

УДК 612.812.6

КОРРЕКЦИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЦИТОСТАТИКОВ НА ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ ФИТОЭКСТРАКТА ВОЛОДУШКИ ЗОЛОТИСТОЙ (*BUPLEURUM AUREUM*)

© Ю.В. Мазаева, Е.В. Малышева

Ключевые слова: мыши; метотрексат; психофизиологические функции; володушка золотистая; *Bupleurum aureum*.

Рассматривается компенсация последствий химиотерапии с помощью фитоекстракта володушки золотистой (*Bupleurum aureum*). Показано повышение уровня тревожности, ослабление ориентировочно-исследовательских реакций и изменение эмоционально-фобического состояния у интактных мышей после введения метотрексата. Применение фитоекстракта володушки золотистой корригирует действие метотрексата на психофизиологические функции мышей.

ВВЕДЕНИЕ

Последствия иммуносупрессии вследствие заболевания или применяемого лечения сильно влияют на работу некоторых органов и систем организма, вышшую нервную деятельность. Это отрицательно отражается на процессе выздоровления и качестве проводимой терапии. Категории лиц с ослабленным иммунитетом, особенно онкологические больные, для которых идет двойная нагрузка, нуждаются в коррекции последствий заболевания и проводимого лечения – у большинства «нет сил на борьбу и надежду». К сожалению, данной проблеме в науке уделяют мало внимания.

Цель исследования – изучение «следового» влияния микродоз цитостатиков на психофизиологические функции лабораторных мышей, а также исследование компенсации нарушения когнитивных и сенсорно-моторных функций с помощью фитоекстрактов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на белых беспородных лабораторных мышах, самках и самцах в возрасте 3,5–5 месяцев в количестве 60 особей. Подопытных животных содержали в условиях вивария (с естественным режимом освещения; при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха 40–50 %) с использованием стандартной диеты (ГОСТ Р 50258-92). Исследования проводили в соответствии с правилами качественной лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ, а также правилами и Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986).

Было сформировано 3 группы по 20 животных: одна контрольная (К) и две экспериментальных (Э1 и Э2). В экспериментальных группах однократно каждой мышью в хвостовую вену вводился метотрексат в микродозе 0,025 мг, разведенный физиологическим рас-

твором. Метотрексат – цитостатический препарат из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты. Оказывает выраженное иммуносупрессивное действие даже в относительно низких дозах, не обладающих заметной гематологической токсичностью. Благодаря этому метотрексат шире, чем другие цитостатики с иммуносупрессивной активностью, применяется в качестве подавляющего иммунитет препарата. В контрольной группе в хвостовую вену вводился только один физиологический раствор без цитостатика. Инъекция проводилась инсулиновым шприцом; хвост мыши предварительно помещали в теплую воду на 2 мин. для лучшего притока крови. Мышь фиксировалась в специальной камере, и после обеззараживания места инъекции вводился препарат [1], место укола обрабатывали антисептиком.

В одной экспериментальной группе (группа Э2) на фоне введения цитостатика мыши получали фитоекстракт володушки золотистой (*Bupleurum aureum*).

Перед проведением эксперимента животные проходили карантин в течение 1 месяца. Все животные были промаркированы индивидуальными номерами внутри группы и разделены по полу во время проведения карантина и на протяжении всего эксперимента. Все исследования проводились синхронно, при одинаковых условиях содержания и кормления. Оценивались результаты индивидуальных изменений внутри каждой группы и сравнивались их процентные различия с другими группами. Выведение мышей из опыта осуществлялось методом цервикальной дислокации.

В качестве биологического объекта для изучения и объективной оценки изменения индивидуальных психофизиологических функций внутри группы были взяты беспородные мыши. Они более приближены к человеку по психофизиологическим данным, в отличие от породистых мышей, несущих определенные генетически закрепленные признаки, которые могут отражаться на психофизиологическом профиле, скрадывая общую картину воздействия, выявляя изменения, характерные лишь для этой группы.

Во всех группах оценивались показатели психофизиологических тестов: «Приподнятый крестообразный лабиринт» – для оценки психической работоспособности; «Темно-светлая камера» – для исследования тревожности; «Подвешивание за хвост» – для оценки антистрессорной активности; «Удерживание на горизонтальной сетке» – для оценки побочного действия на мышечную силу, выносливость и координацию. Психофизиологические тесты проводились в утренние часы дважды – до начала эксперимента и после инъекций в течение недели. Все исследования в контрольных и экспериментальных группах проводились синхронно, при одинаковых условиях содержания и кормления.

Оценивались результаты индивидуальных изменений внутри каждой группы и сравнивались их процентные различия с другими группами.

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программы «Statistica 6.1».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов показал следующее. Фоновые показатели психофизиологических тестов в группах не отличались (табл. 1).

При проведении теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» изучались такие показатели, как латентный период захода в закрытый рукав, общее время нахождения на свету, свешивания с открытых рукавов лабиринта, выходы на открытые рукава, выглядывания из закрытых рукавов лабиринта, стойки на свету, умыкания – груминг.

Этот тест предназначен для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить: уровень тревожности животного по предпочтению темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамике поведения «выглядывания». В контрольной

группе при повторном тестировании существенных изменений показателей данного теста не наблюдалось, за исключением увеличения количества свешиваний из открытого рукава, что говорит об уменьшении тревожности (табл. 2). В экспериментальной группе Э2 (метотрексат + володушка золотистая) изменения были также незначительными.

В экспериментальной группе Э1 (с введением метотрексата) достоверно снизилось количество свешиваний из открытых рукавов, количество выходов в открытые и закрытые рукава, снизилось общее время, проведенное в открытых рукавах; достоверно увеличилось общее время, проведенное в закрытых рукавах, и количество болюсов (табл. 3). Это свидетельствует о повышении уровня тревожно-фобического состояния и ослаблении ориентировочно-исследовательских реакций у мышей после введения цитостатика [2].

Тест «Темно-светлая камера» применяется в настоящее время как основная модель оценки тревожного поведения грызунов. Камера состоит из темного и «безопасного» отсека и ярко освещенного открытого отсека, образующего, таким образом, зону «отвращения». Интервал времени, проведенного в темном отсеке, коррелирует с уровнем тревожности, тогда как число выходов и время обследования освещенного отсека – показатели склонности к риску и исследовательской активности [3]. В экспериментальной группе Э1 достоверно увеличилось общее время пребывания в темном отсеке и латентное время выхода всеми лапами в светлый отсек; достоверно снизилось общее время пребывания в светлом отсеке и количество выходов, что свидетельствует о повышении уровня тревожности. В экспериментальной группе Э2 достоверно увеличилось общее время пребывания в темном отсеке и время выхода всеми лапами в светлый отсек, достоверно снизилось общее время, проведенное в светлом отсеке, и время и количество выходов в светлый отсек (табл. 4).

Таблица 1

Показатели психофизиологических тестов до эксперимента

Показатели тестов		Группа К	Группа Э1	Группа Э2
		М ± σ	М ± σ	М ± σ
Тест «Подвешивание за хвост»	время входа в неподвижное состояние (с)	39,23 ± 21,00	25,91 ± 18,80	42,91 ± 26,93
	общее время неподвижного состояния (с)	119,12 ± 36,98	138,21 ± 38,52	160,61 ± 26,53
Тест «Удержание на горизонтальной сетке»:				
среднее время удержания (с)		7,64 ± 5,23	14,23 ± 14,67	14,81 ± 17,32
Тест «Темно-светлая камера»	общее время в темном отсеке (с)	225,91 ± 47,58	198,21 ± 26,49	224,51 ± 46,64
	выход всеми лапами в светлый отсек (с)	38,41 ± 32,19	51,71 ± 19,52	51,81 ± 50,03
	количество выходов	5,41 ± 3,35	5,00 ± 2,43	5,81 ± 4,27
	общее время в светлом отсеке (с)	74,11 ± 47,58	93,81 ± 33,95	75,51 ± 46,64
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»	количество выходов в открытый рукав	4,41 ± 1,73	6,71 ± 3,44	5,51 ± 3,35
	груминг (количество)	1,11 ± 1,08	2,21 ± 1,29	1,61 ± 0,97
	выглядывание из темного рукава (количество)	8,61 ± 3,62	4,51 ± 3,48	6,61 ± 5,55
	свешивание из светлого рукава (количество)	6,11 ± 3,88	11,51 ± 8,38	8,31 ± 8,13
	общее время в светлом рукаве (с)	64,11 ± 42,48	74,91 ± 39,98	50,21 ± 28,61
	латентный период захода в темный рукав (с)	12,91 ± 5,35	16,91 ± 18,68	60,61 ± 68,24
	общее время в темном рукаве (с)	115,91 ± 42,48	105,11 ± 39,98	129,81 ± 28,61
	болюсы (количество)	0,81 ± 1,29	0,21 ± 0,42	2,21 ± 2,53
	количество выходов в закрытый рукав	7,00 ± 2,80	6,00 ± 2,98	6,61 ± 4,25

Таблица 2

Изменение психофизиологических показателей мышей контрольной группы

Показатели тестов		До эксперимента	После эксперимента	$\Delta\%$
		$M \pm \sigma$	$M \pm \sigma$	
Тест «Подвешивание за хвост»	время входа в неподвижное состояние (с)	$39,23 \pm 21,00$	$44,56 \pm 34,82$	13,59
	общее время неподвижного состояния (с)	$119,12 \pm 36,98$	$123,34 \pm 53,20$	3,55
Тест «Удержание на горизонтальной сетке»: среднее время удержания (с)		$7,64 \pm 5,23$	$14,23 \pm 14,67$	86,26
Тест «Темно-светлая камера»	общее время в темном отсеке (с)	$225,91 \pm 47,58$	$225,89 \pm 51,47$	-0,01
	выход всеми лапами в светлый отсек (с)	$38,41 \pm 32,19$	$119,78 \pm 75,23$	211,85*
	количество выходов	$5,41 \pm 3,35$	$4,34 \pm 2,12$	-19,78
	общее время в светлом отсеке (с)	$74,11 \pm 47,58$	$74,12 \pm 51,46$	0,02
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»	количество выходов в открытый рукав	$4,41 \pm 1,73$	$7,23 \pm 1,93$	63,95*
	груминг (количество)	$1,11 \pm 1,08$	$1,45 \pm 0,86$	30,64
	выглядывание из темного рукава (количество)	$8,61 \pm 3,62$	$11,23 \pm 5,27$	30,43
	свешивание из светлого рукава (количество)	$6,11 \pm 3,88$	$10,89 \pm 3,93$	78,24*
	общее время в светлом рукаве (с)	$64,11 \pm 42,48$	$58,00 \pm 20,33$	-9,54
	латентный период захода в темный рукав (с)	$12,91 \pm 5,35$	$10,89 \pm 4,87$	-15,65
	общее время в темном рукаве (с)	$115,91 \pm 42,48$	$122,00 \pm 20,31$	5,26
	болюсы (количество)	$0,81 \pm 1,29$	$1,23 \pm 1,27$	51,86
	количество выходов в закрытый рукав	$7,00 \pm 2,80$	$6,45 \pm 2,34$	-7,86

Примечание: * – достоверность изменений при $p < 0,05$.

Таблица 3

Изменение психофизиологических показателей мышей экспериментальной группы Э1

Показатели тестов		До эксперимента	После эксперимента	$\Delta\%$
		$M \pm \sigma$	$M \pm \sigma$	
Тест «Подвешивание за хвост»	время входа в неподвижное состояние (с)	$25,91 \pm 18,80$	$23,91 \pm 14,42$	-7,72
	общее время неподвижного состояния (с)	$138,21 \pm 38,52$	$161,81 \pm 38,97$	17,08
Тест «Удержание на горизонтальной сетке»: среднее время удержания (с)		$14,81 \pm 17,32$	$10,24 \pm 5,59$	-30,86
Тест «Темно-светлая камера»	общее время в темном отсеке (с)	$198,21 \pm 26,49$	$275,51 \pm 23,21$	39*
	выход всеми лапами в светлый отсек (с)	$51,71 \pm 19,52$	$169,91 \pm 129,21$	228,59*
	количество выходов	$5,00 \pm 2,43$	$2,81 \pm 2,56$	-43,8*
	общее время в светлом отсеке (с)	$93,81 \pm 33,95$	$24,51 \pm 23,21$	-73,88*
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»	количество выходов в открытый рукав	$6,71 \pm 3,44$	$2,61 \pm 3,01$	-61,11*
	груминг (количество)	$2,21 \pm 1,29$	$2,00 \pm 1,21$	-9,51
	выглядывание из темного рукава (количество)	$4,51 \pm 3,48$	$3,21 \pm 3,00$	-28,82
	свешивание из светлого рукава (количество)	$11,51 \pm 8,38$	$1,41 \pm 2,07$	-87,75*
	общее время в светлом рукаве (с)	$74,91 \pm 39,98$	$32,00 \pm 20,28$	-57,29*
	латентный период захода в темный рукав (с)	$16,91 \pm 18,68$	$32,11 \pm 43,34$	89,89
	общее время в темном рукаве (с)	$105,11 \pm 39,98$	$148,11 \pm 20,29$	40,91*
	болюсы (количество)	$0,21 \pm 0,42$	$1,21 \pm 1,44$	476,20*
	количество выходов в закрытый рукав	$6,00 \pm 2,98$	$3,91 \pm 1,08$	-34,84*

Примечание: * – достоверность изменений при $p < 0,05$.

Таблица 4

Изменение психофизиологических показателей мышей экспериментальной группы Э2

Показатели тестов		До эксперимента	После эксперимента	Δ%
		$M \pm \sigma$	$M \pm \sigma$	
Подвешивание за хвост	время входа в неподвижное состояние (с)	$42,91 \pm 26,93$	$30,31 \pm 15,14$	-29,37
	общее время неподвижного состояния (с)	$160,61 \pm 26,53$	$143,51 \pm 34,03$	-10,65
Удержание на горизонтальной сетке: среднее время удержания (с)		$15,07 \pm 11,73$	$12,58 \pm 9,75$	-16,53
Темно-светлая камера	общее время в темном отсеке (с)	$224,51 \pm 46,64$	$263,11 \pm 26,66$	17,19*
	выход всеми лапами в светлый отсек (с)	$51,81 \pm 50,03$	$114,31 \pm 95,40$	120,64
	количество выходов	$5,81 \pm 4,27$	$4,00 \pm 3,47$	-31,16
	общее время в светлом отсеке (с)	$75,51 \pm 46,64$	$38,23 \pm 27,92$	-49,38*
Приподнятый крестообразный лабиринт	количество выходов в открытый рукав	$5,51 \pm 3,35$	$6,91 \pm 3,39$	25,41
	груминг (количество)	$1,61 \pm 0,97$	$1,11 \pm 0,57$	-31,06
	выглядывание из темного рукава (количество)	$6,61 \pm 5,55$	$7,11 \pm 5,59$	7,57
	свешивание из светлого рукава (количество)	$8,31 \pm 8,13$	$7,91 \pm 3,55$	-4,82
	общее время в светлом рукаве (с)	$50,21 \pm 28,61$	$53,41 \pm 17,60$	6,38
	латентный период захода в темный рукав (с)	$60,61 \pm 68,24$	$19,81 \pm 19,20$	-67,32
	общее время в темном рукаве (с)	$129,81 \pm 28,61$	$126,61 \pm 17,60$	-2,47
	болюсы (количество)	$2,21 \pm 2,53$	$1,11 \pm 1,60$	-49,78
	количество выходов в закрытый рукав	$6,61 \pm 4,25$	$6,41 \pm 2,07$	-3,03

Примечание: * – достоверность изменений при $p < 0,05$.

Методика «Подвешивание за хвост» позволяет оценить мотивацию и стрессоустойчивость грызунов. Животные с депрессивноподобным состоянием характеризуются быстрым входом в неподвижное состояние (иммобильность) и значительным временем, проведенным без движения [4]. В нашем исследовании при вторичном тестировании в контрольной группе (табл. 2) увеличивалось время входа в неподвижное состояние, что рассматривается как благоприятная реакция. Мыши экспериментальных групп входили в иммобильное состояние быстрее. При этом динамика в группе Э1 была более выражена, чем в группе Э2.

Тест «Удержание на горизонтальной сетке» используется для определения мышечного тонуса и выносливости мышей [5]. Среднее время удержания на горизонтальной сетке в контрольной группе увеличилось, а в экспериментальной группе Э1 уменьшилось, что указывает на снижение выносливости. В экспериментальной группе Э2 время удержания снизилось в меньшей степени, чем в группе Э1.

Таким образом, в контрольной группе изменения были минимальными. Достоверно изменяются психофизиологические функции: повышается тревожность, снижается выносливость и ориентировочно-исследовательские реакции у мышей, получавших микродозы цитостатика. В цитостатических группах встречались случаи судорог; изменения состояния кожных покровов в виде изъязвлений, ранок и язв; внешний вид глаз у некоторых приобретал выпученную форму, что до начала эксперимента не наблюдалось, и может объясняться происходящими отрицательными изменениями в сосудах глазного дна и изменениями в деятельности гормональной системы; встречались явные случаи поражения нервной системы, выраженные изменением

походки мыши в виде постоянного патологического «кружения по типу юлы», изменением наклона туловища тела или головы в какую-либо сторону. В группах, получавших цитостатик, изменяется характер поведенческих реакций, животные становятся агрессивными или появляются признаки апатии. В группе Э2, получавшей фитоэкстракт володушки золотистой, наблюдается коррекция психофизиологических функций, которые приближены к соответствующим показателям контрольной группы.

Волoduшка обладает желчегонным, антисептическим, противовоспалительным, ранозаживляющим, жаропонижающим и тонизирующим действием. Настой володушки изменяет химический состав желчи, повышая содержание в ней желчных кислот, билирубина и холестерина. Оказывает общеукрепляющее действие на весь организм, способствует улучшению обменных процессов [6].

ВЫВОДЫ

1. У мышей, получавших микродозы цитостатика метотрексата, повышается тревожность, снижается выносливость и стрессоустойчивость, угнетаются ориентировочно-исследовательские реакции.

2. При одновременном применении метотрексата и фитоэкстракта володушки золотистой (*Bupleurum auratum*) психофизиологический статус мышей меняется в незначительной степени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Suckow M.A., Danneman P., Brayton C. The Laboratory mouse. Boca Raton; London; New York; Washington: CRS Press, 2001. 167 p.

2. *Espejo E.F.* Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety // *Behavioural Brain Research*. 1997. V. 86. № 1. P. 105.
3. *Takao K., Miyakawa T.J.* Light/dark transition test for mice // *J. Vis. Exp.* 2006. I. 1. e104, doi:10.3791/104.
4. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* / ed. J.J. Buccafusco. Boca Raton (FL): CRS Press, 2009.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р.У. Хабриева. М., 2005.
6. *Буданцев А.Л., Лесиовская Е.Е.* Дикорастущие полезные растения России. СПб., 2001. 663 с.

Поступила в редакцию 20 апреля 2015 г.

Mazayeva Y.V., Malysheva E.V. CORRECTION OF INFLUENCE OF CYTOSTATICS ON PSYCHOPHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF LABORATORY MICE USING PHYTOEXTRACT OF GOLDEN THOROUGHWAX (*Bupleurum aureum*).

The compensation effects of chemotherapy using phytoextract of golden thoroughwax (*Bupleurum aureum*) are considered. Increases of the level of anxiety, the weakening of approximately research reactions and change of emotionally-phobic state in intact mice after administration of methotrexate are shown. Use of phytoextract of golden thoroughwax corrects the effect of methotrexate on the psychophysiological functions of mice.

Key words: mice; methotrexate; psychophysiological functions; golden thoroughwax; *Bupleurum aureum*.

Мазаева Юлия Владимировна, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, г. Тамбов, Российская Федерация, старший лаборант кафедры биологии, e-mail: raduga.nazemle@yandex.ru

Mazayeva Yulia Vladimirovna, Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov, Russian Federation, Senior Assistant, Biology Department, e-mail: raduga.nazemle@yandex.ru

Малышева Елена Владимировна, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, г. Тамбов, Российская Федерация, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии, e-mail: birucovatgu@mail.ru

Malysheva Elena Vladimirovna, Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov, Russian Federation, Candidate of Biology, Assistant Professor of Biology Department, e-mail: birucovatgu@mail.ru