

На правах рукописи

ТИХОБРАЗОВА Ольга Павловна

**ВЛИЯНИЕ
БУФОТИНА И УБИХИНОНА-10 НА ФУНКЦИИ ЦНС КРЫС
В НОРМЕ И ПРИ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

03.00.13 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2007

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ,
Доктор биологических наук, профессор **Крылов Василий Николаевич**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор **Мухина Ирина Васильевна**

Доктор медицинских наук, профессор **Бояринов Геннадий Андреевич**

Ведущая организация:

Российский университет дружбы народов

Защита состоится «___» _____ 2007 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д. 212.166.15. Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ

Автореферат разослан «___» _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук,
доцент

Корягин А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Гипоксия – широко распространенное явление, возникающее как в условиях дефицита кислорода во внешней среде, так и в результате самых разных патологий, связанных с нарушением функции дыхательной, сердечно-сосудистой систем, а также транспортной функции крови (Лукьянова, 2000). Во всех случаях в итоге происходит снижение доставки кислорода к тканям до уровня, недостаточного для поддержания функции, метаболизма и структуры клетки. Это определяет актуальность проблемы и ее значимость для практической и теоретической медицины (Рябов, 2001).

Среди различных методов коррекции гипоксических состояний наибольший интерес вызывает фармакологическая защита с использованием препаратов метаболического действия, направленная на поддержание энергетического обмена (усиление синтеза макроэргов, расширение их резервного пула, более эффективное использование). В этой связи представляется актуальным поиск новых средств и их сочетаний, обладающих антигипоксическим действием, применение которых позволило бы повысить степень резистентности клеток жизненно важных органов к гипоксии и тем самым снизить процент развития постгипоксических энцефалопатий.

Одним из препаратов направленного метаболического действия является разработанный в ННГУ и разрешенный ФК МЗ РФ для клинического изучения кардиотонический препарат на основе яда жаб – Буфотин, который содержит в качестве основных компонентов следующие низкомолекулярные продукты: группа буфотенинов – производные 5- гидрокситриптамина и буфогенины – стероидные производные. Ранее проведенные исследования выявили у препарата не только кардиотропные (Крылов и др., 1994), но также антиоксидантные (Конторщикова, Крылов, Мухина, 1990), антигипоксические и нейротропные свойства (Миронов, 2002).

В последнее время экспериментально и клинически обоснована перспектива использования в качестве антигипоксического средства компонента дыхательной цепи митохондрий – убихинона (Донченко, 1988; Лукьянова, 1991; Крылова, 2002). Более чем 20 летний опыт экспериментальных и клинических исследований применения убихинона убедительно доказывают его эффективность при восстановлении функций сердечно-сосудистой системы. Защитная роль убихинона-10 обусловлена его участием в процессах энергетического метаболизма и антиоксидантными свойствами. Менее известно использование убихинона-10 в неврологии. Остается практически не изученным его действие на ЦНС и высшие интегративные функции при применении препарата, как в норме, так и при гипоксических состояниях.

Цель и задачи исследования

Целью исследования явилось изучение влияния Буфотина и убихинона-10 на функциональное состояние ЦНС крыс в норме и при моделировании острой гипобарической гипоксии.

В задачи работы входило:

1. Изучить влияние Буфотина и убихинона-10 на процессы обучения и памяти интактных крыс при формировании условного рефлекса активного избегания.

2. Исследовать влияние убихинона-10 на высшие интегративные функции ЦНС интактных животных: поведение, обучение, память (при выработке и воспроизведении условного рефлекса пассивного избегания).

3. Сравнить механизмы действия Буфотина и убихинона-10 на процессы обучения и памяти крыс при формировании и воспроизведении условного рефлекса пассивного избегания в норме.

4. Изучить влияние превентивного введения убихинона-10 на выживаемость крыс в условиях острой гипобарической гипоксии.

5. Оценить нейропротекторное действие убихинона-10 на восстановление функционального состояния высших отделов ЦНС в постгипоксическом периоде.

6. Оценить возможность совместного введения с Буфотина и убихинона-10 для повышения резистентности к острой гипобарической гипоксии исходно неустойчивых на «высоте» 12000 метров животных.

Научная новизна

Впервые показано положительное действие Буфотина на процессы обучения и памяти интактных крыс при формировании условного рефлекса активного избегания (УРАИ), не уступающее по эффективности Пирацетаму. Применение СоQ10 не влияет на динамику формирования процесса обучения крыс УРАИ. Влияние препарата на воспроизведение навыка сопоставимо с действием Буфотина и Пирацетама. Выявлена разница в реализации мнемотропного действия препаратов при выработке у крыс условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ): одним из возможных механизмов положительного действия СоQ10, в отличие от Буфотина, является активация норадренергической системы.

Введение убихинона интактным крысам не оказывает влияния на показатели общей двигательной активности и уровня тревожности. Впервые показано, что превентивное введение убихинона-10 не повышает резистентность организма крыс к острой гипоксии. Установлено положительное влияние убихинона-10 на восстановление мнестических функций, нарушенных воздействием острой гипоксии.

Для восстановления исходной поведенческой активности в постгипоксическом периоде наиболее эффективным является однократное введение убихинона (100 мг/кг), поскольку, в отличие от курсового применения СоQ10 (10 мг/кг), предупреждает повышение уровня тревожности крыс в ответ на гипоксический стресс, способствует восстановлению ориентировочно-исследовательской активности животных.

Однократное введение CoQ10 в постгипоксическом периоде, в отличие от курсового применения, снижает уровень тканевой гипоксии. При этом реализуются оба свойства препарата: восстановление дыхательной цепи с соответствующей защитой энергетической функции клетки и сохранение активности системы антиоксидантной защиты.

Впервые установлено, что совместное превентивное применение препаратов, также как и введение CoQ10, в отличие от Буфотина не повышает резистентность к острой гипобарической гипоксии (ОГБГ) исходно неустойчивых на «высоте» 12000 метров животных.

Научно-практическая значимость

Работа обосновывает возможность использования экзогенного Буфотина и убихинона-10 в медицинской практике как антигипоксических и антиоксидантных средств при терапии заболеваний, связанных со снижением кислородобеспечивающей функции головного мозга организма человека и животных. Полученные данные открывают возможность расширения спектра применения Буфотина и CoQ10 как нейропротекторных средств с целью повышения резистентности головного мозга и организма в целом к экстремальным воздействиям различной этиологии.

Основные положения, выносимые на защиту:

Буфотин оказывает ноотропное действие, аналогичное Пирацетаму. Убихинон-10, не влияя на скорость выработки УРАИ у крыс, проявляет оптимизирующее действие на воспроизведение условного рефлекса. В основе мнемотропного действия препаратов лежат разные механизмы: одним из способов реализации положительного эффекта CoQ10 при формировании УРПИ, в отличие от Буфотина, является активация норадренергической системы.

Превентивное введение убихинона-10 не повышает устойчивость животных к острой гипобарической гипоксии. Введение CoQ10 после гипоксического воздействия оказывает нейропротекторное действие, восстанавливая нарушенные процессы фиксации и сохранения временных связей при формировании УРПИ у крыс

Наиболее эффективным для восстановления исходной поведенческой активности в постгипоксическом периоде является однократное введение Убихинона (100 мг/кг), поскольку, в отличие от курсового применения CoQ10 (10 мг/кг), предупреждает повышение уровня тревожности крыс в ответ на гипоксический стресс, обеспечивает восстановление общей двигательной активности животных. Указанные процессы сопровождаются снижением уровня тканевой гипоксии.

Совместное превентивное применение Буфотина и убихинона-10, не оказывает антигипоксического действия.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 7 работ. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (Санкт-Петербург, 2005), четвертой городской межвузовской конференции (Н.Новгород, 2005), 10-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», посвященной 50-летию Пущинского научного центра РАН (Пущино, 2006), десятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2007), XX съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Москва, 2007), расширенном заседании кафедры физиологии и биохимии человека и животных ННГУ (Н.Новгород, 2007).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего ___источника, из них ___иностранных. Общий объем работы ___ страницы, в том числе ___рисунка и ___ таблиц.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на 604 белых лабораторных нелинейных крысах-самцах, массой 200-250 г. Распределение по сериям исследований представлено в таблице 1.

В опытах использовали Буфотин (0,1мг/кг), убихинон-10 (10 мг/кг и 100 мг/кг), растворенный в растительном масле, Пирацетам (400 мг/кг), пропранолол (Обзидан) (1 мг/кг) и Дельтаран (0,2 мг/кг). Буфотин, Пирацетам, пропранолол и 0,9% раствор NaCl (контроль) вводили внутривентриально объемом 0,5мл. Убихинон и масло в контроле вводили перорально объемом 0,5мл, за исключением серии формирования УРАИ (внутрибрюшинно).

Исследование влияния препаратов на процессы обучения и памяти животных проводилось с использованием методов формирования условного рефлекса пассивного избегания (Буреш и др., 1991) и активного избегания.

Обучение животных условному рефлексу активного избегания (Козловский, Данчев, 2004) проводили в челночной камере. Безусловное электрокожное аверсивное раздражение (50 Гц, 0.4 – 0.8 мА (в зависимости от индивидуальной чувствительности, определяемой по выраженности ответа)) подавалось на лапы животного после предварительного изолированного действия условного сигнала (звук 4с). УРАИ вырабатывали в течение 5 дней по 30 сочетаний раздражителей ежедневно. Крысы, которые в конце 5 дня тестирующего обучения имели более 15 невыполненных реакций, классифицировались как плохо обучаемые, в дальнейшем эксперименте не использовались. Обучение остальных животных возобновляли через 15 дней на фоне ежедневного введения препаратов в

течение 4 последующих дней. Определение сохранности навыка проводили через 5 дней после последнего сеанса обучения. При оценке результатов исследований регистрировали количество избеганий и латентный период избегания (ЛВИ).

Таблица 1.

Общее количество объектов исследования и их распределение по сериям

Серии опытов	Экспериментальные методы	Количество крыс
Исследование влияния Буфотина и СоQ10 на процессы обучения и памяти	Условный рефлекс активного избегания (УРАИ), условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)	241
Изучение влияния СоQ10 на поведение животных	Тест «открытое поле», оценка тревожно-фобического состояния	35
Изучение влияния СоQ10 на устойчивость крыс к ОГБГ и восстановление функционального состояния ЦНС животных в постгипоксическом периоде	Моделирование ОГБГ; УРПИ; тест «открытое поле», оценка тревожно-фобического состояния; определение содержания лактата и пирувата в крови; активности СОД и каталазы в эритроцитах	280
Изучение влияния совместного применения препаратов на резистентность к ОГБГ исходно неустойчивых на «высоте» 12000 м животных	Моделирование ОГБГ у исходно неустойчивых животных	48

Поведение животных исследовалось в тесте «открытое поле» с помощью многопараметрового метода комплексной оценки тревожно-фобических состояний (Родина и др., 1993). Для определения ориентировочно-исследовательской активности животных в тесте «открытое поле» регистрировались следующие показатели: горизонтальная двигательная активность (число пересеченных центральных и периферических квадратов), вертикальная двигательная активность (число стоек – подъемов на задние лапы). В основу метода комплексной оценки тревожно-фобических состояний положены две ситуации, связанные с проявлением тревоги и страха у животных: 1) столкновение с незнакомым неживым объектом или незнакомой ситуацией (тесты I – V) и 2) действие руки экспериментатора (тесты VI – IX).

Для моделирования острой гипобарической гипоксии использовалась проточная вакуумная барокамера. Крыс помещали в условия, соответствующие "подъему" на высоту 11500 - 12000 метров со скоростью 183 м/с. О степени резистентности к гипоксии судили по времени выживания на «высоте» (Тж, мин) до наступления летального исхода, либо появления второго агонального вдоха, после чего животное "спускалось" на исходную высоту. Низкоустойчивыми (НУ) к гипоксии считали животных со значением Тж не выше 3 минут. Высокоустойчивыми (ВУ) считали крыс с Тж выше 10 минут, среднеустойчивыми (СУ) считали животных с промежуточным значением Тж. Эффективность антигипоксических свойств испытываемого вещества оценивали по изменению времени жизни опытных животных на «смертельной площадке» относительно времени жизни контрольных животных (Методические рекомендации, 1990).

Уровень тканевой гипоксии оценивали по содержанию лактата и пирувата в крови крыс (Асатиани, 1965). Состояние антиоксидантных ферментов определяли по измерению активности супероксиддисмутазы (СОД) (Nishicimi, 1972) и каталазы (Aebi, 1970) в эритроцитах.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ BIOSTAT и Statistica v. 6.0. Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для статистической оценки межгрупповых и внутригрупповых различий средних применяли однофакторный дисперсионный анализ и критерий Крускала-Уолиса, дисперсионный анализ повторных измерений и критерий Фридмана с последующим применением поправки Бонферрони и критерия Даннета. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние Буфотина и убихинона-10 на динамику формирования и воспроизведение УРАИ у крыс

При исследовании влияния Буфотина на обучение у крыс было показано, что препарат оказывает положительное влияние на формирование УРАИ, не уступающее по эффективности действию Пирацетама. На протяжении всего периода обучения между этими группами животных не наблюдалось статистически значимых различий по таким основным показателям, характеризующим процесс обучения, как количество реакций избегания (рис.1) и ЛВИ (рис.2), в то же время уже с 1 дня наблюдалось достоверное отличие этих показателей от контроля ($p < 0,05$).

Анализ результатов позволил выявить следующую особенность влияния Буфотина на динамику формирования УРАИ у крыс: оптимизирующее действие Буфотина максимально проявлялось на 3-4 день введения препарата, то есть на стадии формирующейся консолидации. В то время как Пирацетам начинал оказывать положительное действие на более ранних этапах обучения.

При изучении влияния СоQ10 на процессы обучения было показано, что введение препарата не оказывает выраженного эффекта, поскольку, при отсутствии статистически значимых различий по основным показателям с контролем, на протяжении всего периода формирования УРАИ у крыс наблюдались достоверные отличия показателей по отношению к группе с введением Пирацетама ($p < 0,05$) (рис. 1, 2).

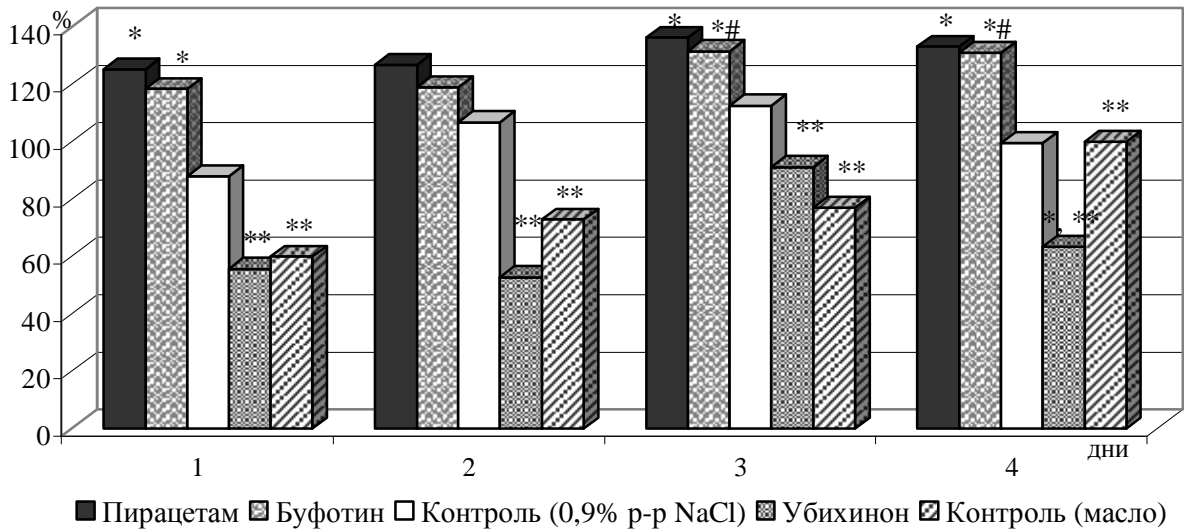


Рис. 1. Влияние Буфотина и убихинона -10 на динамику формирования УРАИ у крыс (количество реакций избегания в % от исходного значения)
* - $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю; ** - $p < 0,05$ отличие по отношению к группе с введением Пирацетама; # - $p < 0,05$ отличие по отношению к 1 дню.

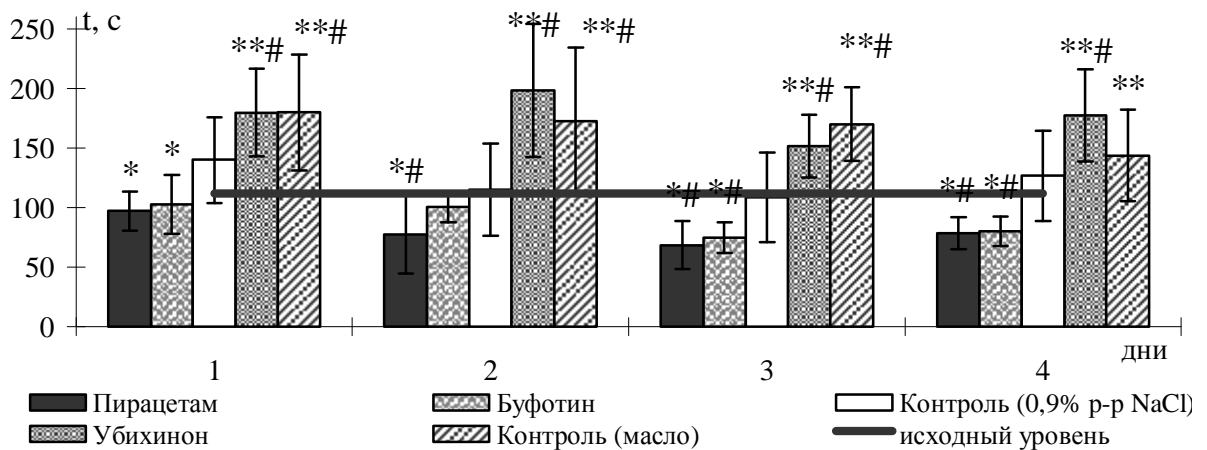


Рис. 2. Влияние Буфотина и убихинона -10 на динамику латентного времени избегания при формировании УРАИ у крыс
*- $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю; **- $p < 0,05$ отличие по отношению к группе с введением Пирацетама; #- $p < 0,05$ отличие по отношению к исходному уровню.

Проверка сохранения выработанного навыка условнорефлекторного избегания, проведенная через 5 дней после последнего сеанса обучения, показала достоверно высокий уровень сохранности УРАИ в опытных группах с введением изучаемых препаратов (рис.3).

Таким образом, в проведенном исследовании применение Буфотина оказывало положительное влияние на процессы обучения и память крыс при формировании УРАИ аналогичное Пирацетаму. Введение убихинона не облегчало выработку условного рефлекса. Действие СоQ10 на прочность закрепления навыка по эффективности сопоставимо с влиянием Буфотина и Пирацетама.

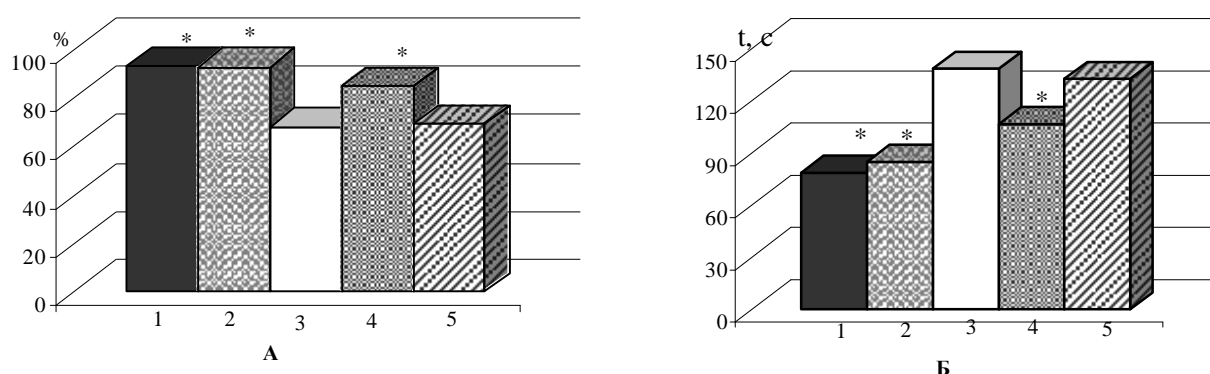


Рис. 3. Влияние Буфотина и убихинона на воспроизведение УРАИ у крыс. А - количество реакций избегания; Б – латентное время избегания. 1- Пирацетам, 2-Буфотин, 3-контроль (0,9% р-р NaCl), 4-убихинон, 5-контроль (масло).

*- $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю.

Влияние Буфотина и убихинона-10 на формирование УРПИ у крыс на фоне блокады β - адренорецепторов головного мозга

Результаты исследования показали, что участие β -адренорецепторов ЦНС обязательно на стадии научения, но не является необходимым при воспроизведении рефлексов, что согласуется с данными литературы (Verman, Dudai, 2001).

Применение Буфотина нормализовало выработку УРПИ, нарушенную введением пропранолола (табл.2). В серии с совместным введением Буфотина и пропранолола, также как и в серии с введением Буфотина, время входа в темную камеру при воспроизведении УРПИ достоверно увеличивалось по отношению ко времени при обучении (в 4,4 раза в группах с введением препаратов перед обучением и 3,6 раза – перед воспроизведением УРПИ) ($p < 0,05$).

В серии с введением убихинона животные опытной группы через 24 часа после обучения, в отличие от контрольных, предпочитали находиться в светлом отсеке, что позволяет говорить о положительном влиянии СоQ10 на мнестические функции крыс.

Введение убихинона не устраняло нарушение способности животных к обучению, вызванное введением пропранолола, так как латентное время перехода крыс в темный отсек камеры при воспроизведении УРПИ, статистически значимо не отличаясь от времени при обучении ($p > 0,05$), было достоверно меньше, чем в интактной группе животных ($p < 0,05$).

В группе с совместным применением убихинона и пропранолола перед воспроизведением условного рефлекса, в отличие от контрольной, латентное время перехода в темный отсек камеры через сутки после обучения достоверно не увеличивалось ($p > 0,05$). Отсутствие сохранности рефлекса в

	Препараты перед обучением		Препараты перед воспроизведением	
	Обучение ЛВП, с M±m	Воспроизведение ЛВП, с M±m	Обучение ЛВП, с M±m	Воспроизведение ЛВП, с M±m

данной группе животных, вероятно, вызвано отрицательным влиянием блокады β -адренорецепторов головного мозга на адаптивное поведение крыс (Калюжный и др., 2005; Przybylski et al., 1999), что привело к развитию пассивно-оборонительной тактики поведения.

Таблица 2.

Влияние Буфотина и убихинона на формирование УРПИ на фоне блокады β -адренорецепторов

	Обучение ЛВП, с M±m	Воспроизведение ЛВП, с M±m	Обучение ЛВП, с M±m	Воспроизведение ЛВП, с M±m
	Обучение 51,50±7,48		Воспроизведение 163,20±16,80*	
Пропранолол	52,00±11,19	125,00±34,79	56,00±10,18	151,00±18,43*
Буфотин	41,17±13,94	180,00±0,00*	37,50±10,91	132,50±24,25*
Буфотин + Пропранолол	40,33±13,94	180,00±0,00*	41,00±12,74	150,83±29,17*
Контроль (0,9% р-р NaCl)	32,83±12,46	109,00±33,84	17,83±5,73	98,67±30,96**
Убихинон	29,60±8,87	119,60±36,99*	29,50±3,99	137,17±27,12*
Контроль (масло)	27,17±5,52	81,83±34,68**	22,67±7,58	69,33±32,54**
Убихинон + Пропранолол	24,50±6,83	93,17±29,97**	45,83±8,23	96,67±37,28
Контроль (масло+0,9% р-р NaCl)	17,00±5,13	104,20±31,44*	21,33±5,71	133,83±29,21*

Примечание: *- $p < 0,05$ отличие времени входа в темную камеру при воспроизведении по отношению ко времени входа при обучении; **- $p < 0,05$ отличие времени входа в темную камеру при воспроизведении по отношению к интактной группе.

Таким образом, введение Буфотина, также как и CoQ10, улучшало мнестические функции высших отделов ЦНС. В основе положительного действия препаратов лежат различные механизмы. Одним из механизмов реализации мнестропного действия убихинона, в отличие от Буфотина, является активация норадренергической системы.

Влияние убихинона-10 на устойчивость крыс к острой гипобарической гипоксии

При моделировании острой гипобарической гипоксии в группе с курсовым превентивным применением убихинона (10 мг/кг 10 дней ежедневно), также как и в контрольной группе, процент высокоустойчивых животных к острой гипоксии равнялся нулю (Методические рекомендации, 1990) (рис. 4).

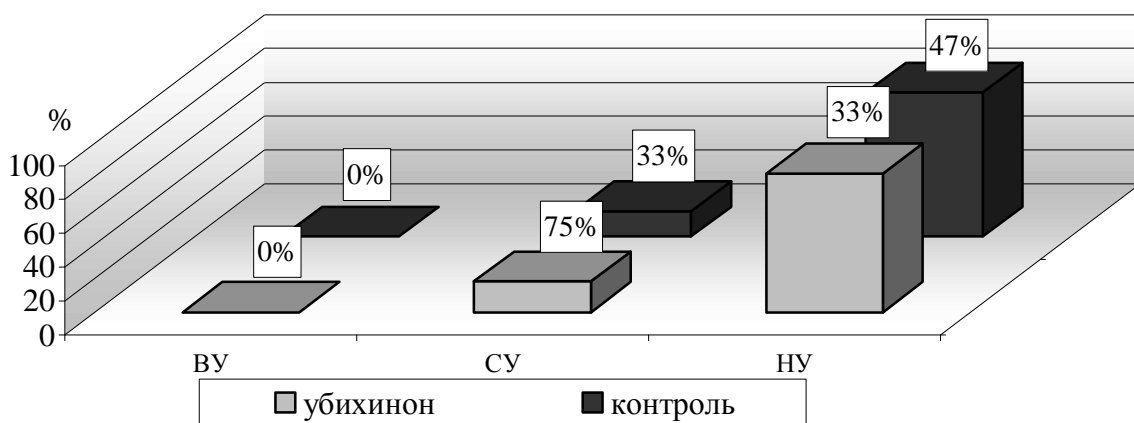


Рис. 4. Распределение крыс по устойчивости к острой гипобарической гипоксии в серии с курсовым введением убихинона (10 мг/кг) (в %); в рамке указан процент смертности в каждой группе.

В группе с однократным превентивным введением убихинона (100 мг/кг) в условиях острой гипоксии, в отличие от контрольной группы, процент высокоустойчивых животных также равнялся нулю (рис. 5).

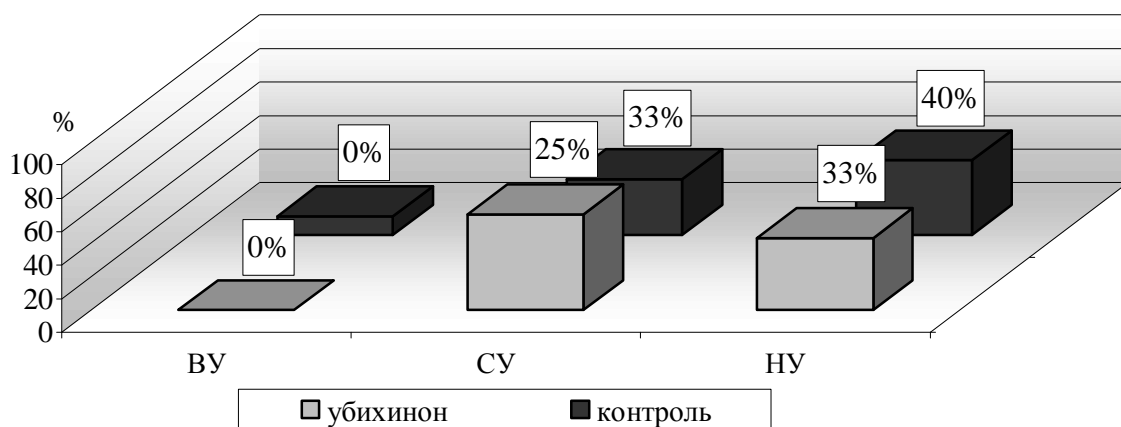


Рис. 5. Распределение крыс по устойчивости к острой гипобарической гипоксии в серии с однократным введением убихинона (100 мг/кг) (в %); в рамке указан процент смертности в каждой группе.

Вышеизложенное позволяет заключить, что превентивное введение убихинона в исследуемых дозах не оказывало антигипоксического эффекта.

Обсуждая полученные результаты, следует указать на высокий процент смертности крыс в условиях ОГБГ, что объясняется низкой лабильностью ферментных систем у средне- и низкоустойчивых к острой гипоксии животных, не успевающих в короткие сроки перестраиваться на более экономичный путь использования кислорода (Березовский, 1978).

Также следует отметить, что гибель всех животных в группах с применением убихинона, в отличие от контрольных животных, на «высоте» 12000 метров происходила без агональных реакций. Время потери позы животных в обеих опытных группах было в 1,5 раза больше, чем в контрольных группах, что свидетельствует об увеличении порога реакции на гипоксическое воздействие. Время восстановления функций у выживших животных после острой гипобарической гипоксии также было больше, чем в контроле. То есть, в опытных группах повышение резистентности животных к гипоксии шло за счет более полного использования резервных возможностей организма, однако, и практически полного их истощения (Чернобаева, Лукьянова, 1989).

Влияние убихинона-10 на мнестические функции высших отделов ЦНС крыс после острой гипобарической гипоксии

В группе с курсовым применением убихинона (10 мг/кг), также как и в группе с однократным введением (100 мг/кг), после воздействия острой гипоксии, латентное время перехода крыс в темный отсек камеры при воспроизведении УРПИ достоверно (в 3,4 и 4,7 раза, соответственно) превосходило соответствующие показатели при обучении и, не отличаясь от аналогичного показателя интактной группы ($p > 0,05$), существенно превышало контрольные значения ($p < 0,05$), что позволяет говорить о выраженном нейропротекторном антигипоксическом действии препарата (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние убихинона-10 на основные показатели УРПИ у крыс после воздействия ОГБГ

Группы	Этапы эксперимента	
	Обучение ЛВП, с M±m	Воспроизведение ЛВП, с M±m
Интактные	46,67±9,89	166,00±14,00*
Убихинон (10 мг/кг)	40,33±14,09	135,17±28,79*#
Контроль	31,00±14,72	61,00±30,96**
Убихинон (100 мг/кг)	32,80±7,59	155,17±24,83*#
Контроль	44,83±694	66,17±25,74**

Примечание: *-p<0,05 отличие времени входа в темную камеру при воспроизведении по отношению ко времени входа при обучении; **-p<0,05 отличие времени входа в темную камеру при воспроизведении по отношению к интактной группе; # -p<0,05 отличие времени входа в темную камеру при воспроизведении по отношению к контролю.

При введении CoQ10 после моделирования ОГБГ за 24 часа до воспроизведения УРПИ также сохранялся, в несколько раз достоверно превышая исходную и контрольную величины (p<0,05) (рис.6).

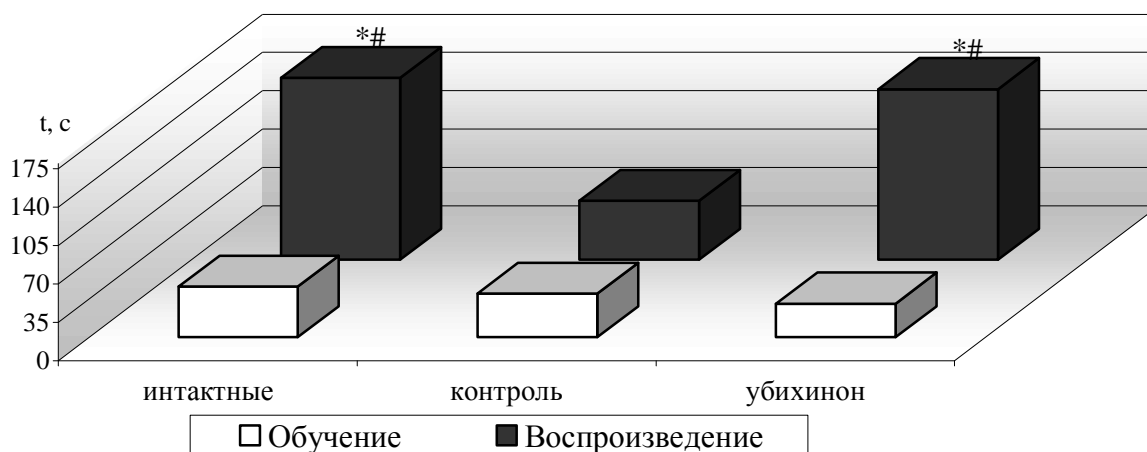


Рис.6. Влияние введения убихинона (100 мг/кг) на воспроизведение УРПИ после воздействия ОГБГ.

*-p<0,05 отличие времени входа в темную камеру при воспроизведении по отношению ко времени входа при обучении; # -p<0,05 времени входа в темную камеру при воспроизведении по отношению к контролю.

Отсутствие воспроизведения рефлекса после гипоксии в контрольных группах связано с нарушением функционального состояния нейронов ЦНС

вследствие высокой чувствительности головного мозга к недостатку кислорода.

Таким образом, введение убихинона не только улучшало мнестические функции высших отделов ЦНС интактных крыс, но и оказывало нейропротекторное антигипоксическое действие, восстанавливая нарушенные воздействием ОГБГ процессы фиксации и сохранения временных связей.

Влияние убихинона-10 на восстановление поведения крыс в постгипоксическом периоде

Введение Буфотина, не оказывая влияния на показатели общей двигательной активности и уровня тревожности интактных крыс, обеспечивает восстановление данных показателей поведенческой активности животных в постгипоксическом периоде (Миронов, 2002). В проведенных нами экспериментах показано, что введение убихинона также не оказывает действия на общую двигательную активность и тревожно-фобическое состояние интактных крыс. На данном этапе исследования было изучено влияние препарата, вводимого после моделирования ОГБГ, на восстановление поведения животных в постгипоксическом периоде.

Анализ полученных результатов показал, что в серии с курсовым применением CoQ10 (10 мг/кг) у животных развивалась пассивно-оборонительная тактика поведения, которая оказывает тормозное влияние на другие формы проявления поведенческой активности, в частности ориентировочно-исследовательскую (рис.7).

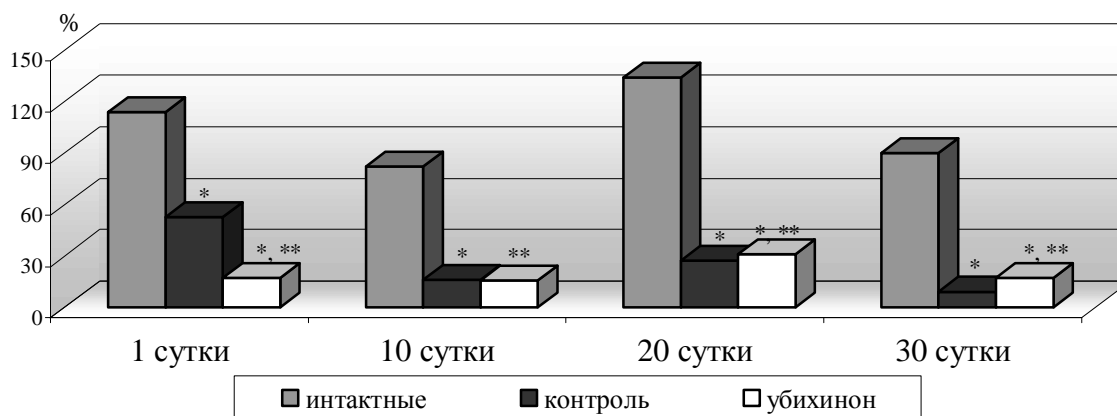


Рис. 7. Динамика изменения вертикальной двигательной активности крыс в постгипоксическом периоде в серии с курсовым введением убихинона (10 мг/кг) (% отклонения от исходного значения).

*- $p < 0,05$ отличие по отношению к от интактной группе; **- $p < 0,05$ отличие по отношению к исходному уровню.

Следует отметить разницу во времени развития пассивно-оборонительной мотивации в опытной и контрольной группах: снижение двигательной активности (рис. 8) и повышение уровня тревожности (рис. 9) в

контроле достоверно проявлялось лишь к 30 суткам ($p < 0,05$), в то время как в группе с применением CoQ10 достоверное снижение данных показателей происходило уже на 1 день ($p < 0,05$), что является более выгодной адаптивной реакцией организма на гипоксический стресс.

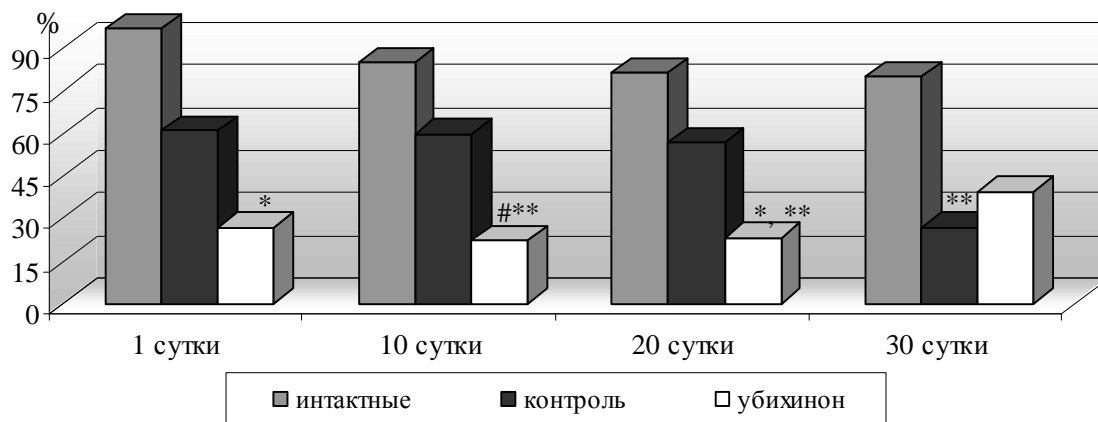


Рис. 8. Динамика изменения горизонтальной двигательной активности крыс в постгипоксическом периоде в серии с курсовым введением убихинона (10 мг/кг) (% отклонения от исходного значения).

*- $p < 0,05$ отличие по отношению к интактной группе; **- $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню; # - $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю.

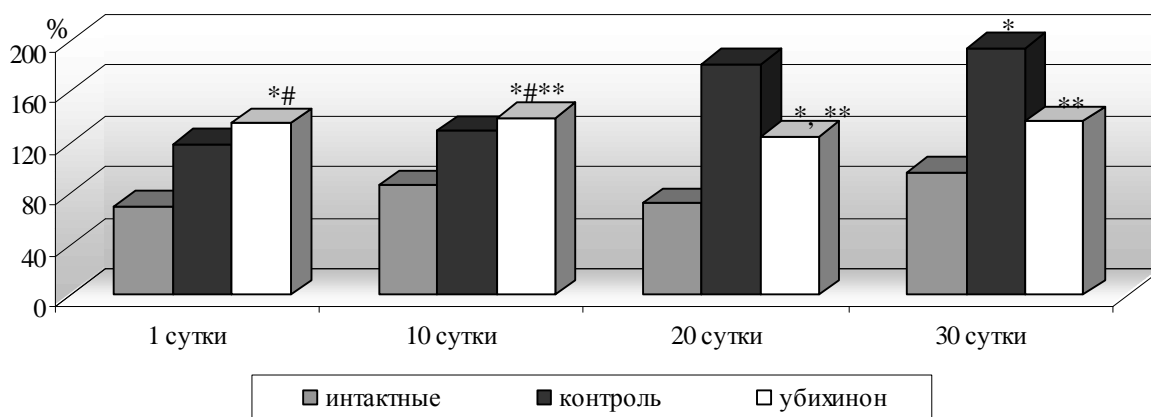


Рис. 9. Динамика изменения тимофобического состояния крыс в постгипоксическом периоде в серии с курсовым введением убихинона (10 мг/кг) (% отклонения от исходного значения).

*- $p < 0,05$ отличие по отношению к интактной группе; **- $p < 0,05$ отличие по отношению к исходному уровню; # - $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю.

В серии с однократным введением CoQ10 (100 мг/кг) в контрольной группе в ответ на воздействие острой гипоксии также происходило развитие пассивно-оборонительного типа поведения, выражающееся в снижении

двигательной активности (рис. 10) и медленном увеличении уровня тревожности (рис.11).

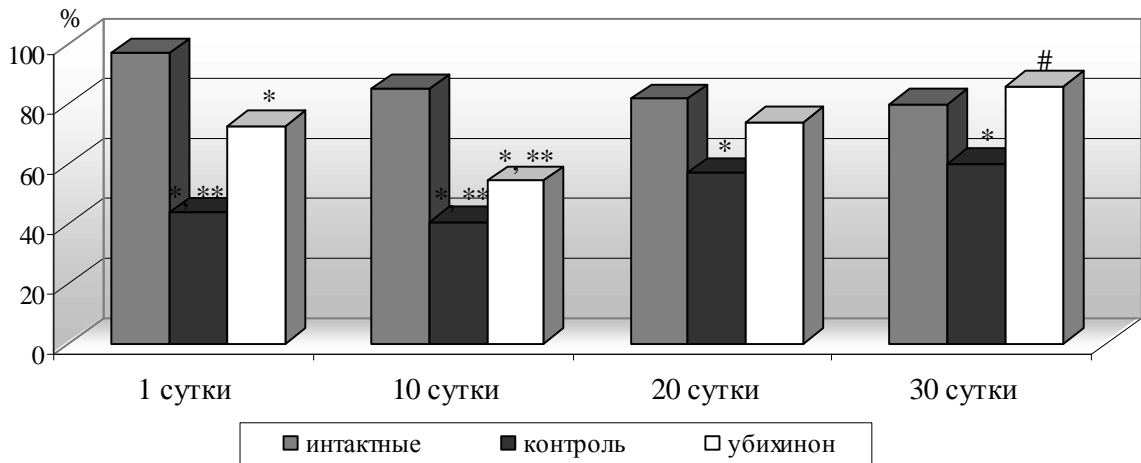


Рис. 10. Динамика изменения горизонтальной двигательной активности крыс в постгипоксическом периоде в серии с однократным введением убихинона (100 мг/кг) (% отклонения от исходного значения).

*- $p < 0,05$ отличие по отношению к интактной группе; **- $p < 0,05$ отличие по отношению к исходному уровню; # - $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю.

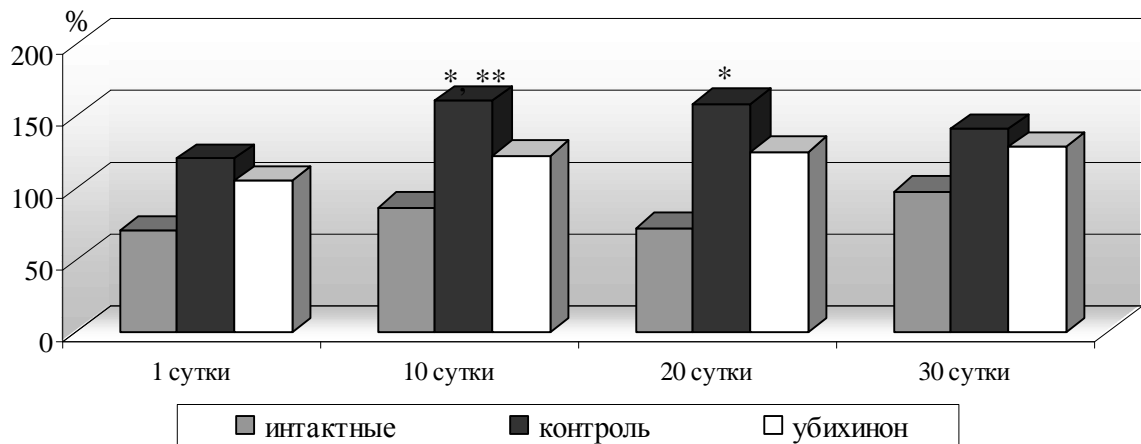


Рис. 11. Динамика изменения тревожно-фобического состояния крыс в постгипоксическом периоде в серии с однократным введением убихинона (100 мг/кг) (% отклонения от исходного значения).

*- $p < 0,05$ отличие по отношению к интактной группе; **- $p < 0,05$ отличие по отношению к исходному уровню.

Введение CoQ10 предупреждало повышение уровня тревожности животных, также не было достоверных изменений и в динамике вертикальной двигательной активности (рис. 12). В то же время уже на 1 сутки нами наблюдалось существенное снижение горизонтальной двигательной активности ($p < 0,05$).

Наблюдаемый дисбаланс между исследовательским поведением с одной стороны и двигательной активностью с другой можно объяснить наступившими в результате гипоксического стресса функциональными нарушениями ЦНС.

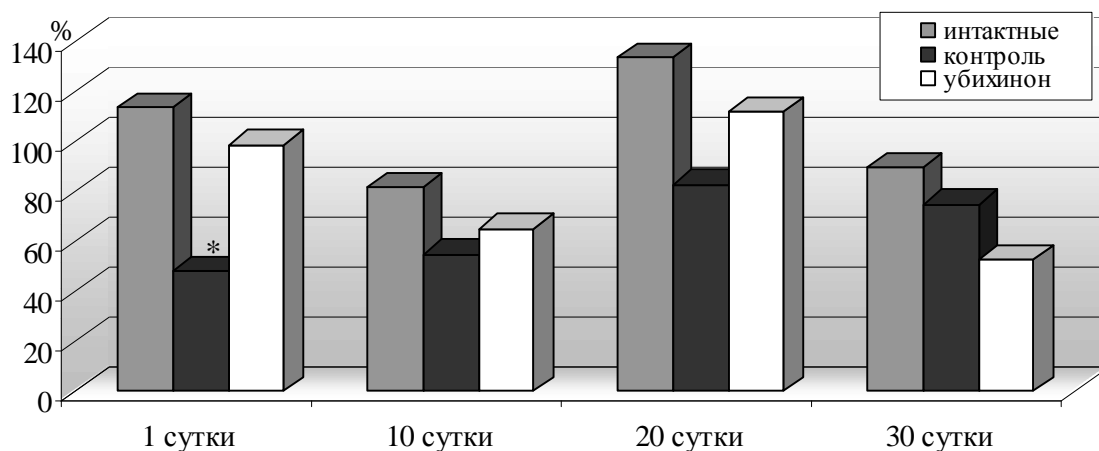


Рис. 12. Динамика изменения вертикальной двигательной активности крыс в постгипоксическом периоде в серии с однократным введением убихинона (100 мг/кг) (% отклонения от исходного значения).

*- $p < 0,05$ отличие по отношению к интактной группе.

К 30 суткам постгипоксического периода в опытной группе животных горизонтальная двигательная активность полностью восстанавливалась, в отличие от контроля, где уровень тревожности достигал исходного, а двигательная активность оставалась достоверно сниженной по отношению к интактной и опытной группам.

Таким образом, однократное введение CoQ10, в отличие от курсового применения, способствовало восстановлению двигательной активности животных и предотвращало повышение уровня тревожности животных в постгипоксическом периоде.

Влияние убихинона на показатели тканевой гипоксии

В условиях гипоксии глубина повреждения ткани мозга и способность к восстановлению во многом определяются степенью развития лактатацидоза (Хазанов 1993; Rehnсrona et al., 1981).

В работах А.А. Миронова (2002, 2003) показано, что введение Буфотина снижает уровень тканевой гипоксии, приводя к уменьшению накопления лактата в ткани мозга и сохраняя структуру сенсомоторной коры головного мозга в условиях ОГБГ. В связи с изложенным нами было изучено влияние CoQ10 на основные показатели тканевой гипоксии.

Проведенные исследования показали, что эффективность экзогенного убихинона-10, вводимого после моделирования острой гипобарической гипоксии, зависит от дозы препарата.

В группе с курсовым применением убихинона (10 мг/кг) содержание лактата достоверно повышалось по отношению интактной группе ($p < 0,05$) (табл. 4), а, кроме того, в 1,3 раза превосходило контрольное значение ($p > 0,05$), что свидетельствует о развитии тканевой гипоксии у животных данной серии.

Таблица 4.

Влияние убихинона-10 на содержание пирувата и лактата при острой гипобарической гипоксии

Группы	Пируват, мкмоль/мл M±m	Лактат, мкмоль/мл M±m
Интактные	0,29±0,02	1,53±0,11
Убихинон (10 мг/кг)	0,39±0,03	3,70±0,58*
Контроль	0,29±0,01	2,90±0,10*
Убихинон (100 мг/кг)	0,27±0,01	1,86±0,22**
Контроль	0,39±0,06	2,82±0,31*

Примечание: *- $p < 0,05$ отличие по отношению к интактными животными; **- $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю.

Однократное введение CoQ10 (100 мг/кг), напротив, приводило к усилению аэробных процессов, о чем свидетельствует достоверное снижение содержания лактата по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$).

Обсуждая реализацию свойств экзогенного убихинона-10, нужно сказать, что курсовое введение в организм CoQ10 приводило к уменьшению активности эндогенных антиоксидантов (табл.5). Последнее, в свою очередь, ведет к нарушению нормального протекания мембранозависимых процессов, одним из которых является окислительное фосфорилирование.

При однократном введении препарата в условиях острой гипоксии проявлялись оба свойства CoQ10: восстановление дыхательной цепи с соответствующей защитой энергетической функции клетки и сохранение активности каталазы, что свидетельствует о включении экзогенного CoQ10 в работу АОС, направленную на ингибирование процессов липопероксидации.

Таблица 5.

Влияние Убихинона-10 на активность ферментов антиоксидантной системы крыс при острой гипобарической гипоксии

Группы	СОД (усл.ед./г Нв * мин) M±m	Каталаза (усл.ед./г Нв * с) M±m
Интактные	614,33±15,16	110,83±11,21
Убихинон (10 мг/кг)	451,67±43,30*	78,33±6,05*
Контроль	277,33±108,40*	75,00±8,24*

Убихинон (100 мг/кг)	263,83±64,17*	102,50±6,66**
Контроль	327,50±50,83*	218,50±44,16*

Примечание: *- $p < 0,05$ отличие по отношению к интактными животными; **- $p < 0,05$ отличие по отношению к контролю.

Из вышеприведенных экспериментов следует, что применение убихинона-10 как антигипоксического средства в условиях острой гипоксии эффективно при однократном введении в дозе 100 мг/кг, при этом механизмы его действия основаны на энергообразующей и антиоксидантной функциях. Курсовое применение CoQ (10 мг/кг) напротив способствовало развитию тканевой гипоксии, выражающемуся в развитии лактатацидоза и подавлении активности ферментов антиоксидантной защиты.

Влияние совместного применения Буфотина и убихинона-10 на резистентность животных к острой гипобарической гипоксии

Проведенный анализ влияния Буфотина и CoQ10 на высшие интегративные функции головного мозга, как в норме, так и при гипоксических состояниях позволил предположить возможность совместного введения препаратов с целью повышения резистентности к ОГБГ исходно неустойчивых на «высоте» 12000 метров животных.

Однако, полученные результаты показали, что совместное введение препаратов, также как и однократное введение CoQ10, не повышает резистентность к ОГБГ исходно неустойчивых на «высоте» 12000 м животных (рис.13, 14).

Коэффициенты защиты (Методические рекомендации, 1990) в обеих сериях не высоки и составляют 0,81 в серии с совместным применением препаратов и 0,75 в серии с применением убихинона.

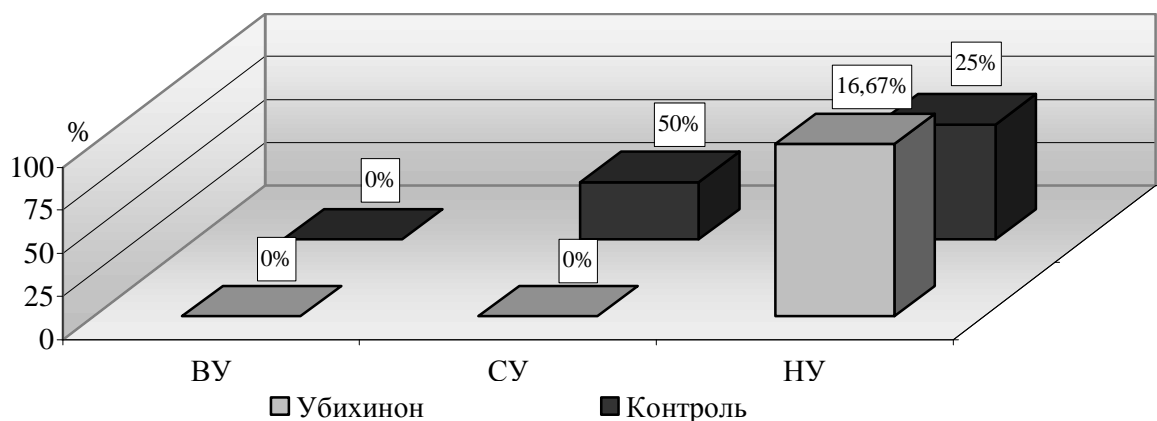


Рис. 13. Распределение животных по устойчивости к гипоксии в серии с введением убихинона (100 мг/кг) (в %); в рамке указан процент смертности в каждой группе.

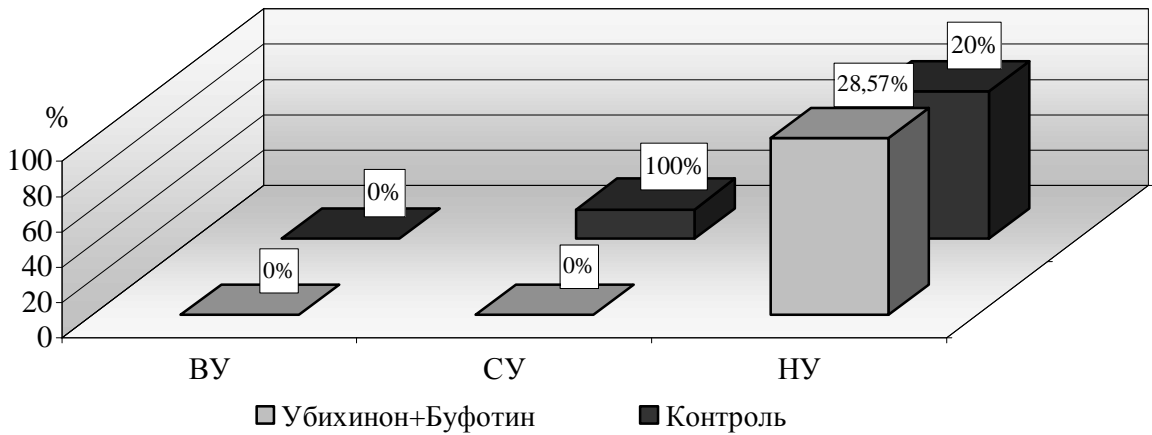


Рис. 14. Распределение животных по устойчивости к гипоксии в серии с совместным применением убихинона и Буфотина (в %); в рамке указан процент смертности в каждой группе.

Однократное превентивное введение Буфотина повысило резистентность к ОГБГ исходно неустойчивых животных (рис.15), что подтверждает ранее полученные данные об антигипоксических свойствах Буфотина (Миронов, 2002).

Следует сказать, что коэффициент защиты Буфотина достаточно высок и составляет 1,61, что в 2,15 и 2 раза выше коэффициентов защиты убихинона и совместного применения убихинона и Буфотина соответственно.

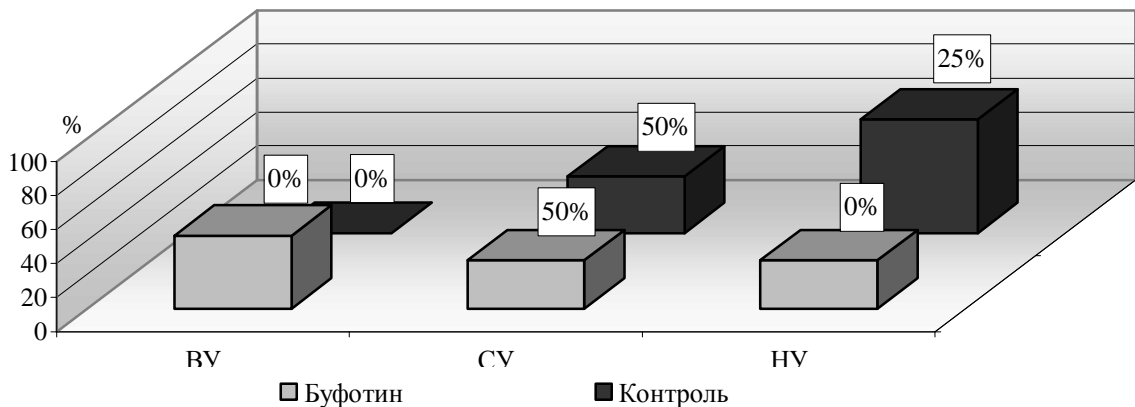


Рис. 15. Распределение животных по устойчивости к гипоксии в серии с введением Буфотина (в %); в рамке указан процент смертности в каждой группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенных исследованиях установлено ноотропное действие кардиотонического средства Буфотина. Убихинон-10, не влияя на скорость формирования УРАИ, также оказывает оптимизирующее действие на прочность закрепления следов памяти. В основе мнемотропного действия изучаемых препаратов лежат разные механизмы: одним из способов

реализации положительного эффекта CoQ10 при формировании УРПИ, в отличие от Буфотина, является активация норадренергической системы.

Полученные данные свидетельствуют, что превентивное введение убихинона-10 в исследуемых дозах не оказывает антигипоксического действия при моделировании острой гипобарической гипоксии. Введение CoQ10 после гипоксического воздействия оказывает нейропротекторное действие, восстанавливая такие высшие интегративные функции головного мозга как обучение и память.

Наиболее эффективным для восстановления исходной поведенческой активности в постгипоксическом периоде является однократное введение убихинона (100 мг/кг), поскольку, в отличие от курсового применения CoQ10 (10 мг/кг), предупреждает повышение уровня тревожности крыс в ответ на гипоксический стресс, оказывает положительное воздействие на восстановление ориентировочно-исследовательской активности животных. Указанные процессы сопровождаются снижением уровня тканевой гипоксии. При этом реализуются оба свойства CoQ10: восстановление дыхательной цепи с соответствующей защитой энергетической функции клетки и включение экзогенного CoQ10 в работу АОС, направленную на ингибирование процессов липопероксидации.

Совместное превентивное применение Буфотина и убихинона-10, также как и введение CoQ10, в отличие от Буфотина, не оказывает антигипоксического действия, поскольку не повышает резистентность к острой гипоксии исходно неустойчивых на «высоте» 12000 м животных.

ВЫВОДЫ

1. Буфотин оказывает положительное действие на процессы обучения и память крыс при формировании и воспроизведении у крыс условного рефлекса активного избегания (УРАИ), не уступающее по эффективности Пирацетаму. Убихинон-10 не оказывает влияния на обучение крыс при формировании УРАИ, но так же как Буфотин и Пирацетам, эффективен при его воспроизведении.

2. Введение Буфотина, также как и убихинона-10, оказывает положительное действие на мнестические функции ЦНС крыс при выработке условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). В основе эффектов лежат различные механизмы: Буфотин нормализует выработку УРПИ, нарушенную блокадой бета-адренорецепторов; CoQ10 не устраняет выраженность нарушений формирования УРПИ, вызванных действием бета-блокатора.

3. Превентивное введение CoQ10 не повышает устойчивость крыс к острой гипобарической гипоксии и не предотвращает вызванные острой гипоксией нарушения процессов сохранения следов памяти.

4. Применение Убихинона-10 (10 мг/кг 10 дней, ежедневно и 100мг/кг однократно) после воздействия острой гипобарической гипоксии оказывает нейропротекторное действие, восстанавливая нарушенные процессы фиксации и сохранения временных связей при формировании УРПИ у крыс.

5. Однократное введение убихинона-10 в дозе 100 мг/кг предупреждает повышение уровня тревожности в ответ на гипоксический стресс, обеспечивает более быстрое, чем в контроле восстановление общей двигательной активности в постгипоксическом периоде. Курсовое применение CoQ10 в дозе 10 мг/кг для восстановления поведенческой активности крыс в постгипоксическом периоде менее эффективно.

6. Однократное введение убихинона в дозе 100 мг/кг снижает уровень тканевой гипоксии, приводя к достоверному по отношению к контрольным животным уменьшению накопления лактата в крови крыс при острой гипоксии, сохраняя активность каталазы в эритроцитах на уровне интактных животных. Курсовое введение CoQ10, напротив, способствует развитию тканевой гипоксии, выражающемуся в значительном накоплении лактата и снижении активности СОД и каталазы по отношению к их уровню у интактных животных.

7. Совместное введение Буфотина и CoQ10 не повышает резистентность к острой гипобарической гипоксии исходно неустойчивых на «высоте» 12000 м животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Тихобразова, О.П.** Ноотропные эффекты Буфотина и Гутимины / О.П. Тихобразова // Вестник молодых ученых. Серия науки о жизни. Сборник материалов Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина». Санкт-Петербург. - 2005. - С.120.

2. Крылов, В.Н. Ноотропное действие препарата жабьего яда Буфотина / В.Н. Крылов, **О.П. Тихобразова**, А.А. Миронов // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии: Сб. науч. тр. - Вып. 8. - Тольятти. - 2005. С 93-98.

3. **Тихобразова, О.П.** Влияние Убихинона-10 на условнорефлекторные реакции крыс / О.П. Тихобразова, Е.В. Крылова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия биология. – 2006. - Вып.1(11). - С.176-181.

4. **Тихобразова, О.П.** Влияние Убихинона-10 на выработку и воспроизведение условного рефлекса активного избегания у крыс / О.П. Тихобразова, А.А. Миронов // Сборник тезисов 10-й Международной Пущинской школы- конференции молодых ученых “Биология - наука XXI века”. Пущино. - 2006. - С.166.

5. **Тихобразова, О.П.** Влияние Дельтарана на изменение поведения при моделировании ишемии головного мозга у крыс линии Вистар / О.П. Тихобразова, А.А. Миронов // Фундаментальная наука и клиническая медицина. Материалы 10-й Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье». Санкт-Петербург. - 2007. - С. 447-448.

6. **Тихобразова, О.П.** Влияние Буфотина на динамику формирования и воспроизведение УРАИ у крыс./ О.П. Тихобразова, А.А. Миронов // Тез.

докл. XX съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. М.: - Издательский дом «Русский врач». - 2007. - С.444.

7. **Тихобразова, О.П.** Действие Дельтарана на состояние ЦНС крыс при моделировании ишемии головного мозга / О.П. Тихобразова, А.А. Миронов // Сборник тезисов 11-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “Биология - наука XXI века”. Пушино. - 2007. (в печати).

Список сокращений

АОС – антиоксидантная система

ВУ – высокоустойчивые к гипоксии животные

ЛВИ – латентное время избегания

ЛВП – латентное время перехода

НУ – низкоустойчивые к гипоксии животные

ОГБГ – острая гипобарическая гипоксия

СОД – супероксиддисмутаза

Тж - время выживания на «высоте»

СУ – среднеустойчивые к гипоксии животные

УРАИ – условный рефлекс активного избегания

УРПИ - условный рефлекс пассивного избегания

ЦНС – центральная нервная система