.4. Окраска и отмывка геля

Полученный гель промывают деионизованной водой.

Помещают гель в емкость с раствором для фиксации (5:1:4/этанол: ледяная уксусная кислота : деионизованная вода) на 30 мин.

Переносят гель в емкость с раствором для окрашивания (0.1% (мас./об.) Coomassie blue G-250 в растворе 5:1:4/этанол : ледяная уксусная кислота : деионизованная вода) на 3-4 ч при перемешивании.

Удаляют раствор для окрашивания и помещают гель в раствор для отмывки (5:1:4/этанол: ледяная уксусная кислота: деионизованная вода) на 20 мин при перемешивании. Раствор для отмывки необходимо заменять, когда он приобретает синеватый оттенок. Процедуру отмывки проводят до тех пор, пока не будут видны чёткие синие полосы на прозрачном фоне.

Помещают гель в 5% (об./об.) раствор уксусной кислоты. Хранят при +4°С.

Б.3.4. Ферментативный гидролиз в присутствии трипсина в геле

Помещают гель на чистую стеклянную поверхность. Вырезают скальпелем интересующие окрашенные полоски геля, помещают их в отдельные микропробирки.

К кусочкам геля добавляют раствор для высушивания (50% (об./об.) ацетонитрил, 25 мМ бикарбонат аммония). Пробирки с гелем помещают на шейкер на 15 мин, затем отбирают раствор для обесцвечивания из каждой пробирки. Повторяют процедуру отмывки геля от красителя ещё раз.

Добавляют в пробирки с кусочками геля 100% (об./об.) ацетонитрил и инкубируют 5 мин для удаления из геля избытка воды.

Удаляют ацетонитрил из пробирок, помещают пробирки с кусочками геля в вакуумную центрифугу на 10 мин для сушки.

Для проведения карбамидометилирования белков добавляют в пробирки раствор для восстановления (10 мМ DTT, 50 мМ бикарбонат аммония), инкубируют 45 мин при +56°С. По истечении 45 мин удаляют раствор.

Добавляют в пробирки с гелем 100% (об./об.) ацетонитрил, инкубируют 3 мин, удаляют раствор.

Для проведения алкилирования белков добавляют в пробирки раствор для алкилирования (55 мМ йодацетамида, 50 мМ бикарбонат аммония), инкубируют 45 мин в темноте при комнатной температуре. По истечении 45 мин удаляют раствор.

Добавляют в пробирки с кусочками геля раствор для высушивания, инкубируют 10 мин. Отбирают раствор и добавляют в пробирки 100% (об./об.) ацетонитрил, инкубируют 10 мин. После того, как кусочки геля побелеют, удаляют ацетонитрил и помещают пробирки с гелем в вакуумную центрифугу на 15 мин.

Размораживают емкость с трипсином (20 мкг), добавляют в ёмкость 100 мкл 1мМ HCl. Отбирают из полученного стокового раствора трипсина концентрацией 200 нг/мкл необходимое количество для эксперимента, оставшееся разделяют на аликвоты и хранят при -20°С.

Отобранный для эксперимента раствор трипсина смешивают с 50 мМ бикарбоната аммония в соотношении 1:9 (итоговая концентрация трипсина в растворе – 20 нг/мкл). В пробирки с кусочками геля добавляют полученный раствор трипсина, так чтобы выполнялось соотношение трипсин:белок = 1:40 (мас./мас.). Помещают пробирки в холодильник на 5 мин, чтобы раствор частично впитался в гель, после чего переносят пробирки в термостат при 37°С, инкубируют 18 ч.

По истечении 18 ч добавляют в каждую микропробирку раствор для экстракции (5% (об./об.) ТФУ, 50% (об./об.) ацетонитрил), инкубируют при перемешивании 10 мин, переносят жидкую фазу в чистые микропробирки. Процедуру повторяют трижды, отобранные фракции объединяют.

Полученные экстракты высушивают в вакуумной центрифуге до полного испарения жидкой фазы, затем растворяют в 10 мкл 0,1% (об./об.) ТФУ.

Производят очистку образцов от избытка солей при помощи микроколонок ZipTip (Millipore). Для этого промывают последовательно микроколонку 90% (об./об.) ацетонитрилом и 0,1% (об./об.) ТФУ, наносят образец, промывают микроколонку 0,1% (об./об.) ТФУ и затем элюируют пептиды 70% (об./об.) ацетонитрилом в чистую микропробирку, или непосредственно на МАЛДИ мишень.

Б.3.5. Масс-спектрометрический анализ

Готовят раствор матрицы (α-циано-4-гидроксикоричная кислота) концентрацией 20 мг/мл в 50% (об./об.) ацетонитриле с 0.1% (об./об.) ТФУ. Наносят на мишень 0,7 мкл раствора матрицы, затем в каплю матрицы добавляют 0,7 мкл образца после обессоливания. Аналогично наносят на мишень раствор со стандартами для калибровки. Дают каплям высохнуть на воздухе при комнатной температуре.

Помещают мишень в масс-спектрометр. В программе выбирают ячейку мишени, на которую нанесена калибровочная смесь, производят калибровку прибора, затем выбирают ячейку мишени с нанесенным образцом, осуществляют регистрацию масс-спектра, сохраняют его.

Масс-спектрометрический анализ проводят с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра; регистрацию масс-спектров осуществляют в режиме рефлектрона с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 800 – 4000. Управление работой масс-спектрометра и интерпретацию полученных масс-спектров осуществляют с помощью программного обеспечения.

Открывают сохраненный масс-спектр в программе для обработки масс-спектров, производят разметку пиков. Идентификацию белков по принципу «отпечатка пальцев» и по результатам фрагментного анализа проводят с помощью стационарного программного комплекса MASCOT по базе данных SwissProt.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДСТВ И МЕТОДОВ ПРОФИЛАКТИКИ ПОСЛЕДСТВИЙ ХРОНИЧЕСКИХ НЕЙРОИНТОКСИКАЦИЙ

При исследовании эффективности средств и методов лечения отдаленных последствий острых отравлений, на 31 сутки постинтоксикационного периода отбираются животные, у которых удается выявить признаки отклонений состояния от контрольной группы по поведению и психофизиологическим тестам. Отобранные животные рандомизируются на экспериментальные и контрольную группы, при необходимости выделяют также группу сравнения со стандартной схемой лечения. Период лечения – от 15 до 30 дней в зависимости от специфики исследуемого метода лечения (фармакологического средства). На следующие сутки после прекращения лечения проводится оценка состояния животных (наблюдение за особенностями поведения, выраженность рефлекторных реакций, тесты «Открытое поле», «Экстраполяционное избавление», «Сила хватки лап», УРПИ). Такое же обследование проводится повторно через 7-10 дней после прекращения лечения для оценки стабильности полученного результата.

Полученные в ходе исследования экспериментальные данные сводятся в таблицы и подвергаются статистической обработке. Профилактическое действие тестируемого средства (метода) оценивается по разности между данными контрольной и опытной группы, зарегистрированных на 30 сутки постинтоксикационного периода, а также фоновых значений показателей. Для показателей, отражающих негативное влияние на состояние организма (признаки отдаленных последствий, требующих коррекции), и имеющих максимальную достоверность различий между данными фонового тестирования и контрольной группы, рассчитывается индекс защиты (ИЗ), показывающий, какую часть негативных изменений компенсирует данный способ профилактики. ИЗ(х) – индекс защиты по параметру Х, рассчитывается по формуле:

$$ИЗ(x)=X_3-X_2 / X_2-X_1,$$

где, Х – среднегрупповые значения выбранного показателя для фонового (X_1) исследования, в контрольной (X_2) и экспериментальной (X_3) группах.

Если таких показателей несколько, то может быть рассчитан Индекс профилактической эффективности (ИПЭ) препарата по ИЗ отдельных параметров анализа. Он определяется как векторная сумма по формуле:

$$ИПЭ = \sqrt{\frac{ИЗ(x)^2 + ИЗ(y)^2 + ИЗ(z)^2 + ...}{n \times (n-1)}}$$

где ИЗ(x), ИЗ(y), ИЗ(z) и т.д. – индексы защиты по отдельным параметрам оценки,

n – число таких параметров оценки.

Если значения ИЗ (и ИПЭ соответственно) находятся в диапазоне от 0 до 0,15, то защитный эффект тестируемого препарата оценивается как «отсутствие защитного действия», в диапазоне от 0,16 до 0,29 – как «слабое защитное действие», в диапазоне от 0,30 до 0,59 – как «умеренное защитное действие», более 0,60 – как «выраженное защитное действие».

Если в исследовании был предусмотрен стандартный препарат лечения (препарат сравнения), то профилактическая эффективность тестируемого средства может быть оценена по отношению к этому стандарту.

Для этого рассчитывается Индекс относительной эффективности (ИОЭ) по формуле:

$$ИОЭ = \frac{ИПЭ_1}{ИПЭ_2}$$

где $ИПЭ_1$ – Индекс профилактической эффективности препарата 1,

$ИПЭ_2$ – Индекс профилактической эффективности стандартного препарата (препарата сравнения).

Если целью исследования была оценка лечебного (восстановительного) действия тестируемого средства, она может быть оценена с помощью такого показателя, как Индекс Эффективности (ИЭ). Он рассчитывается по аналогии с ранее описанным Индексом защиты, только используются значения показателя X, полученные на других этапах исследования. Формула его расчета следующая:

$$ИЭ(x) = \frac{X_3 - X_2}{X_2 - X_1}$$

где, X – среднегрупповые значения выбранного показателя на 30 сутки постинтоксикационного периода в контрольной группе (X_1), в конце периода лечения в контрольной (X_2) и экспериментальной (X_3) группах.

По аналогии с Индексом профилактической эффективности (ИПЭ), могут быть получены также Индекс лечебной эффективности (ИЛЭ) как среднеквадратичное значение сумм ИЭ для отдельных показателей, а также ИОЭ при сравнении с эффективностью стандартной схемы терапии отдаленных последствий острых интоксикаций веществами депримирующего действия.

Если значения ИЭ (и ИЛЭ соответственно) находятся в диапазоне от 0 до 0,15, то лечебный эффект тестируемого препарата оценивается как «отсутствие лечебного действия», в диапазоне от 0,16 до 0,29 – как «слабое лечебное действие», в диапазоне от 0,30 до 0,59 – как «умеренное лечебное действие», более 0,60 – как «выраженное лечебное действие».

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

МЕТОДИКА ОКРАСКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РУТИННОЙ ОЦЕНКИ СРЕЗА И ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ЦНС НЕЙРОТОКСИКАНТАМИ

Г.1. Окраска гематоксилином-эозином.

Окраска гематоксилин-эозином – наиболее распространённый метод окрашивания срезов. Этот метод позволяет установить отношения между частями органа, отлично выявляя все клеточные элементы и некоторые неклеточные структуры. Практически во всех случаях независимо от поставленной задачи применяется окраска гематоксилин-эозином. В большинстве случаев для изучения структуры нормального или измененного в результате болезни органа ограничиваются этим методом окраски. В других случаях, когда перед исследователем стоит специальная задача, пользуются особыми методами, окрашивая в то же время параллельно ряд срезов гематоксилин-эозином.

Эта окраска является двойной: гематоксилин – основной краситель – окрашивает ядра клеток, эозин – кислый краситель – красит протоплазму клеток и в меньшей степени – различные неклеточные структуры.

Гематоксилин представляет собой экстракт древесины кампешевого дерева, произрастающего в Америке. Эозин – искусственная краска. Растворы красителей должны быть приготовлены заранее. Гематоксилин сам по себе не является красящим веществом. Для того чтобы приготовить краску, гематоксилин подвергают окислению, в результате чего он превращается в красящее вещество – гематеин. В соединении с некоторыми солями гематеин дает четкое окрашивание ядер (используют гематоксилин Эрлиха, Майера, железный гематоксилин Гейденгайна).

Эозин – протоплазматический краситель; используется он в виде спиртовых или, гораздо чаще, водных растворов. Для приготовления эозина 0,1 г краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Подготовка срезов к окраске заключается в их кратковременной обработке спиртом. Поскольку при заливке в парафин или целлоидин материал обезвоживается в спиртах, срезы, полученные при этих способах заливки, в особой подготовке для окраски гематоксилин-эозином не нуждаются. Обрабатывать необходимо замороженные срезы. При этом происходит их обезжиривание и другие изменения в структуре, что значительно улучшает

окрашивание гематоксилин-эозином. Срезы обрабатывают в 96° спирте не более 3-5 минут. Из спирта срезы переносят обратно в дистиллированную воду. Окраску производят сначала гематоксилином.

Методика окраски

Дистиллированная вода – ополоснуть

Раствор гематоксилина – 1 - 20 мин

Солянокислый спирт – дифференцировка

Аммиачная вода – срезы синеют (контроль под микроскопом)

Проточная вода – 5 - 10 мин

Дистиллированная вода – ополоснуть

Раствор эозина – 10 с - 3 мин

Спирт 96%, карбол-ксилол, заключение

Результат: ядра синие, цитоплазма и межклеточное вещество розовые.

Г.2. Методика выявления миелиновой оболочки по Шпильмейеру.

Данная методика предназначена для элективного окрашивания миелиновых оболочек нервных волокон. Одновременно в белом веществе выявляется дренажная олигодендроглия.

Кусочки хранят в 10% формалине, режут на замораживающем микротоме (толщина срезов 15-20 мкм). Срезы можно хранить также в 10% формалине.

Методика окраски

1. Срезы промывают в 3 сменах дистиллированной воды.

2. Переносят на предметное стекло, смазанное смесью белка с глицерином, и подсушивают на воздухе.

3. Погружают в 2,5% раствор железоаммонийных квасцов на 2 сут (можно дольше) и держат в темном месте.

4. Промывают в 3 сменах дистиллированной воды и обезжиривают в 96% спирте 15 - 30 мин.

5. Помещают в гематоксилин (15 мл гематоксилина Бемера и 85 мл дистиллированной воды) на 1 сут и держат на свету.

6. Промывают в 3 сменах дистиллированной воды и дифференцируют в 2,5% растворе железоаммонийных квасцов (контролируя процесс под микроскопом).

7. Промывают в дистиллированной воде, затем оставляют на 30 мин в проточной воде.

8. Просушивают на воздухе, проводят через ксилол и заключают в бальзам.

Гематоксилин Бемера готовят из двух растворов. Первый раствор: 1 г гематоксилина в 10 мл абсолютного спирта; второй: 8 г алюмокалиевых квасцов растворяют при нагревании в 200 мл дистиллированной воды, после чего раствор остужают и фильтруют. Через 1 сут после приготовления растворы смешивают и дают смеси созреть на свету в широкогорлом открытом сосуде 10-14 сут, после чего фильтруют и добавляют несколько кристаллов тимола.

Раствор железоаммонийных квасцов: 2,5 г железоаммонийных квасцов и 100 мл дистиллированной воды размешать и профильтровать.

Результат: на светлом слегка желтоватом фоне миелиновые волокна темно-серо-синеватого оттенка; ядра дренажной олигодендроглии в белом веществе того же оттенка.

В одном препарате редко удается одновременно выявить касательные (тангенциальные) и проекционные волокна, потому что для выявления миелиновых волокон разных систем (интракортикальные, проекционные и спаечные) требуется различная длительность дифференцировки срезов в железоаммонийных квасцах. В связи с этим одно стекло со срезом, окрашенным гематоксилином, с тем чтобы получить четкую архитектонику волокон, а также тонкую структуру миелиновой оболочки проекционных волокон, нужно более длительно дифференцировать в 2,5% растворе железоаммонийных квасцов, тогда как для выявления архитектоники волокон и структуры миелиновой оболочки касательных (тангенциальных) волокон другое стекло со срезом, окрашенным гематоксилином, погружают в 2,5% раствор железоаммонийных квасцов на более короткий срок. В процессе окрашивания могут появляться артефактные контрастные белые пятна неокрашенной ткани. В таких случаях срезы нужно более длительное время обезжиривать в 96% спирте.

Г.3. Метод Ниссля.

Наряду с импрегнацией серебром широко применяется для изучения нервной ткани, как в норме, так и при патологии. Метод позволяет судить о нормальном состоянии и патологичских изменениях в нервных клетках (флоккуляция тигроида, тигролиз, вакуолизация цитоплазмы и др.), а также в глиальных элементах. Оригинальный метод Ниссля с течением времени претерпел ряд упрощений; вместо него применяют различные

модификации, в частности, так называемый, упрощенный метод Ниссля. Кусочки мозга толщиной до 3-4 мм фиксируют в спирте или в 10-15% формалине. После фиксации кусочки желательно обезжирить в многократно сменяемом в течение нескольких месяцев 96% спирте. Заливку производят в целлоидин или парафин, изготовляя как можно более тонкие срезы. Замороженные срезы из фиксированного формалином материала выдерживают при t°37° в 70% спирте. Срезы окрашивают обычно в растворе толуидинового синего (0,1%), тионина (0,1-1,0%) или крезилового фиолетового (0,5%), добиваясь интенсивной окраски, для чего р-ры можно подогреть. Окраску дифференцируют в 70-96% спирте или в смеси 90 мл 96% спирта с 10 мл свежего анилинового масла, затем препараты проводят через абсолютный спирт и заключают в нейтральный канадский бальзам. Просветление в кайепутовом масле улучшает качество препарата, но при неполном удалении масла срезы вскоре обесцвечиваются. При правильной окраске по методу Ниссля хроматофильное вещество нервной клетки приобретает интенсивно-синий, лиловый или фиолетовый цвет, ядра становятся светлыми или синеватыми, ядрышки темно-синими, хорошо выявляются также глиальные клетки, сосуды и пр. Препараты постепенно выцветают, в связи с чем их рекомендуется хранить в темноте.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ)

Д.1. Метод предназначен для оценки изменения уровня экспрессии целевых генов по отношению к референсному в различных отделах мозга экспериментальных животных при хроническом воздействии нейротоксикантов.

Д.2. Материально-техническое обеспечение испытаний

Работа проводится согласно Методическим указаниям 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Рабочая зона 1 забора материала:

1. Набор дозаторов переменного объема: 20-200 мкл, 100-1000 мкл.
2. Штатив для дозаторов.
3. Штатив для микропробирок 1.5 мл.
4. Штативы для хранения 1,5 мл пробирок с крышкой.
5. Облучатель УФ бактерицидный.
6. Низкотемпературный холодильник (-70..-80°С) для хранения биологического материала.
7. Емкости для дезинфекции пробирок, перчаток, наконечников с дезинфицирующим раствором.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл и до 1000 мкл имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Рабочая зона 2 выделения РНК/ДНК:

1. Холодильник с морозильной камерой (+2..+8°С; -16..-20°С) для хранения реактивов для выделения нуклеиновых кислот.
2. Холодильник с морозильной камерой (+2..+8°С; -16..-20°С) для хранения препаратов нуклеиновых кислот 1 шт.
3. Ламинарный бокс (класс биологической безопасности II) для

выделения ДНК/РНК.

4. Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100°С.

5. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2 мл до 10000 x g с охлаждением.

6. Центрифуга (вортекс.)

7. Набор дозаторов переменного объема: 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл.

8. Штатив для дозаторов.

9. Штатив для микропробирок 1,5 мл.

10. Штативы для хранения 1,5 мл пробирок с крышкой.

11. Аспиратор для удаления надосадочной жидкости с колбой-ловушкой.

12. Наборы реактивов для выделения РНК/ДНК.

13. Облучатель УФ бактерицидный.

14. Емкости для дезинфекции пробирок, перчаток, наконечников с дезинфицирующим раствором.

15. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

16. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 20 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

18. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 мкл и до 200 мкл имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Рабочая зона 3 проведения реакции амплификации и учета ее результатов при использовании флуоресцентного метода детекции в реальном времени:

1. Холодильник с морозильной камерой (+2..+8°С; -16..-20°С) для хранения реактивов реакции амплификации и обратной транскрипции.

2. ПЦР-бокс.

3. Центрифуга (вортекс).

4. Набор дозаторов переменного объема: 0.5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл.

5. Штатив для дозаторов.

6. Штатив для микропробирок 0,2 мл и 1,5 мл.

7. Штативы для хранения 1,5 мл пробирок с крышкой.

8. Наборы реактивов для реакций обратной транскрипции и амплификации.

9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 0,2 мл, 0,5 мл и 1,5 мл имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 20 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

11. Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

12. Облучатель УФ бактерицидный.

13. Емкости для дезинфекции пробирок, перчаток, наконечников с дезинфицирующим раствором.

14. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

Д.3. Дизайн метода

1. Определить орган или ткань для анализа экспрессии гена-мишени.

2. Определить несколько генов домашнего хозяйства (от 3 до 5), которые, согласно литературным данным, имеют постоянный уровень экспрессии в данной ткани.

3. Подобрать РНК-специфичные праймеры мРНК и, желательно, гибризационные зонды, для гена мишени и референс-генов. Условия реакции амплификации должны быть сходными.

4. Выделить РНК.

5. Синтезировать кДНК на РНК-матрице.

6. Оптимизировать условия ПЦР-РВ для получения оптимального сигнала флуоресценции от гена-мишени и референсного гена.

7. Определить наиболее подходящий среди генов домашнего хозяйства референс-ген, то есть нерегулируемый в исследуемой ткани при заданных условиях эксперимента.

8. Выполнить сравнительный количественный анализ.

Д.4. Описание метода

Забор материала проводится в рабочей зоне 1. Материал забирается в чистые одноразовые полипропиленовые пробирки и

немедленно замораживается в жидком азоте с последующим переносом пробирок в низкотемпературный холодильник -70°С. В процессе хранения размораживание не допускается. Возможен забор материала в пробирки содержащие раствор для стабилизации клеточной РНК в тканях.

Выделение РНК проводится в рабочей зоне 2. Наиболее часто для выделения общей РНК используют коммерческие наборы, основанные на методе кислой фенольной экстракции по Хомчинскому (Chomczynski P., Sacchi N., 1981), при котором в водной фазе остается только РНК, а ДНК в комплексе с белками переходит в органическую фазу. В реагент, содержащий водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, добавляют фрагмент замороженной или стабилизированной ткани и проводят ее гомогенизацию. После добавления хлороформа и центрифугирования раствор разделяется на верхнюю водную фазу, содержащую РНК, интерфазу, содержащую ДНК, и органическую фазу, содержащую белки. Для очистки РНК верхнюю водную фазу переносят в чистые пробирки и проводят преципитацию РНК с изопропанолом. Затем осадок дважды отмывают 75% этанолом, сушат и растворяют в необходимом количестве воды, свободной от РНКаз. Готовый препарат РНК немедленно используют в реакции обратной транскрипции или замораживают при -70°С. Перед постановкой реакции обратной транскрипции рекомендуется измерение концентрации и оценка чистоты препарата. Концентрацию РНК определяют спектрофотометрическим методом при длине волны 260 нм. Оценку чистоты препарата проводят спектрофотометрическим методом по отношению коэффициентов поглощения при длине волн 260 нм и 280 нм и методом электрофореза в агарозном геле. Параллельно с выделением РНК из исследуемых образцов следует выделить РНК из воды без РНКаз в качестве отрицательного контроля. Этот отрицательный контроль проходить все этапы анализа параллельно исследуемым образцам в качестве контроля контаминации.

Обратная транскрипция и ПЦР-РВ выполняются в рабочей зоне 3. ПЦР-РВ целевого и референсного генов следует проводить из одного пула кДНК, с целью унификации условий обратной транскрипции для гена-мишени и референсного гена. Для реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ используют коммерческие наборы согласно инструкции производителя. Для детекции флуоресцентного сигнала в ПЦР-РВ целесообразно использовать набор специфичных гибридизационных зондов (например, TaqMan), дизайн которых осуществляется вместе с

дизайном праймеров для реакции. Использование гибридизационных зондов вместо интеркалирующих красителей позволяет повысить специфичность реакции и исследовать экспрессию нескольких генов мишеней и референс-гена в одной пробирке.

Накопление продукта реакции регистрируется в режиме реального времени по росту сигнала флуоресценции. Точка пересечения флуоресценции от мишени и порогового уровня сигнала на графике зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов реакции называется пороговым уровнем (Ct). Для оценки наиболее подходящего референс-гена и расчета относительного уровня экспрессии гена-мишени используется метод ΔΔCt (Livak K., Schmittgen D., 2001).

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.1. Тест «Открытое поле». Методика предназначена для оценки влияния введения нейротоксикантов на нейрофизиологический статус и поведенческие реакции белых нелинейных крыс в тесте «открытое поле».

Е.1.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Е.1.2. Цель испытаний. Оценить отдалённые последствия острых тяжелых отравлений нейротоксикантами на нейрофизиологическое состояние и поведенческие реакции лабораторных животных с акцентом на оценку реакции на внешние раздражители, спонтанную двигательную активность и поведенческие реакции, отражающие развитие тревожно-фобического состояния животных в незнакомой обстановке.

Е.1.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Е.1.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60%, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Е.1.5. Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения: максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001.

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения: максимальная масса – не менее чем 100,0 г., чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001.

3. Установка «Open Field» (TSE, Германия) или аналогичная.

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт.

5. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84.

6. Прямой анатомический пинцет, ГОСТ 21241-89, шт.

7. Набор корнцангов хирургических (2 прямых, 2 изогнутых), ГОСТ 19126-79.

8. Одноразовые шприцы.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Е.1.6. Описание метода.

Крысу помещают в одно и то же место камере и проводят наблюдения в течение 2 минуты с регистрацией параметров поведения. Тестирование проводят в установленный период времени. Общая продолжительность одного тестирования – 2 минуты.

Под продолжительностью тестирования понимается время, складывающееся из 1 минуты экспозиции животного в темной картонной коробке и 2 минут собственно тестирования животного в «открытом поле».

В момент проведения испытаний нельзя шуметь, разговаривать, включать и выключать свет, совершать какие-либо движения, которые могут привлечь внимание животного и, в итоге, повлиять на результаты эксперимента. Недопустимо пребывание в момент тестирования в комнате иных животных, кроме исследуемого в «открытом поле».

Е.1.7. Регистрируемые показатели и расчетные соотношения.

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– вертикальная (стойки) активность (количество актов);

– груминг (количество актов);

– болюсы, дефекации (количество актов);

– средняя скорость, развиваемая животным (см/с);

– среднее расстояние, пройденное животным в течение эксперимента (м);

– общая двигательная активность (количество актов);

– количество движений в центре площадки (количество актов);

– количество движений на периферии площадки (количество актов).

Е.1.8. Оценка результатов.

Оценивают изменение двигательной активности животных по показателям: средняя скорость, развиваемая животным; среднее расстояние, пройденное животным в течение эксперимента; общая двигательная активность. Оценивают изменение ориентировочно-двигательной активности по показателям: стойки.

Оценивают эмоциональную лабильность животных по показателям: количество актов дефекации. Оценивают тревожную составляющую по изменению соотношения показателей: количество движений в центре площадки и количество движений на периферии площадки, груминг. Увеличение данных показателей может интерпретироваться как возбуждающее действие на поведение животных и центральную нервную систему. Снижение данных показателей как угнетающее действие.

Критерием действия препарата на нейрофизиологический статус животного является отклонение определяемых показателей от значений в контроле. При этом снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, времени выхода из центральных квадратов, увеличение времени замирания свидетельствует об угнетении нервной системы животных. Увеличение числа дефекаций груминговых реакций, возрастание длительности груминга указывает на анксиогенный эффект.

Расчёт средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Е.1.9. Отчётность. Отчетным документом является протокол испытаний.

Е.2. Тест «Экстраполяционное избавление».

Методика предназначена для изучения когнитивных функций грызунов в условиях острого стресса.

Е.2.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Е.2.2. Цель испытаний. Оценить последствия острых тяжелых отравлений нейротоксикантами на когнитивные функции лабораторных животных.

Е.2.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Е.2.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60%, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Е.2.5. Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения: максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения – максимальная масса – не менее чем 100,0 г, чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001

3. Установка «Экстраполяционное избавление» («Открытая наука», Россия) или аналогичное

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт.

5. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84

6. Прямой анатомический пинцет, ГОСТ 21241-89, шт.

7. Набор корнцангов хирургических (2 прямых, 2 изогнутых), ГОСТ 19126-79

8. Одноразовые шприцы.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Е.2.6. Описание метода.

Крысу необходимо аккуратно поместить в воду, опустив её внутрь прозрачного цилиндра хвостом вниз. Для этого спокойно возьмите животное правой рукой полным хватом за плечевой пояс и шею. Второй рукой можно взять хвост и направить его внутрь цилиндра (или вложить в правую руку и прижать мизинцем – тогда задние лапки немного поднимутся вверх и животное будет посажено в цилиндр чуть спиной, не цепляясь задними лапами за край цилиндра). Вынимать животное из воды (внешней ёмкости) следует сразу после подныривания.

Е.2.7. Регистрируемые показатели и расчетные соотношения.

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– латентный период начала аверсивных реакций после посадки в установку (секунды);

– число прыжков за тестовый период (количество актов);

– латентный период подныривания (секунды);

– время неподвижности (секунды).

Время тестирования: вплоть до подныривания (но не более 2-х минут).

Е.2.8. Оценка результатов.

Проводится оценка изменения количества прыжков за время наблюдения и латентного периода подныривания в опытных группах животных по сравнению с контрольной (интактной). Снижение латентного периода подныривания в последующие дни после отработки навыка говорит о наличии когнитивных нарушений у животных.

Расчёт средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Е.2.9. Отчётность. Отчетным документом является протокол испытаний.

Е.3. Тест «условная реакция пассивного избегания» (УРПИ).

Метод позволяет оценить состояние процессов обучения и памяти.

Е.3.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Е.3.2. Цель испытаний. Оценить нарушение кратковременной и долговременной памяти при отдаленных последствиях поражении ЦНС нейротоксикантами.

Е.3.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Е.3.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60%, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Е.3.5. Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения:– максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001.

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения – максимальная масса – не менее чем 100,0 г., чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001.

3. Вытянутая пластмассовая камера PACS-30 (Columbus Instruments, США) длиной 50 см, шириной 10 см и высотой 10 см

с электрифицированным решетчатым полом (сила тока силой 1 мА). Стены и потолок одной половины камеры выкрашены в черный цвет, а в другой половине они прозрачны. Или другое аналогичное.

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт.

5. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84.

6. Одноразовые шприцы.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Е.3.6. Описание метода.

1) Исследование норок («норковый рефлекс») – крысу помещают в светлый отсек (хвостом к дверце). Отмечают время пребывания в светлой камере – латентный период первого захода (ЛП0).

2) Обучение – при переходе в тёмный отсек животное там получает болевое электрокожное раздражение через электродный пол.

3) Воспроизведение – через 12 часов и/или 24 часа после обучения (допускается также наблюдение через 36, 48 и 72 часа) отмечают время пребывания животных в отсеках установки.

4) Эксперимент может быть повторён через несколько суток (например на 5, 10 день) при необходимости и по усмотрению экспериментатора.

Е.3.7. Регистрируемые показатели.

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– количество обученных крыс (не зашедших в тёмную камеру) в процентах от общего количества экспериментальных животных;

– латентный период первого захода через 12 и 24 часа после обучения (ЛП12 и ЛП24);

– при дальнейших расчётах можно использовать разницу между латентными периодами (например, ЛП12 – ЛП0 и ЛП24 – ЛП0).

Е.3.8. Оценка результатов.

Проводится оценка изменения количества обученных животных (%), средней продолжительности латентного периода пассивного избегания перехода в опытных группах животных по сравнению с контрольной (интактной). Снижение количества обученных животных и/или латентного периода первого захода говорит о наличии когнитивных нарушений у животных.

Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Е.3.9. Отчётность. Отчетным документом является протокол испытаний

Е.4. Тест «Сила хвата».

Метод позволяет оценить состояние нервно-мышечной функции и мышечной силы при статической нагрузке.

Е.4.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Е.4.2. Цель испытаний. Оценить проявления моторной нейротоксичности как признака отдаленных последствиях поражении ЦНС нейротоксикантами.

Е.4.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Е.4.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60 %, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Е.4.5 Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения: максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения: максимальная масса – не менее чем 100,0 г., чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001

3. Устройство «Grip strength meter» («TSE», Германия) с аппаратно-программным комплексом управления или любой аналогичный.

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт.

5. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84

6. Одноразовые шприцы

При проведении испытаний должны применяться поверенные

средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Е.4.6. Описание метода.

Для проведения испытаний животное аккуратно берут левой рукой за туловище, правой за хвост ближе к корню хвоста и цепляют передними лапами за перекладину или решетку сенсора. Отпускают туловище и тянут правой рукой за хвост по направлению от сенсора параллельно плоскости земли со скоростью 2-3 см/с до момента отрыва лап от перекладины (решетки) сенсора. Записывают результат измерения силы в килограммах и время, когда производилось измерение. Описанную процедуру повторяют три раза с интервалом на отдых и восстановление 30 секунд. Из трёх попыток высчитывают среднее.

Е.4.7. Регистрируемые показатели.

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– максимальная сила хватки в момент, когда животное отцепляется от решётки (граммы).

Е.4.8. Оценка результатов. Статистически значимое снижение показателя «Сила хватки» по сравнению с данными в контрольной группе являются критерием снижения нейромышечной активности. Физиологически это может быть обусловлено нарушением функции центральной нервной системы, процессов обеспечивающих нейромышечное сопряжение на уровне синапса или мышц. Эти данные указывают на токсическое действие препарата.

Также снижение силы хватки интерпретируется как признак моторной нейротоксичности. Также тест «сила хватки» используется для оценки состояния срединного нерва, который у крыс отвечает за хватку передних конечностей, иннервируя все сгибатели пальцев и flexor carpi radialis (лучевой сгибатель запястья).

Расчёт средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Е.4.9. Отчетность. Отчетным документом является протокол испытаний

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ж.1. Тест «Отдёргивание хвоста».

Методика предназначена для оценки болевой чувствительности.

Ж.1.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Ж.1.2. Цель испытаний. Оценить нарушение болевой чувствительности в ответ на тепловой раздражитель при последствиях острых тяжелых отравлений нейротоксикантами.

Ж.1.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Ж.1.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60%, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Ж.1.5. Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения: максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001.

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения: максимальная масса – не менее чем 100,0 г., чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001.

3. Прибор «Tail Flick Analgesia Meter».

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт.

5. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84.

6. Прямой анатомический пинцет, ГОСТ 21241-89, шт.

7. Набор корнцангов хирургических (2 прямых, 2 изогнутых), ГОСТ 19126-79.

8. Одноразовые шприцы.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Ж.1.6. Описание метода.

Крысу помещают в горизонтально расположенный цилиндр соответствующих размеров, сделанный из пластика (с перфорацией), закрепляя при этом хвост животного. Световой пучок большой интенсивности (10 Люкс), генерируемый лампой прибора фокусируется на хвосте до тех пор, пока не происходит отдёргивание хвоста (т.е. когда тепловое воздействие на кожу достигало критического уровня).

Ж.1.7. Регистрируемые показатели и расчетные соотношения.

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:
– время от начала стимуляции до ответной реакции животного (секунды)

Ж.1.8. Оценка результатов.

Критерием снижения болевой чувствительности является увеличение времени отдёргивания хвоста в опытной группе по сравнению с контрольной.

Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Ж.1.9. Отчётность. Отчетным документом является протокол испытаний.

Ж.2 Тест «Условная реакция активного избегания» (УРАИ).

Методика предназначена для оценки процессов обучения и памяти.

Ж.2.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Ж.2.2. Цель испытаний. Оценить нарушение когнитивных процессов при последствиях поражения ЦНС нейротоксикантами.

Ж.2.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Ж.2.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60%, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Ж.2.5. Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения: максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения: максимальная масса – не менее чем 100,0 г., чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001

3. Бассейн размерами 1×1×1 метр с металлическим стержнем, оплетенный веревкой и выступающий из воды на 25 см.

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт

5. Сачки аквариумные с длиной рукоятки не менее 70 см

6. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84

7. Прямой анатомический пинцет, ГОСТ 21241-89, шт.

8. Набор корнцангов хирургических (2 прямых, 2 изогнутых), ГОСТ 19126-79

9. Одноразовые шприцы

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Ж.2.6. Описание метода.

Крысу медленно погружают в воду, причем голова животного обращена в угол бассейна фиксированной точке на окружности контейнера. Животному позволяют плавать до тех пор, пока оно не найдет веревку и не выберется из воды или после истечения 5 минут. Исследование проводят в течение 5 дней.

Ж.2.7. Регистрируемые показатели и расчетные соотношения.

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– латентный период избегания плавания (время от помещения животного в воду до обнаружения оплетённого стержня и выхода из воды).

Ж.2.8. Оценка результатов.

Проводится путем сравнения динамики изменения средней продолжительности латентного периода избегания в группах животных.

Увеличение латентного периода плавания после предварительного

обучения говорит о нарушении процессов памяти. Увеличение латентного периода в процессе обучения на фоне введённого вещества, обладающего влиянием на ЦНС, говорит о нарушении навыка обучения.

Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Ж.2.9. Отчётность. Отчетным документом является протокол испытаний.

Ж.3. Тест «Вращающийся стержень».

Методика предназначена для оценки равновесия, физической выносливости и координации движений.

Ж.3.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Ж.3.2. Цель испытаний. Оценить нарушение равновесия и координации движений при последствиях острых тяжелых отравлений нейротоксикантами.

Ж.3.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Ж.3.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60%, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Ж.3.5. Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения: максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения: максимальная масса – не менее чем 100,0 г., чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001

3. Прибор «Rotarod» (Ugo Basile, Италия) или аналогичный прибор

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт

5. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84

6. Прямой анатомический пинцет, ГОСТ 21241-89, шт.

7. Набор корнцангов хирургических (2 прямых, 2 изогнутых), ГОСТ 19126-79

8. Одноразовые шприцы

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Ж.3.6. Описание метода.

За сутки до первого контрольного тестирования проводят маркировку крыс, используя сквозную нумерацию. Непосредственно в день тестирования крыс взвешивают и переносят в клетках, в которых они живут, в помещение, где стоит прибор. Включают прибор и дают адаптироваться животным в течение 30 минут. После этого животных помещают на вал, вращающийся со скоростью 6 об./мин. и дают 5-6 секунд адаптироваться к экспериментальным условиям. Затем начинают эксперимент, в котором скорость вращения вала увеличивается на 0,5 об./мин. каждую последующую секунду до момента падения животного с вала. В процессе тестирования экспериментатор не должен приближаться к прибору ближе, чем на 1,5-2 метра, так как это привлекает внимание животных и может повлиять на результаты. Регистрируют время удержания животным равновесия на валу и скорость вала на момент падения крысы. Результат заносят в протокол. Животных пересаживают в клетку и дают восстановиться в течение 30 минут. После этого проводят повторное тестирование.

Ж.3.7. Регистрируемые показатели и расчетные соотношения.

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– время удержания животного на валу комплекса типа «Rotarod» в секундах;

– скорость вращения вала на момент падения животного в оборотах/минуту (об/мин).

Ж.3.8. Оценка результатов.

Критерием нарушения моторной координации животного является снижение определяемых показателей от значений в контроле. При этом снижение времени удержания на валу и скорости на момент падения, свидетельствует об ухудшении функции вестибулярного аппарата

и нейромышечного статуса животных.

Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Ж.3.9. Отчётность. Отчетным документом является протокол испытаний.

Ж.4. Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ).

Методика предназначена для оценки тревожности. Используется баланс между естественным страхом животного перед открытым пространством, высотой, новизной (неофобия) и одновременным стремлением исследовать эти незнакомые условия.

Ж.4.1. Объект испытаний. Объектом испытаний являются нейротоксические агенты.

Ж.4.2. Цель испытаний. Оценить состояние тревожности при последствиях острых тяжелых отравлений нейротоксикантами.

Ж.4.3. Группы животных. Опыт 1 (тестируемый нейротоксикант). Контроль (растворитель).

Ж.4.4. Требования к параметрам окружающей среды. Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°С до плюс 24°С, при относительной влажности воздуха до 40-60%, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0…1,5 м/с.

Ж.4.5. Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний.

Перечень рекомендуемого оборудования:

1. Прецизионные весы для взвешивания животных (пределы измерения: максимальная масса – 1000,0 г, чувствительность – не менее 0,1 г), ГОСТ 24104-2001

2. Весы для взвешивания препаратов рецептур (пределы измерения: максимальная масса – не менее чем 100,0 г., чувствительность – не менее 0,1 мг), ГОСТ 24104-2001

3. Прибор «приподнятый крестообразный лабиринт» с программным обеспечением «Multi-Varimex» (Columbus Instruments, США) или аналогичный прибор

4. Источник света, мощностью не менее 100 Вт

5. Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-2б-г-010», ГОСТ 3309-84

6. Прямой анатомический пинцет, ГОСТ 21241-89, шт.

7. Набор корнцангов хирургических (2 прямых, 2 изогнутых), ГОСТ 19126-79

8. Одноразовые шприцы

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

Ж.4.6. Описание метода.

Крыс (мышей) помещают на центральную площадку лабиринта, мордой к открытым рукавам. В течение 5 минут наблюдают за поведением животного. После каждой процедуры (перед посадкой следующего животного) необходимо протирать влажной салфеткой, а затем сухой стенки и дно лабиринта. В момент проведения испытаний нельзя шуметь, разговаривать, включать и выключать свет, совершать какие-либо движения, которые могут привлечь внимание животного и, в итоге, повлиять на результаты эксперимента.

Ж.4.7. Регистрируемые показатели:

– число входов в открытые и закрытые рукава;

– время нахождения в открытых и закрытых рукавах (сек);

– акты выглядывания из закрытых рукавов;

– акты свисания с закрытых рукавов;

Ж.4.8. Оценка результатов.

Более тревожные животные предпочитают закрытые рукава. Для оценки используют также процентное соотношение количества выходов в открытые рукава и/или времени пребывания в открытых рукавах к общему числу выходов. Преобладание кол-ва выходов на открытые рукава и времени пребывания на открытых рукавах говорит об отсутствии тревожности у животных.

Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

Ж.4.9. Отчётность. Отчетным документом является протокол испытаний.

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное медико-биологическое агентство
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУН ИТ ФМБА России)

СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦИИ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГРУППА 21. Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

Экспериментальное моделирование поражений ЦНС при хронических воздействиях веществами нейротоксического действия

Методические рекомендации

ФМБА России МР 21. _____

Директор Института, д.м.н. М.Б. Иванов

Заместитель директора Института по научной работе, д.м.н. В.Л. Рейнюк

Главный метролог И.В. Александрова

Исполнители:

Научный руководитель – заведующий лабораторией, д.м.н. В.А. Кашуро

Ответственный исполнитель – заведующая лабораторией, к.м.н. Н.В. Лапина

Ответственный исполнитель ведущий научный сотрудник, к.б.н. Е.Г. Батоцыренова

главный научный сотрудник, д.м.н. профессор Е.Б. Шустов

ведущий научный сотрудник, д.м.н., профессор В.К. Козлов

ведущий научный сотрудник, д.м.н., профессор А.И Головко

ведущий научный сотрудник д.м.н. Б.С. Литвинцев

ведущий научный сотрудник к.м.н. Д.В. Горбунов

ведущий научный сотрудник, к.м.н. С.В. Степанов