

**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

**Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств,
влияющих на физическую работоспособность**

Методические рекомендации

ФМБА России МР.21. 43 - 2017

Москва 2017

Предисловие

1. Настоящие рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) под редакцией д.м.н., профессора Н.Н. Каркищенко.

Директор – д.м.н., профессор В.Н. Каркищенко.

Заместитель директора по науке – д.м.н., профессор Е.Б. Шустов.

2. Исполнители:

научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор	Н.Н. Каркищенко
директор – доктор медицинских наук, профессор	В.Н. Каркищенко
заместитель директора по научной работе – доктор медицинских наук, профессор	Е.Б. Шустов
заместитель начальника управления – начальник отдела Управления организации спортивной медицины ФМБА России – доктор медицинских наук, профессор	И.А. Берзин
начальник научно-организационного отдела – доктор биологических наук	Г.Д. Капанадзе
заведующий лабораторией – кандидат биологических наук	Ю.В. Фокин
заведующий лабораторией – кандидат биологических наук	Х.Х. Семенов
заведующая лабораторией – кандидат биологических наук	Н.В. Станкова
научный сотрудник – кандидат биологических наук	В.Ц. Болотова

3. Рецензенты:

М.Б. Иванов, д.м.н., директор ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»; 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, тел./факс: (812) 365-06-80, e-mail: institute@toxicology.ru; <http://www.toxicology.ru/>;

А.Н. Петров, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, тел./факс: (812) 365-06-80, e-mail: institute@toxicology.ru; <http://www.toxicology.ru/>;

С.В. Оковитый, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии МЗ РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова д.4/6, тел (812) 234-13-29, e-mail: pharmacology.dept@pharminnotech.com; <http://pharm-spb.ru/>.

4. В настоящем документе реализованы требования Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

5. Введение в действие – с момента утверждения.

6. Введены впервые.

Содержание

Предисловие	2
Введение	6
1. Область применения.....	13
2. Аннотация.....	14
3. Нормативные документы	15
4. Обозначения и сокращения.....	16
5. Оценка специфической активности фармакологических средств в отношении физической работоспособности.....	17
6. Общие аспекты стандартизации методик при работе с лабораторными животными	25
6.1. Стандарты содержания животных	26
6.2. Стандарты манипуляций с животными.....	27
6.3. Стандартизация обучения животных методикам и тренировок	31
6.4. Стандартизация по хронобиологическим факторам.....	32
6.5. Стандартизация по зоосоциальным и зоопсихологическим аспектам.....	34
6.6. Статистическая стандартизация	35
7. Оцениваемые качества спортсменов и адекватные им методы биомедицинских исследований.....	38
8. Классификация методов биомедицинского исследования физической работоспособности.....	41
9. Описание методов исследования физической работоспособности на лабораторных животных и особенностей интерпретации их результатов	44
9.1. Кинезогидродинамическое исследование	44
9.2. Метод «вынужденного» или «предельного» плавания	53
9.2.1. Стандартная методика вынужденного плавания с грузом.	54
9.2.2. Трехнагрузочная плавательная проба.....	59
9.2.3. Проба с множественным повторным предъявлением плавательной нагрузки.....	61
9.3. Метод челночного плавания.....	63
9.4. Метод бега животных на тредбане до отказа	70
9.4.1. Методика бега мелких лабораторных животных.	70

9.4.2. Бег мини-пигов на тредбане до отказа.....	71
9.5. Методы оценки силовых характеристик животных	75
9.5.1. Тест на силу хватки лап.....	76
9.5.2. Тест удержания животного на скользком вертикальном стержне.	77
9.5.3. «Прыжковый тест».....	80
9.6. Методы оценки координированности животных.....	82
9.6.1. Тест удержания на вращающемся горизонтальном стержне (тест ротарод).	82
9.6.2. «Прогулка по приподнятой перекладине» (raised-beam walking).....	86
9.6.3. Анализ походки по следам (gait analysis system).	86
10. Вспомогательные методы, используемые для оценки влияния лекарственных средств на работоспособность животных.....	87
10.1. Методы оценки поведенческой активности животных	87
10.1.1. Тест на агрессивное поведение «бой самцов».	87
10.1.2. Тест открытого поля (open field).	88
10.1.3. Анализ поведенческих компонентов по локомоторной активности животных.	90
10.1.4. Анализ ультразвуковой вокализации.....	92
10.2. Методы оценки устойчивости к гипоксическому воздействию.....	93
10.2.1. Гипобарическая гипоксия.	94
10.2.2. Нормобарическая гипоксия.	97
11. Особенности выполнения исследований лекарственных средств в условиях моделирования утомления и тренировочного процесса	99
11.1. Утомление, механизмы его формирования и фармакологической коррекции	99
11.2. Особенности организации исследований в условиях утомления.....	106
11.3. Особенности организации исследований по оценке влияния лекарственных средств на эффективность тренировочного процесса	109
12. Выбор биомоделей и методов исследования для оценки физической работоспособности в интересах конкретных видов спорта.....	111
Заключение	128
Библиография	130

Введение

В настоящее время применение биологически активных соединений, как в виде лекарственных средств, БАДов спортивного назначения, так и в составе специализированных продуктов для питания спортсменов (функционального питания спортивного назначения) является важным элементом подготовки спортсменов.

Лекарственные средства в спорте необходимо рассматривать в первую очередь как средства регуляции нарушенных функций организма спортсменов. Они должны быть направлены на [32]:

- регуляцию и поддержку функциональных систем и возможностей спортсмена, обеспечивающих защиту от факторов, способствующих развитию заболевания или патологического поражения;
- предупреждению и предотвращению заболеваний, связанных с профессиональной деятельностью спортсмена;
- борьбу с возникновением новых форм патологии на начальных и последующих стадиях развившегося заболевания, связанных или не связанных со спортом;
- поддержание на оптимальном уровне метаболических, иммунных, энергетических и психофизиологических резервов организма в регламентируемых пределах времени и возможностей мобилизации защитных систем;
- восстановление биологических ресурсов для продолжения выполнения жизненно-важных функций в экстремальных ситуациях тренировочного и соревновательного режимов;
- повышение адаптационных возможностей организма спортсмена для защиты от неблагоприятных факторов в будущем.

Основными задачами, решаемыми с помощью средств фармакологической поддержки, являются [35]:

- повышение профессионального (спортивного) долголетия спортсменов;
- профилактика заболеваний у спортсменов (инфекционных, сердечно-сосудистых, респираторных, кожных и т.д.);
- лечение возникших в ходе тренировочного или соревновательного процессов острых заболеваний и обострений хронических заболеваний;
- ускорение процессов адаптации к тренировочным нагрузкам и климато-географическим особенностям региона соревнований;
- ускорение процессов восстановления спортсменов после травм и заболеваний;
- ускорение процессов восстановления после предельно переносимых физических нагрузок;
- ускорение фазы формирования оптимальных моторных актов;
- ускорение формирования фазы суперкомпенсации в тренировочном процессе;
- профилактика развития состояния перетренированности у спортсменов, ускорение выхода из этого состояния при развитии перетренированности;
- психоэмоциональная гармонизация, профилактика десинхронозов и нарушений сна;
- повышение способности системы пищеварения усваивать большой объем нутриентов;
- улучшение работы систем очистки организма от шлаков обмена;
- поддержание состояния эубиоза естественной микрофлоры организма спортсмена.

В рамках различных направлений медицинской науки (спортивная и военная медицина, медицина труда, авиационная и космическая медицина, медицина экстремальных состояний, фармакология здорового человека, спортивная

фармакология) существуют как минимум пять принципиально отличающихся взглядов на возможные решения проблемы повышения работоспособности [16]:

- повышение работоспособности как следствие дополнительной стимуляции организма (группа психомоторных стимуляторов допинговых средств);
- повышение работоспособности как устранение «слабых мест» функциональных систем организма, повышение его неспецифической резистентности (коррекция переносимости воздействия экстремальных нагрузок на организм);
- повышение работоспособности как устранение причин ее снижения (коррекция процессов утомления и механизмов снижения работоспособности);
- повышение работоспособности как ускорение процессов постнагрузочного восстановления;
- повышение работоспособности как адаптация организма к возрастающим физическим нагрузкам (фармакология адаптивных процессов).

Каждый из этих подходов имеет свое научное обоснование и практическую реализацию, в том числе – путем создания специализированных лекарственных средств и фармнутриентов, комплексных режимов фармакологической поддержки тренировочного или соревновательного процесса, методических рекомендаций, инструкций и наставлений по применению средств фармакологической поддержки.

Однако, несмотря на разные взгляды на проблему, арсенал используемых при этом фармакологических средств во многом остается одним и тем же, а отличия между подходами в большинстве случаев связаны с режимом применения лекарственных средств (профилактическом, купирующем, восстанавливающем, тренирующем).

Определенные сложности в разработке новых лекарственных средств в области фармакологической поддержки физической работоспособности связаны с тем, что под работоспособностью могут пониматься разные вещи.

Под работоспособностью в настоящее время подразумевают потенциальную возможность индивида выполнять целесообразную деятельность на заданном уровне эффективности в течение определенного времени. По отношению к решаемой им задаче можно выделить максимальную, оптимальную и сниженную

работоспособность. Работоспособность зависит от внешних условий деятельности и психофизиологических ресурсов индивида [19].

В физиологии труда под работоспособностью понимают состояние человека, определяемое возможностью физиологических и психических функций организма, которое характеризует его способность выполнять конкретное количество работы заданного качества за требуемый интервал времени [7]. Кроме того, в научной литературе работоспособность часто рассматривается как обобщенная характеристика предельных возможностей организма (максимальная работоспособность).

Уровень работоспособности проявляется в комплексе показателей, характеризующих [30]:

- эффективность (производительность, продуктивность) и качество деятельности;
- функциональные реакции организма (психологическую и физиологическую «цену» деятельности, ту степень напряжения функционирования психофизиологических систем организма (сердечно-сосудистой, дыхательной, нейрогуморальной, выделительной и др.), которая необходима для достижения заданного уровня эффективности;
- субъективное состояние работника.

В спортивной физиологии и медицине общее понятие «работоспособность» трансформируется в физическую или спортивную работоспособность.

Физическая работоспособность – это способность человека к выполнению физической работы с наименьшими физиологическими затратами и с наивысшими результатами. Физическую работоспособность подразделяют на общую и специальную.

Общая физическая работоспособность – это уровень развития всех систем организма (нервной, дыхательной, кровообращения, пищеварительной и выделительной систем), всех физических качеств. Чем быстрее спортсмен выходит на необходимый уровень подготовленности, тем легче ему удержать уровень работоспособности, о чем судят прежде всего на основании реакций его

физиологических систем. При этом определяющими факторами являются тренированность и врожденные способности. Кроме этого, на работоспособность влияют возраст, пол, общее состояние здоровья, конституция и мышечная масса, а также влияние окружающей среды (например, время дня (циркадианные ритмы), температура, содержание кислорода в воздухе).

Границы физической работоспособности определяются по тому, как долго может выполняться определенная мышечная работа и насколько хорошо регулируются физиологические функции, ответственные за снабжение мускулатуры кислородом и питательными веществами. Умеренная работа может выполняться неопределенно долго. В этом случае сохраняется достаточное кровоснабжение работающих мышц. Таким образом, одним из лимитирующих факторов при такой нагрузке является реакция кровеносных сосудов на продукты метаболизма [8].

Физическая работоспособность является интегральным выражением функциональных возможностей организма человека, входит в понятие здоровья и характеризуется рядом объективных факторов, таких как состав тела и антропометрические показатели; мощность, емкость и эффективность механизмов энергопродукции; функциональные возможности мышц и вегетативных систем; состояние опорно-двигательного аппарата, эндокринной системы и др.

Специальная физическая работоспособность – это уровень развития физических качеств и тех функциональных систем, которые непосредственно влияют на результат в избранном виде спорта. Единицы измерения, нормы и факторы в каждом виде спорта индивидуальны.

Количественной мерой оценки физической работоспособности являются единицы работы (эргометрические показатели): килограммометры (кгм), ватты (Вт), джоули (Дж), ньютон (Н). Для непрямой оценки используют функциональные показатели вегетативных систем.

Исследования физической работоспособности актуальны не только для спортивной медицины, но и для военной медицины, медицины катастроф, медицины экстремальных состояний, авиационной и космической медицины, морской медицины, медицины глубоководных работ и аварийно-спасательного дела,

а также клинической медицины (работоспособность является маркером функционального состояния, особенно на этапах восстановления после тяжелых заболеваний или угрожающих жизни состояний).

Применение фармакологических средств является одним из стандартных способов воздействия на организм человека (наряду с тренировочным процессом и психологической мобилизацией), направленного на такие изменения его функционального состояния, которые обеспечивают достижение необходимого спортивного результата.

Действующая в настоящее время парадигма доказательной медицины требует обязательного статистического подтверждения выявленного эффекта, что накладывает особые, дополнительные требования к методической стороне применения лекарственных средств спортивной направленности. К таким требованиям относятся:

- принципиальная измеряемость анализируемых параметров (наличие конкретных измеряемых показателей, количественных или качественных шкал, значения которых могут быть зафиксированы объективными методами контроля);
- независимость результатов измерения от объекта и субъекта измерения (автоматизированные системы измерения и регистрации, их метрологическая стандартизация, при невозможности автоматизированного измерения – привлечение к измерению, регистрации и обработке данных независимых и не заинтересованных в каком-либо результате лиц);
- повторяемость и воспроизводимость результатов измерения (результат должен быть измерен несколько раз, при выполнении исследования другим исследователем должны получаться сходные результаты);
- контролируемость исследования (наличие группы контроля, принимающей не исследуемый препарат, а индифферентное вещество (чаще всего – крахмал), в аналогичной лекарственной форме – таблетки, капсулы и т.д.);
- достаточное для статистического анализа количество данных;
- применение корректных статистических методов обработки данных;

- возможность переноса результатов конкретного исследования на популяционный уровень;
- научная обоснованность применения средства, его доз и схем применения;
- безопасность применения, исключение применения запрещенных субстанций;
- ведение формализованных схем фиксации данных (протоколов);
- информированность участников исследования об особенностях действия и применения исследуемых средств.

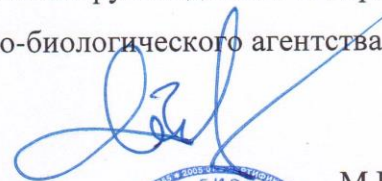
Очевидным также является необходимость проведения доклинических исследований безопасности и эффективности лекарственных средств, вытекающая из требований Федерального Закона «Об обращении лекарственных средств».

Представленные в литературе методики исследования работоспособности на лабораторных животных зачастую различаются в деталях проведения настолько, что становится невозможным сопоставление результатов аналогичных исследований, выполненных в разное время не только в иных лабораториях, но и в одной и той же лаборатории. В еще большей степени затруднен перенос результатов биомедицинских исследований не то что на спортсмена, просто на здорового человека. В связи с этим возникает необходимость привести в соответствие применяемым в спортивной практике методы оценки физической работоспособности спортсменов тем, которые могут быть оценены на лабораторных животных и стандартизировать методики их проведения.

Целью настоящих методических рекомендаций является стандартизация процедур биомедицинских (доклинических) исследований перспективных лекарственных средств, методик проведения и интерпретации исследований компонентов физической работоспособности на лабораторных животных для обеспечения возможности прогнозирования (качественного и количественного) влияния исследуемых фармакологических средств на функциональное состояние и работоспособность как здорового человека, так и спортсмена.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя Федерального
медико-биологического агентства


М.В. Забелин
«29» 08 2017 г.


Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 21 Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств,
влияющих на физическую работоспособность**
Методические рекомендации

ФМБА России МР.21. 43 –2017

1. Область применения

Настоящие рекомендации распространяются на порядок выполнения доклинических исследований по изучению влияния лекарственных средств на физическую работоспособность.

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области фармакологии, токсикологии, реаниматологии, восстановительной медицины, экспериментальной биологии и медицины, и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области изучения антигипоксической активности лекарственных средств и медицинских технологий, а также разработки новых соединений с потенциально антигипоксической активностью.

Настоящий документ предназначен для применения в учреждениях и предприятиях ФМБА России, осуществляющих деятельность в области разработки новых лекарственных средств и медицинских технологий.

2. Аннотация

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области фармакологии, спортивной и военной медицины, восстановительной медицины, экспериментальной биологии и медицины, и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области изучения влияния лекарственных средств и медицинских технологий на физическую работоспособность, а также разработки новых соединений с потенциальной фармакологической активностью в этой области применения.

Рекомендации содержат общие подходы к доклиническому исследованию лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность, требования к стандартизации биомедицинских исследований, описание методов изучения физической работоспособности, экспериментальных моделей формирования специфических для отдельных видов спорта видов выносливости на мелких и крупных лабораторных животных, в том числе – моделей утомления и восстановления, требования к животным и работе с ними, методики статистического популяционного переноса полученных результатов, сравнительной оценки влияния лекарственных средств на физическую работоспособность, критерии эффективности их применения в экспериментальных моделях, перечень нормативных документов, основную научно-методическую библиографию.

3. Нормативные документы

Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 № 400).

Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Методические указания Минздравсоцразвития России от 12.05.2008 «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств».

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 51849-2001 «Продукция комбикормовая. Информация для потребителя. Общие требования» (Приказ Госстандарта РФ от 25.12.2001 № 582-ст).

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказ Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2.12.2009 № 544-ст).

Правила надлежащей лабораторной практики таможенного союза. Решение Комиссии Таможенного союза от 02.03.1999 № 564.

Правила проведения работ с использованием лабораторных животных (приложение к Приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Приказ Минздрава России от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Приказ МЗ СССР 06.07.73 г. N 1045-73 об утверждении санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, Часть 2. М.: Гриф и К, 2012.- 944 с.

СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию, и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Утверждены постановлением Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 г. № 51.

4. Обозначения и сокращения

КГМ	–	килограммометр
Дж	–	джоуль
Н	–	ньютон
Вт	–	ватт
LD50	–	полулетальная доза
ИЗ	–	индекс защиты
САэ	–	специфическая активность в «эталонных» единицах
Ксэ	–	коэффициент сравнительной эффективности
GLP (Good Laboratory Practice)	–	надлежащая лабораторная практика
СОП	–	стандартная операционная процедура
ИП	–	индекс пробы
ПВ	–	показатель выносливости
КУ	–	коэффициент утомляемости
ОА	–	ориентировочная активность
ПА	–	поисковая активность
ЭЛ	–	эмоциональная лабильность
Аг	–	агрессивность
ОДА	–	общая двигательная активность
ПК	–	показатель психологической комфортности животных
СПМ	–	спектральной плотности мощности
ГГС	–	гипоксическая газовая смесь

5. Оценка специфической активности фармакологических средств в отношении физической работоспособности

Проведение доклинических исследований эффективности новых соединений как средств повышения работоспособности подразумевает обоснование выбора соответствующих схем и методов доклинического изучения параметров физической работоспособности, оценку их влияния на прямые и косвенные показатели на лабораторных животных, их статистический анализ.

В современном спорте высших достижений выделяется несколько направлений фармакологической поддержки спортсменов (Таблица 1).

Таблица 1 – Цели и особенности применения новых препаратов в спортивной фармакологии

Цель применения	Механизм формирования эффекта	Особенности применения
Оптимизация состояния здоровья спортсменов в межсезонный период	Противоастеническое, иммуностимулирующее, гепатопротекторное, антиоксидантное действие	Курсы 7-20 дней
Повышение эффективности тренировочного процесса	Адаптивный протеинсинтез, связанный с возрастающими физическими нагрузками	Короткие курсы 5-7 дней на фоне возрастающих нагрузок, прием после нагрузок
Стартовая мобилизация	Повышение уровня АКТГ, синтез митохондриальных белков, повышение сопряжения окисления и фосфорилирования	Разовый прием (или короткий курс 3 дня) за час до нагрузок
Повышение проявлений специфических особенностей моторных актов	Нейропротекторное, нейропластическое, противоастеническое действие, усиление синтеза нейромедиаторов	Применение курсами 7-10 дней на фоне тренировочного процесса
Повышение неспецифической выносливости, профилактика утомления, переутомления и перетренированности	Синтез митохондриальных белков, повышение сопряжения окисления и фосфорилирования, улучшение микроциркуляции и транспорта кислорода, антиоксидантное действие	Применение короткими курсами перед нагрузками
Ускорение процессов постнагрузочного восстановления	Активация глюконеогенеза, репаративного протеинсинтеза, антиоксидантное действие	Короткие курсы перед нагрузкой, однократный прием после нагрузки
Ускоренная компенсация состояний переутомления и	Противоастеническое действие, антигипоксическая активность,	Короткие курсовые приемы совместно с

Цель применения	Механизм формирования эффекта	Особенности применения
перетренированности	активация глюконеогенеза и репаративного протеинсинтеза, устранение дистрофических процессов в миокарде и печени	витаминами, микроэлементами, ноотропами, нестероидными анаболическими, адаптогенами
Ускорение адаптации к неблагоприятным климатогеографическим условиям региона соревнований	Адаптивные протеинсинтезы, антигипоксическое и антиоксидантное действие, повышение сопряжения окисления и фосфорилирования, индукция белков теплового шока	В условиях преадаптации – курс 5-7 тренировок, прием сразу после воздействия, при акклиматизации – курс 7-10 дней 2 раза в день
Коррекция десинхронозов	Противоастеническое действие	Курс 3-5 дней при переезде в новый часовой пояс

Очевидно, достижение даже нескольких из указанных целей применением одного фармакологического средства не представляется возможным. Точно также, препарат, обеспечивающий выполнение одной из задач (например, стартовой мобилизации), не сможет быть эффективным для решения задач, требующих иных физиологических и молекулярных механизмов (например, ускорение процессов постнагрузочного восстановления).

Фармакологическая оценка новых лекарственных средств, потенциально активных в отношении физической работоспособности, может проходить как первичная фармакологическая оценка специфической активности, расширенное изучение выявленных эффектов и их возможных механизмов, а также в режиме изучения общей фармакологической активности и безопасности новых лекарственных средств.

Целями отбора и первичного фармакологического исследования средств, влияющих на физическую работоспособность являются:

1. Установление наличия специфической активности у исследуемого вещества;
2. Определение оптимального способа реализации специфического эффекта.

В зависимости от специфики конкретного исследования могут применяться схемы курсового применения, выявления следовых эффектов, эффектов восстановления при повторном нагрузочном тестировании, адаптационные схемы исследования с введением изучаемого препарата сразу после завершения нагрузок (Таблица 1).

Первичный отбор препаратов ведется на организменном уровне на одной или нескольких моделях физической работоспособности. В связи с неоднозначностью патогенетических механизмов, лежащих в основе различных типов нарушений функционального состояния и работоспособности, различий в молекулярных механизмах повышения (восстановления) работоспособности, специфическая активность новых соединений в отношении работоспособности, проявляемая на одной из каких-либо моделей, не обязательно должны воспроизводиться на другой. Поэтому при выявлении специфической активности исследуемых соединений следует указывать, для каких форм работоспособности (статическая или динамическая выносливость, скоростно-силовые качества, восстановление после нагрузок, адаптация к нагрузке), и при каких патологических состояниях (утомление, переутомление, перетренированность, десинхронозы и т.д.) вещество может быть применено как средство повышения физической работоспособности.

При первичной оценке специфической активности рекомендуется проводить исследования не менее, чем на двух видах лабораторных животных. Их количество должно быть достаточным для статистической обработки (не менее 8 животных в каждой точке исследования). По каждому тесту следует выявлять действие соединения, используя не менее чем в 2-3 дозах, рассчитанных в соответствии с LD50 (1/10 от LD50 и менее). Оптимальны является построение графической кривой зависимости «Доза-эффект», позволяющей определить рабочий и оптимальный диапазоны доз.

Должны быть использованы не менее двух способов введения вещества в организм животного, один из которых должен соответствовать предполагаемому способу клинического применения. Контрольной группе животных вводят физиологический раствор тем же способом в эквивалентном количестве. В связи с

разнообразием методов оценки физической работоспособности лабораторных животных каждый используемый метод должен быть подробно описан. Данные обрабатываются с помощью современных методов статистики и представляются в виде таблиц и рисунков.

Исследование необходимо проводить параллельно и в сравнении с контролем. Вещества вводятся животному за 45-60 минут до начала тестирования работоспособности.

Как правило, на уровне первичного выявления специфической активности у потенциальных средств повышения работоспособности, проводится оценка на мелких лабораторных животных (мыши, крысы) в нагрузочных и координаторных тестах.

Для оценки специфической активности лекарственных средств традиционно используется два подхода: оценка влияния препарата на среднегрупповые показатели, а также сдвиг в популяционной структуре исследуемого качества (например, изменение долей низко-, средне- и высоковыносливых животных). Как правило, первый подход используется для оценки однократного применения препарата, второй – курсового применения лекарственных средств.

В стандартных исследованиях специфическая активность анализируемой субстанции может выражаться в относительных единицах (по отношению к контролю, в безразмерном варианте или в процентном исчислении) на основе среднегрупповых значений:

$$КА = \frac{X_{пр}}{X_{к}},$$

где КА – коэффициент активности; $X_{пр}$ – значение анализируемого показателя работоспособности при приеме препарата X ; x_k – в контрольной группе.

Достаточно проблемным видится выбор адекватного показателя физической работоспособности животных, особенно в отношении специфических для отдельных видов спорта качеств. Дополнительными критериями влияния на работоспособность является способность новых соединений оказывать влияние на психоэмоциональное состояние животных, их функциональные резервы, механизмы эндокринной и вегетативной регуляции, устойчивость к гипоксии.

Для оценки профилактической специфической активности потенциальных лекарственных средств также может применяться Индекс защиты (ИЗ), который показывает, какая часть изменений анализируемого показателя, возникающих под влиянием физической нагрузки (например, повышение уровня лактата крови), компенсировалась профилактическим введением данного лекарственного средства [37].

$$ИЗ=100*\frac{X_{пл}-X_{пр}}{X_{пл}-X_{ф}},$$

где $X_{пл}$, $X_{пр}$, $X_{ф}$ – значения анализируемого параметра в плацебо-группе (воздействие фактора), при профилактическом введении препарата (препарат + воздействие фактора), и у интактных животных (фоновые данные) соответственно.

Важным методическим аспектом является выбор показателя, характеризующего выраженность ответа организма на физическую нагрузку. Он должен иметь однозначную трактовку в конкретном виде биомедицинского исследования, патогенетически быть связанным с работоспособностью (утомлением, восстановлением), быть монотонно возрастающим при увеличении степени физической нагрузки (и соответственно, монотонно снижаться при снижении степени нагрузки). Оптимальным является выбор показателя, который статистически достоверно повышается в ответ на физическую нагрузку.

В сравнительных исследованиях с использованием референсных (эталонных) препаратов специфическая активность исследуемого соединения оценивается в «эталонных» (например, сиднокарбовых) единицах, которые рассчитываются по следующей формуле:

$$САэ=\frac{X_{пр}-X_{пл}}{Xэ-X_{пл}},$$

где САэ – специфическая активность в «эталонных» единицах; X – показатель переносимости нагрузочной пробы (например, время предельного выполнения нагрузки, уровень лактата и т.д.); $X_{пр}$ – при приеме исследуемого препарата; $X_{пл}$ – при приеме плацебо; $Xэ$ - при приеме «эталонного» препарата в стандартной дозе.

Кроме того, можно определить Коэффициент сравнительной эффективности (Ксэ):

$$K_{сэ} = \frac{X_{пр}}{X_{э}},$$

где $X_{пр}$ – значение анализируемого показателя в условиях тестирования работоспособности при приеме препарата; $X_{э}$ – при приеме эталонного препарата.

Кроме первичной оценки специфического действия, может также выполняться расширенное изучение специфичности активности веществ и механизмов их действия, а также изучение сопутствующей фармакологической активности веществ, их фармакодинамики, безопасности.

Расширенное изучение специфичности активности веществ проводится, если в ходе первичной фармакологической оценки была выявлена высокая активность, сопоставимая или превышающая активность референсных (эталонных) препаратов. Она подразумевает последовательное прохождение методик оценки работоспособности в соответствии с набором тестируемых ее качеств (скорости, выносливости, утомляемости, способности к восстановлению, адаптируемости к нагрузкам) и дополнительных методов (эмоциональная сфера, функциональные резервы и механизмы регуляции, устойчивость к гипоксии). При этом сопоставление специфической активности вещества в одной и той же дозе и одинаковом пути введения позволяет выявить тот уровень регуляции работоспособности, на котором реализуется специфическая активность.

Расширенное изучение специфической активности должно проводиться как на мелких, так и крупных лабораторных животных. В качестве крупных лабораторных животных в биомедицинских исследованиях наиболее удобным объектом являются мини-пиги.

При переходе исследований с одного вида животных на другой, а также определения прогнозируемой эффективной дозы для человека необходимо осуществлять перерасчет доз с учетом видовых метаболических коэффициентов: для мыши массой 20 г – 3,0, для крыс массой 200 г – 6,0, для мини-пига массой 20 кг – 24, для человека массой 70 кг – 39 [3].

С учетом целевых задач отдельных исследований (например, оценка влияния препаратов на процессы восстановления или эффективность тренировочного

процесса) при проведении биомедицинских (доклинических) исследований важным становится корректное моделирование физической нагрузки. И если в исследованиях процессов восстановления она может задаваться как предельно переносимая и соответствовать методикам исследования работоспособности (например, плавательным или беговым тестам), то при оценке влияния фармакологического средства на эффективность тренировочного процесса необходимо отдельно разрабатывать циклограмму тренировочного процесса, планируя в качестве стартового уровня нагрузки на уровне 65-70% от максимальной с постепенным повышением до предельного уровня. В исследованиях подобного типа также необходимо определять «следовой уровень» достигнутого эффекта, который тестируется спустя 7-14 дней после прекращения приема препарата и завершения тренировочного цикла.

Важную информацию о механизмах специфического действия изучаемого вещества могут дать оценка его влияния на энергетический обмен и пул аденилнуклеотидов, процессы окислительного фосфорилирования, состояние дыхательной цепи и редокс-системы клетки, величину мембранных потенциалов и транспорт ионов, состояние клеточных и митохондриальных мембран, перекисные процессы.

Самостоятельными задачами являются поиск субклеточных и молекулярных мишеней, на которые может быть направлено действие нового вещества со специфической активностью в отношении работоспособности, изучение его влияния на различные рецепторные и функциональные системы, микроциркуляцию и реологические свойства крови, сродство гемоглобина к кислороду. Новые возможности в этом направлении открывает математическое моделирование рецептор-лигандного взаимодействия молекулярной структуры соединения с типовыми структурами фармакологических мишеней [36].

Установление различий в эффективности специфического действия вещества при тестировании работоспособности у животных с высокой и низкой выносливостью является необходимым при разработке тактики фармакологической

коррекции работоспособности, в том числе при клинически значимых патологических состояниях.

Объем исследований механизма действия вещества со специфической активностью в отношении работоспособности может существенно варьировать в зависимости от методических возможностей организации-разработчика. Проведение такого рода экспериментальной работы не является обязательной.

Изучение общей фармакологической активности новых средств повышения работоспособности, их фармакокинетики и безопасности включает выявление влияния исследуемых веществ на общее состояние и работоспособность животных, психотропную активность, сердечно-сосудистую систему, дыхание, периферические отделы нервной системы, а также изучение фармакокинетики, метаболизма и токсичности.

Наблюдение за состоянием животных проводят на мышах и крысах при введении препарата в широком диапазоне доз от не оказывающих заметного влияния на общее состояние до вызывающих гибель. При этом определяют возбудимость, увеличение или снижение двигательной активности, наличие тремора, судорожных подергиваний, судорог, гиперкинезов и т.д. Изучается влияние веществ на температуру тела животных, потребление воды и пищи, динамику массы тела.

Подробное описание методов изучения общих эффектов фармакологической активности, фармакокинетики и безопасности новых препаратов представлено в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [27].

6. Общие аспекты стандартизации методик при работе с лабораторными животными

На состояние животных, определяющее сопоставимость, стабильность и воспроизводимость результатов биомедицинских (доклинических) исследований, оказывают свое влияние несколько групп факторов. К ним относятся [11] следующие ниже перечисленные факторы.

1. Биологические (фенотипические, генотипические) – порода, линия, пол, возраст, специфические состояния (эструс, беременность, кормление), состояние здоровья;

2. Хронобиологические (циркадные) – время года, время суток, световой ритм, ритм кормления и водопотребления;

3. Физико-химические – температурные (микроклиматические) условия содержания, наличие электромагнитных, звуковых и ультразвуковых сигналов или шумов, особенности газового состава вдыхаемого воздуха, наличие посторонних химических примесей в воздухе, воде и корме;

4. Алиментарные – состав и достаточность корма, качество и количество питьевой воды, специализированных кормовых добавок;

5. Манипуляционные – путь введения лекарственного средства или физраствора контрольным животным;

6. Зоосоциальные и зоопсихологические – групповые условия содержания в клетках, соседство с другими животными своего или иных видов, возможность спонтанного поведения, поисковой и двигательной активности, эмоциональное взаимодействие и коммуникации с обслуживающим и исследовательским персоналом, адаптация к условиям содержания и аппаратуре исследования, обучение и тренировки

7. Стрессорные – реакции животных на стрессогенные факторы (если они не являются целью исследований).

Поэтому должны быть обеспечены максимально сопоставимые (стандартизированные) условия содержания, подготовки животных к исследованиям и собственно проведения исследований.

Стандартизация животных по биологическому фактору обеспечивается выбором животных конкретных линий, пола и возраста, поступлением их из сертифицированного питомника, состояние здоровья животных должно быть подтверждено ветеринарным сертификатом.

После поступления животных из питомника в лабораторию (виварий при исследовательской лаборатории) животные должны находиться в условиях карантина не менее 10 дней с ежедневным осмотром для оценки состояния здоровья, исключения риска передачи инфекционных заболеваний, и адаптации животных к условиям содержания.

6.1. Стандарты содержания животных

Животных содержат в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и Правилами надлежащей лабораторной практики Таможенного Союза.

Маркировка клетки кодирует пол животных, породу, дату начала введения препаратов, название группы. Каждому отобранному в исследование животному должен быть присвоен индивидуальный номер. Мелких грызунов маркируют красящими метками на корпусе или с помощью меток на хвосте. Мини-пигов маркируют бирками на ушной раковине.

Мыши и крысы содержатся в вентилируемых клетках, группами по 5 (мыши) или 3 головы (крысы) в клетке. Мини-пиги содержатся в индивидуальных клетках. В качестве подстилки используют стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001. Кормление животных осуществляется по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным дается *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержатся в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживается 12-часовой цикл освещения (СП 2.2.1.3218-14).

Все работы с животными осуществляются в соответствии с утвержденным Протоколом, одобренным биоэтической комиссией учреждения. Протокол исследования должен учитывать требования Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, и Правил проведения работ с использованием лабораторных животных (1977).

После завершения эксперимента животные выводятся из исследования в соответствии с утвержденным Протоколом. Биоматериал подлежит утилизации в соответствии с Ветеринарно-санитарными правилами сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 № 400).

6.2. Стандарты манипуляций с животными

Все манипуляции с животными осуществляются в соответствии с требованиями СОП (стандартных операционных процедур).

Стандартная операционная процедура – это документ, детально описывающий процедуры манипуляций, которые, как правило, подробно не описываются в протоколах конкретных исследований. Написание СОП осуществляется квалифицированными в данной области специалистами. СОП утверждается руководством исследовательской организации и подлежит строгому исполнению, так как формирует правильное и пошаговое представление о процедуре или манипуляции, что уменьшает вероятность допущения ошибок, тем самым, гарантируя высокое качество работы. Все отклонения от СОП документируются как первичные данные, они подписываются руководителем исследования или ответственным исполнителем. Кроме этого рассматривается вопрос о влиянии данного отклонения от СОП на качество получаемых данных.

При написании СОП на первой странице обычно указывается следующая служебная информация:

- название исследовательской организации;
- название СОП;
- порядковый номер СОП;

- номер версии СОП;
- номер страницы из общего количества страниц;
- дата введения СОП;
- Ф.И.О. и должность автора СОП;
- Ф.И.О. и должность руководителя, утвердившего СОП;
- форма обучения СОП (чтение или практическое занятие).

На каждой последующей странице в верхнем колонтитуле указывается номер СОП, номер версии, дата введения СОП в действие и номер страницы. В содержательной части СОП приводится цель данного документа, а также персонал, которому он предназначен. Описание процедуры должно быть достаточно полно, но в то же время кратко, не перегружая документ излишней информацией. При необходимости СОП может содержать данные о правилах техники безопасности при выполнении описанной процедуры, а также может включать в себя ссылки на другие СОП, книги, статьи, руководства и прочие источники.

В качестве приложений к СОП могут выступать различные бланки, которые будут использоваться для регистрации данных, полученных при выполнении процедуры. Бланк должен содержать (в виде колонтитула) следующую информацию: номер приложения, номер СОП, номер версии, дата введения СОП в действие.

СОП подлежит своевременному пересмотру. Очередной пересмотр обычно проводят один раз в 2 года. Если СОП утрачивает актуальность в связи с изменением методики или заменой оборудования, все копии документа изымаются из обращения, и оригинал передается в архив. Содержание СОП может быть изменено, дополнено или сокращено до наступления периода пересмотра, если это необходимо для работы. В этом случае оформляется поправка к СОП. При пересмотре учитываются все имеющиеся поправки. После пересмотра СОП также утверждается руководством исследовательской организации. Оригиналы устаревших версий СОП сохраняются в архиве.

Согласно международным принципам надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practices – GLP), разработанным организацией экономического

сотрудничества и развития (Organization for Economic Cooperation and Development – OECD) исследовательская организация должна иметь Программу СОП, отражающую весь спектр проводимых работ. Программа СОП должна включать в себя, но не ограничиваться, описание следующих видов деятельности:

1. *Тестируемые и стандартные объекты исследования.*

Поступление, идентификация, маркировка, манипуляции при работе, отбор проб, хранение.

2. *Приборы, материалы и реактивы.*

а) *Приборы.*

Использование, обслуживание, уход, калибровка.

б) *Компьютерные системы.*

Валидация, порядок работы и обслуживания, порядок доступа к информации, контроль над внесением изменений, создание резервных копий.

в) *Вещества, реактивы и растворы.*

Приготовление и маркировка.

3. *Текущие записи, отчетность, хранение и извлечение информации.*

Система обозначений, сбор данных, подготовка докладных (актов, донесений, служебных записок), методы индексации, обработка информации (в том числе компьютеризированная).

4. *Тест-системы.*

а) подготовка помещений и создание условий для размещения тест-систем;

б) получение, транспортировка, размещение, характеристика и идентификация тест-систем, уход за ними;

в) подготовка тест-систем, наблюдения и осмотры до, во время и после исследования;

г) обращение с тест-системами, умирающими или умершими во время исследования;

д) сбор, идентификация и порядок работы с образцами, включая некропсию и патоморфологические исследования;

е) размещение тест-систем на исследовательских площадках.

5. Программа обеспечения качества.

Планирование и составление графика проверок, проведение проверок и отчетность по ним.

В исследовательской организации программа СОП по лабораторным животным может включать в себя несколько разделов. Первый раздел программы, например, может быть посвящен приемке, содержанию, уходу и контролю здоровья животных. Конкретные СОП могут иметь следующие типовые названия:

- основные принципы работы в комнате содержания животных;
- рутинные манипуляции по уходу за грызунами;
- карточки на клетках;
- умершие животные;
- ежедневный осмотр состояния животных;
- доклад об обнаружении отклонений здоровья животных;
- признаки нарушения здоровья животных;
- лишение корма;
- размещение лабораторных животных в клетках;
- хранение и подготовка подстила;
- хранение и подготовка корма;
- прием животных, карантин, адаптация;
- инвентаризация животных;
- проход персонала в чистую зону содержания животных;
- поступление материалов и оборудования в чистую зону;
- правила содержания грызунов в барьерной зоне;
- содержание грызунов в конвенциональных комнатах;
- перемещение и вынос животных;
- заказ животных;
- беглые животные;
- использование резервных животных;
- санитарная обработка клеток и аксессуаров для содержания животных;
- программа контроля здоровья животных;

- санитарная обработка уборочного инвентаря.

В этих СОП содержится информация о том, как осуществляются транспортировка, прием, первоначальная оценка здоровья животных и карантин; как проводят ежедневное наблюдение за животными, ветеринарную медицинскую помощь, лечение и изоляцию больных животных; как выполняют мониторинг состояния здоровья животных, который включает в себя серологические, бактериологические, паразитологические, патоморфологические и другие исследования; какие используются клетки и стеллажи; как контролируются условия окружающей среды в комнатах содержания животных; какие используются корма, подстил и вода; как происходит кормление и поение. Особое внимание уделяется вопросам, которые связаны с описанием работ с животными в выходные и праздничные дни, а также, что делать в случае обнаружения нарушений в здоровье животного или в случае его смерти. Кроме этого, в СОП описывается, как часто моются и подвергаются санитарной обработке клетки, какие дезинфицирующие и очищающие агенты для этого используются, как часто и с использованием каких дезинфектантов выполняется влажная уборка комнат содержания животных, как обрабатывается уборочный инвентарь, где хранятся отходы, и как часто они удаляются из помещений.

6.3. Стандартизация обучения животных методикам и тренировок

Прошедшие карантин животные, соответствующие критериям включения в исследование, проходят предварительное ознакомление (обучение) выполнению методик, и, при необходимости, повторные тренировки.

Ознакомление с методикой подразумевает кратковременное помещение животного в установку, с помощью которой осуществляется методика (например, для оценки поведенческой активности – в регистрирующий модуль системы Laboras, на площадку методики открытого поля). Для снижения выраженности стресс-реакции предварительное ознакомление животных производится и при выполнении теста вынужденного плавания животных с грузом.

Обучение методики подразумевает относительно кратковременное пребывание в условиях выполнения исследования в более мягких условиях

воздействия для выработки у животного заданной стереотипной поведенческой реакции (например, удержание и навык движения на вращающемся горизонтальном стержне, навык движения животного к финишной зоне при выполнении методик челночного плавания или кинезогидродинамического исследования). Кратность занятий по обучению определяется сформированностью нужного двигательного навыка.

Если по протоколу исследования животное повторно должно проходить методику спустя длительное время (например, в исследованиях по курсовому применению лекарственных средств), накануне повторного тестирования также проводится и повторное занятие по обучению для восстановления ранее сформированного двигательного навыка.

Тренировка животных подразумевает их повторное пребывание в условиях выполнения исследования в более мягких или плавно нарастающих по тяжести от занятия к занятию условиях для выработки у животного необходимого уровня сформированности нужного двигательного навыка. Например, в тесте бега мини-пигов на тредбане до отказа нужно не только сформировать у животных навыки бега на тредбане (обычно из всей популяции пигов-самцов к бегу способны не более 20-25%), но и вывести время их бега к стандартным величинам. Для этой методики таких стандартных величин две – 20-25 минут (модель «спортсмен») и 40-50 минут (модель «спортсмен высокого уровня»). Как правило, минимальное количество тренировок для мини-пигов – 8-10. При проведении тренировок в этой методике используется скорость движения ленты 3 км/час, а для тестирования работоспособности – 6 км/час.

6.4. Стандартизация по хронобиологическим факторам

Из всех лабораторных животных наиболее чувствительными к действию хронобиологических факторов являются грызуны. Их сезонная функциональная активность накладывается на сезонность реагирования на стимулирующие факторы (минимум в периоды июнь-сентябрь), в результате чего для препаратов активирующего действия воспроизводимость и стабильность результатов в разное время года могут существенно отличаться.

В таблице 2 представлены данные, характеризующие влияние фактора сезонности на работоспособность лабораторных животных (метод однофакторного дисперсионного анализа) без проведения фармакологического воздействия на животных.

Таблица 2 – Результаты дисперсионного анализа фактора «сезонность»

Показатель	Центроиды групп по периодам						D	p
	февраль-март	апрель - май	июнь - июль	август - сентябрь	октябрь - ноябрь	декабрь - январь		
Кинезогидродинамическая модель								
Скорость плавания, м/мин	20,2	24,8	21,3	24,9	21,0	23,0	0,24	4*10 ⁻²⁹
Максимальная дистанция плавания, м	12,2	18,1	14,4	17,9	12,1	7,6	0,17	5*10 ⁻²⁰
Выносливость, усл.ед	2,7	5,2	3,8	5,3	3,0	2,3	0,26	2*10 ⁻³¹
Другие модели исследования работоспособности животных								
Время плавания крыс с грузом 10%, с	115,3	141,3	127,0	107,3	125,3	120,2	0,04	0,001
Тест ротарод, крысы, с	40	89	56	173	133	104	0,41	5*10 ⁻²⁰
Время бега мини-пигов на тредбане, мин	23,0	26,4	20,2	21,2	20,3	39,7	0,43	6*10 ⁻¹⁸

Примечание: D – коэффициент детерминации модели (показывает, какая часть общей вариативности показателя может быть отнесена к влиянию анализируемого фактора); p – уровень значимости.

Фактор сезонности особенно существенен для показателя теста ротарод (объясняет 41% вариабельности времени удержания животных на вращающемся стержне), выносливости и скорости плавания в кинезогидродинамическом исследовании (26 и 24% общей вариабельности соответственно).

Время предельного плавания крыс с грузом 10% от массы тела в годовом цикле исследований не имеет выраженных сезонных пиков или провалов (отмечается лишь умеренное повышение в апреле-мае и также умеренное снижение в августе-сентябре).

В тесте ротарод отмечается выраженная сезонная динамика показателей – низкие значения в феврале-марте, высокие значения в августе-ноябре. И только в периоде апрель-июль и декабрь-январь значения этого показателя соответствуют среднегодовому уровню.

В отношении времени бега мини-пиггов на тредбане до отказа только в одном периоде (декабрь) результаты теста существенно отличаются от среднегодового уровня, однако это может быть отнесено не к сезонным изменениям работоспособности животных, а к их взрослению к этому времени и большему уровню тренированности.

При проведении исследований с применением веществ с нейротропной активностью (стимулирующее или седативное действие) необходимо учитывать сезонный цикл хронэстезии для подобных лекарственных веществ – снижение чувствительности к активирующему влиянию в период с июня по сентябрь и повышение чувствительности к седативным воздействиям в период с ноября по февраль [2].

Для снижения значимости внутрисуточных различий рекомендуется все исследования, связанные с оценкой работоспособности животных, начинать в период с 10-11 часов утра по местному времени, завершая исследования в пределах местного светового дня вне зависимости от искусственного освещения.

6.5. Стандартизация по зоосоциальным и зоопсихологическим аспектам

В целях стандартизации по зоосоциальным и зоопсихологическим аспектам из исследования исключаются (если иное не вытекает из специфических задач конкретного исследования и его протокола) животные, проявляющие выраженные признаки агрессивного поведения в группе, демонстрирующие свое доминантное положение в группе, а также животные, выключенные из обычной сферы коммуникаций животных (подобное может быть признаком заболевания животного).

В этих же целях важным является разграничение ширмами зон исследования, в которых осуществляется параллельная работа с животными, так, чтобы животные не видели друг друга.

Непосредственно с включенными в исследование животными допускается контакт ограниченного числа сотрудников вивария и исследовательской лаборатории. При возможности, желательным является участие в манипуляциях с животными одних и тех же сотрудников.

С учетом важности для коммуникаций животных запаховых сигналов, сотрудникам, участвующим в исследованиях, запрещается в день исследования использования ароматических косметических средств и парфюмерии.

Помещение, в котором выполняются манипуляции с животными, должно быть защищено от сторонних шумов, звуков, вибраций, электромагнитных и ультразвуковых излучений, иметь однородное (не мигающее) освещение.

6.6. Статистическая стандартизация

Все полученные в ходе исследования должны быть обработаны статистически. В ходе статистического анализа должна быть выполнена проверка на нормальность частотного распределения исследуемого показателя, например по показателям асимметрии и эксцесса, гистограммам распределения, критериям Колмогорова-Смирнова или Лилиефорса. В случае, если анализируемый показатель имеет распределение, близкое к нормальному, то он может обрабатываться любым статистическим методом, как параметрическим, так и непараметрическим. Если характер распределения анализируемой величины отличается от нормального, то корректным будет применение только непараметрических критериев. Наиболее применимыми для установления различий между группами (например, опытной и контрольной) будут F-критерий дисперсионного анализа (ANOVA), критерий Вилкоксона-Мана-Уитни, критерий знаков и метод точной вероятности Фишера.

Если показатель имеет нормальное статистическое распределение, его значения могут сопоставляться с данными других исследований. Возможен также популяционный перенос полученных на ограниченной выборке экспериментальных результатов на генеральную совокупность, а также прогноз возможного эффекта на

другие виды животных (с использованием процедуры прямого и обратного Z-нормирования).

Если показатель имеет статистическое распределение, существенно отличающееся от нормального, то сопоставление результатов данного частного исследования с другими и решение вопросов популяционного переноса возможно только с использованием процедуры прямого и обратного Z-нормирования.

Процедура Z-нормирования позволяет трансформировать экспериментальные данные к Z-оценкам, имеющие нормальное статистическое распределение. Система Z-оценок обычно используется, если анализируемые материалы в дальнейшем планируется подвергать параметрическим видам математической обработки и статистического моделирования (корреляционный, регрессионный, мультифакторный, кластерный и др. виды анализа). Расчет Z-оценок проводится по следующей формуле:

$$Z(x) = (X-M)/\sigma,$$

где $Z(x)$ – Z-оценка величины X ; X – оцениваемая величина; M – математическое ожидание (среднее значение) параметра X ; σ – стандартное отклонение параметра X . Значения параметров для расчета Z-оценок представлены в соответствующих описаниях методик (раздел 4). Для интерпретации динамики значений Z-оценок важным является их знак (больше или меньше нуля), значимыми являются отличия более чем на одну единицу.

При решении задач оценки показателя в динамике или в задачах классификации (отнесения к определенному классу объектов) часто применяются T-баллы, которые являются производными Z-оценок и рассчитываются по следующей формуле:

$$T(x)=50 + 10*Z(x).$$

Статистически значимым является сдвиг на 10 T-баллов и более.

Процедура обратного Z-нормирования строится на основе равенства Z-оценок наблюдения $X(i)$ в любом нормальном статистическом распределении. Поэтому, например, в исследованиях на крысах определяется Z-оценка наблюдаемого эффекта лекарственного препарата. В силу равенства Z-оценок она должна быть

равна Z-оценке эффекта, полученного на другой популяции, при условии, что она имеет нормальный вид статистического распределения исследуемого показателя. На основе знаний математического ожидания и стандартного отклонения исследуемого показателя в новой популяции, и величины Z-оценки эффекта, проводится обратный расчет прогнозируемой величины:

$$X_n = M_n + Z * \sigma_n,$$

где X_n – прогнозируемое значение показателя X в новой популяции; M_n и σ_n – значение математического ожидания и стандартного отклонения показателя X в новой популяции; Z – Z-оценка величины эффекта в старой популяции. Полученное прогнозируемое значение является ориентировочным и должно быть экспериментально проверено.

7. Оцениваемые качества спортсменов и адекватные им методы биомедицинских исследований

При оценке физической работоспособности спортсменов обычно исследуют ее статические и динамические компоненты, а также характеристики, замыкающиеся на преимущественный тип энергообеспечения физической деятельности (аэробный, анаэробный, смешанный аэробно-анаэробный).

Показатели работоспособности подразделяются на прямые и косвенные. Прямые показатели характеризуют конечный результат (эффективность и надежность выполнения деятельности), а также «рабочих тестов» – стандартизированные по объему, времени и условиям выполнения рабочие задания, представляющие собой по содержанию отдельные элементы рабочей деятельности. Косвенные показатели работоспособности делятся на показатели текущего функционального состояния организма и его резервных возможностей.

Показатели резервных возможностей организма определяются при проведении функциональных нагрузочных проб, которые характеризуют, в первую очередь, степень напряжения и уровень компенсаторных возможностей различных систем организма, при выполнении дополнительных задач на фоне основной деятельности, введении отказов техники в ходе выполнения задания на тренажере и т.п.

В практике спортивной медицины есть две группы качеств деятельности спортсменов, оцениваемых явно или неявно. К группе явно оцениваемых качеств относятся:

- скоростные качества (короткие и средние дистанции всех видов бега, плавания, лыжных и конькобежных гонок, велоспорта и т.д.);
- силовые характеристики (тяжелая атлетика, метания диска, молота и копья, бокс и другие единоборства ...);
- выносливость – способность противостоять утомлению (длинные дистанции бега, плавания, лыжных и конькобежных гонок, велоспорт, игровые виды спорта...);
- координированность (гимнастика, единоборства, прыжки, игровые виды спорта, стрельба ...).

К группе неявно оцениваемых видов спорта относятся:

- психологическая готовность (стресс-устойчивость, собранность, способность к мобилизации, спортивная злость ...);
- функциональные резервы (реакция на нагрузку сердечно-сосудистой и дыхательной систем, резервы вегетативной и эндокринной регуляции, уровень гликогена в тканях, глюкозы в крови, кислородная емкость крови ...);
- скорость восстановления (активность адаптивного протеинсинтеза, глюконеогенеза, утилизации лактата, ресинтеза гликогена и креатинфосфата ...);
- адаптируемость (адаптация к росту физических нагрузок, климато-географических факторов, смене суточных ритмов ...).

Очевидно, что, как в клинических, так и биомедицинских (доклинических) исследованиях, должны использоваться такие методы исследований, которые позволяют оценить эти качества спортсменов. В таблице 3 представлены методы доклинических исследований, сгруппированные по оцениваемым качествам спортсменов.

Таблица 3 – Характеристика методов оценки влияния фармакологических средств на работоспособность лабораторных животных по видам моделируемых качеств работоспособности

Моделируемое качество работоспособности	Методика исследования	Вид животных, особенности выполнения
Скорость	Кинезогидродинамическое исследование	Крысы
	Бег на тредбане	Крысы, модель «бег возрастающей скорости»
Выносливость аэробная	Предельное плавание с грузом	Крысы, груз 5%
	Кинезогидродинамическое исследование	Крысы
	Челночное плавание	Мыши, груз 2%
	Бег на тредбане	Крысы, мини-пиги
Выносливость аэробно-анаэробная	Предельное плавание с грузом	Крысы, груз 10%
Выносливость анаэробная	Предельное плавание с грузом	Крысы, груз 15%
	Проба на устойчивость к гипоксии	Крысы, высота 11500 м
Утомляемость нервно-динамическая	Кинезогидродинамическая модель	Крысы
	Челночное плавание	Мыши
	Рота-род	Мыши, крысы

Моделируемое качество работоспособности	Методика исследования	Вид животных, особенности выполнения
Выносливость к статическим нагрузкам	Тест силы хватки лап	Крысы, мыши
	Удержание на скользком вертикальном стержне	Мыши
Координированность	Тест рота-род	Мыши, крысы, модель возрастающей скорости вращения
«Взрывная» работа с высокой координированностью	Тест рота-род	Крысы, модель прыжковой нагрузки
Восстанавливаемость после истощающих нагрузок	Трехэтапный плавательный тест	Крысы, груз 10%
Агрессивность	Модель «боя самцов»	Крысы
Функциональные резервы	Бег на тредбане	Мини-пиги, ЭКГ, тесты вегетативной регуляции, насыщение крови кислородом, биохимические пробы (глюкоза, лактат, пул макроэргов)
Силовые характеристики динамические	Не разработаны	Не разработаны

8. Классификация методов биомедицинского исследования физической работоспособности

Несмотря на обилие работ по исследованиям физической работоспособности на лабораторных животных, общепринятой систематизации и классификации методов и методик таких исследований не существует.

Наиболее часто встречаются попытки группировки методик по видам лабораторных животных (для исследований на мелких и крупных лабораторных животных), по видам нагрузок (статические и динамические - плавательные, беговые, координационные), характеру энергообеспечения тестируемых нагрузок (преимущественно аэробные, преимущественно анаэробные, смешанные аэробно-анаэробные), характеру регистрируемых показателей (прямые и косвенные, к которым чаще всего относят результаты выполнения поведенческих, биохимических и физиологических исследований, включая тест на устойчивость к гипоксии).

С учетом потребности в приближении методов биомедицинских исследований к потребностям практики спортивной медицины, нами предложена следующая рабочая классификация методов исследования физической работоспособности, главным классификационным признаком которой является оцениваемое качество спортивной деятельности. Важно также учитывать, одно ли качество позволяет исследовать данная методика, или она ориентирована на оценку комплекса характеристик, характеризующих работоспособность животных.

В соответствии с этими критериями, предлагаемая рабочая классификация может иметь следующий вид:

А. Методы комплексного исследования работоспособности

Кинезогидродинамическое исследование.

Б. Методы оценки отдельных характеристик работоспособности

1. Методы оценки скоростных характеристик.
 - 1.1. Тест бега на тредбане в режиме нарастающей скорости (на грызунах).
2. Методы оценки выносливости.

- 2.1. Плавательные тесты.
 - 2.1.1. Методика челночного плавания (мышь).
 - 2.1.2. Методика вынужденного плавания с грузом (мышь, крысы).
- 2.2. Беговые тесты.
 - 2.2.1. Тест бега на тредбане до отказа (крысы, мини-пиги).
- 3. Методы оценки силовых характеристик.
 - 3.1. Тест силы хватки (мышь, крысы).
 - 3.2. Тест удержания на скользком вертикальном стержне.
 - 3.3. «Прыжковый» тест.
- 4. Методы оценки координационных функций.
 - 4.1. Тест удержания на вращающемся горизонтальном стержне (тест ротарод, мышь, крысы).
 - 4.2. Тест «прогулки по приподнятой перекладине» (мышь, крысы).
 - 4.3. Методика оценки походки по следам.
- 5. Методы оценки процессов восстановления.
 - 5.1. Трехнагрузочный плавательный тест (крысы).
 - 5.2. Тест повторного предъявления нагрузок на тредбане (крысы, мини-пиги).
- 6. Методы оценки функциональных резервов.
 - 6.1. Проба на индивидуальную чувствительность к гипоксическому воздействию.
 - 6.2. Методы определения потребления кислорода у животных.
 - 6.2.1. Метод газоанализа воздуха в вентилируемых клетках (крысы).
 - 6.2.2. Метод расчета по PWC_{170} (мини-пиги).
 - 6.2.3. Оценка степени оксигенации крови (мини-пиги).
- 7. Вспомогательные методы оценки функциональных систем при выполнении физических нагрузок.
 - 7.1. Методы оценки состояния ЦНС.
 - 7.1.1. Тест «бой самцов» на оценку агрессивности (крысы).
 - 7.1.2. Тесты оценки спонтанной поведенческой активности.

7.1.2.1. Тесты открытого поля (мыши, крысы).

7.1.2.2. Тест анализа локомоторной активности «Laboras» (крысы).

7.1.2.3. Оценка ультразвуковой вокализации животных (крысы).

7.2. Методы оценки метаболических процессов (определение уровня глюкозы, лактата в крови, ферментов метаболизма и заряда аденилнуклеотидов в мышечной ткани).

7.3. Методы оценки эндокринной регуляции (определение уровня гормонов в крови, мини-пиги).

7.4. Методы оценки вегетативной регуляции (спектральный анализ ритма сердца по ЭКГ, мини-пиги).

9. Описание методов исследования физической работоспособности на лабораторных животных и особенностей интерпретации их результатов

9.1. Кинезогидродинамическое исследование

Основным принципом кинезогидродинамического исследования является плавание животного в гидроканале с изменяющимся ламинарным встречным потоком жидкости, который должно преодолевать подопытное животное [16, 13]. В зависимости от целей конкретного исследования можно, задавая вариации скорости ламинарного потока, создавать и разную степень физической нагрузки, а также имитировать разные этапы тренировочного процесса (например, вбрасывания в нагрузку, или финишного рывка). В интересах доклинической оценки влияния лекарственных средств на физическую работоспособность скорость встречного ламинарного потока должна быть фиксированной, и, для обеспечения сопоставимости результатов, находится в диапазоне 0,20-0,26 м/с. Такая скорость встречного потока является достаточной для формирования утомления у животных, и, как правило, не вызывает у них поведенческих срывов в начале исследования.

Гидроканал из прозрачного пластика прямоугольной и равнобокой трапецевидной формы в поперечном сечении длиной 200 см, оснащается с торцевых сторон водозборниками, обеспечивающими ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощностью прокачки, теплообменниками для нагрева или охлаждения прокачиваемой жидкости. После включения циркулярного насоса система стабилизируется на скорости квазиламинарного потока воды не ниже 5 м/мин и температуре воды +24°C.

Принципиальная схема гидроканала представлена на рисунке 1.

«Правильное» направление движения в гидроканале у животных вырабатывается в ходе предварительного обучения с использованием в конце маршрута домика-приманки, имитация домика-норки типа «скворечник», который по ходу обучения можно отодвигать дальше к торцу гидроканала. Обучение животных осуществляется на протяжении 3 дней.

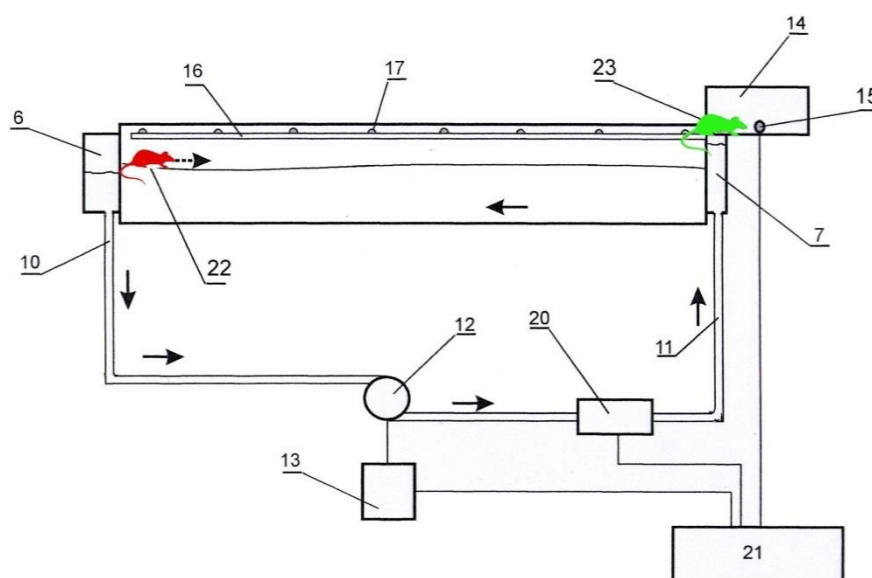


Рисунок 1 – Принципиальная схема кинезогидродинамической модели. Обозначения: 1 – чаша; 2, 3, 4, 5 – торцевые и боковые стенки чаши, соответственно; 6 и 7 – сообщающиеся с атмосферой водосборники; 8 и 9 – входные и сливные отверстия, соответственно; 10 и 11 – трубопроводы; 12 – циркуляционный насос; 13 – регулятор скорости вращения; 14 – домик-приманка; 15 – емкостной датчик отключения системы прокачки; 16 – калибровочная шкала; 17 – датчики перемещения; 18 – видеокамера сопровождения; 19 – датчик температуры; 20 – узел подогрева или охлаждения прокачиваемой жидкости; 21 – компьютер, 22 – стартовая позиция животного; 23 – финишная позиция животного.

Устройство для проведения кинезогидродинамического исследования работоспособности животных представлено на рисунке 2.



Рисунок 2 – Устройство для кинезогидродинамического моделирования.

Установленные на борту гидроканала градуированная шкала, датчики перемещения животного, видеокамера сопровождения обеспечивают корректную регистрацию кинезодинамики, скорость перемещения и длительность плавания животного. Компьютерная обработка результатов исследования позволяет

сопоставлять режимы нагрузок, этапы энергопродукции, признаки утомления животных, что позволяет получать информацию для всестороннего анализа влияния изучаемых фармакологических средств на физическую работоспособность животных.

Перед началом тестовых заплывов животных определяется скорость встречного потока воды, для чего в зоне финиша в воду погружается выполненный из дерева габаритно-весовой макет крысы, и фиксируется время, за которое поток вводы перенесет его к стартовой зоне.

В протоколе исследования фиксируются: дата, время, температура воды, скорость ламинарного потока, № животного, продолжительность каждого выполненного заплыва.

Первичная информация о кинезогидродинамическом исследовании работоспособности животных отражается в виде эргограммы (зависимость времени проплыва мерного участка от номера проплыва), характеризующего особенности формирования утомления, работоспособности и ее срывов (рисунок 3). В протоколе построения эргограммы время не выполненных животными заплывов принимается за 60 секунд.

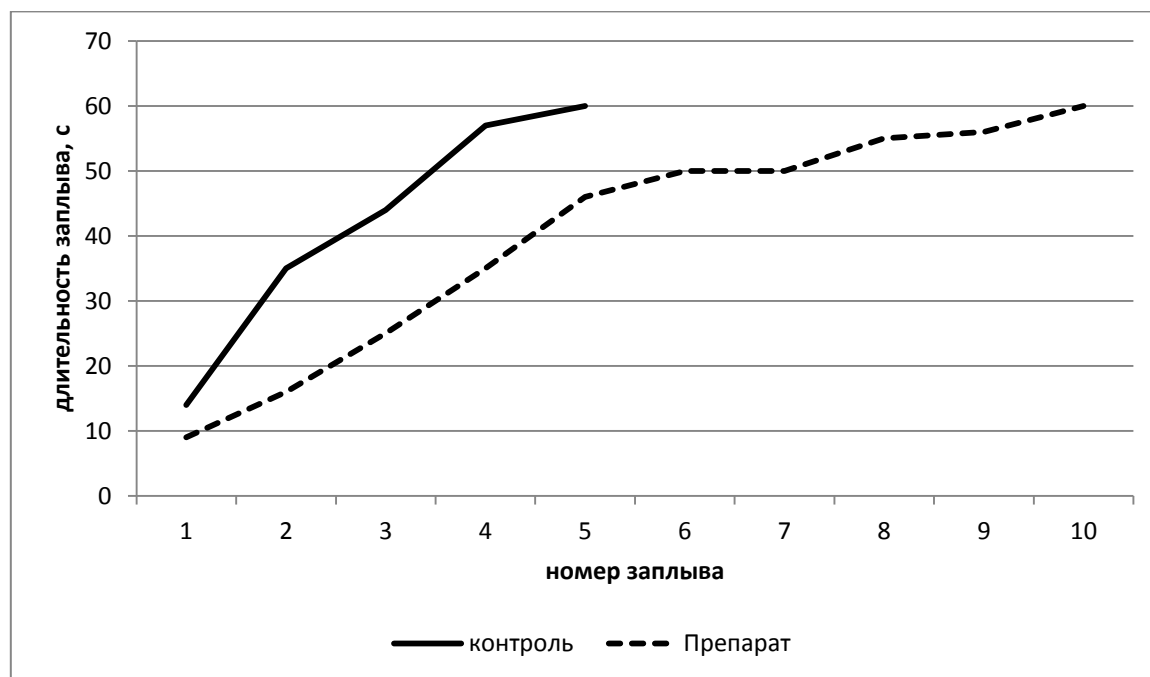


Рисунок 3 – Ориентировочный вид кривых эргограмм при кинезогидродинамическом исследовании.

Представленные на рисунке 3 эргограммы выявляют позитивное влияние исследуемого препарата на скоростные характеристики плавания («понижение» эргограммы в начальных заплывах) и выносливость (растяжение эргограммы вправо, в область большего количества заплывов) животных.

Расчетными показателями модели являются:

- максимальная скорость плавания (V_{max});

$$V_{max} = V_p + L/T_{min},$$

где V_p – скорость потока; L – длина мерного участка (1, 2 м); T_{min} – минимальное время проплыва мерного участка;

- выносливость (A) – количество выполненных заплывов;
- работоспособность (R) – суммарное преодоленное расстояние

$$R = L * A + V_p * T_{sum},$$

где L – длина мерного участка (1,2 м); A – количество выполненных заплывов; V_p – скорость потока; T_{sum} – суммарное время плавания по всем заплывам;

- утомляемость (U) – тангенс угла наклона эргографической кривой (определяется как угловой коэффициент линейной регрессии зависимости продолжительности заплывов от их количества).

Основные статистические параметры массива данных исследований в контрольной группе животных представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Основные статистические характеристики массива животных контрольной группы

Статистический показатель	Скорость макс, м/мин	Скорость ср., м/мин	Выносливость, ед	Дистанция, м	Утомляемость, ед
Среднее	21,56	20,10	2,54	10,03	30,09
Стандартная ошибка	0,21	0,17	0,09	0,35	1,19
Медиана	20,93	19,84	2,00	10,00	30,00
Мода	19,58	19,99	2,00	11,23	30,00
Стандартное отклонение	2,82	2,25	1,23	4,72	15,91
Экссесс	0,06	0,01	0,75	-0,42	-0,23
Асимметричность	0,70	0,51	0,93	0,44	1,03
Минимум	16,37	16,19	1,00	2,56	10,00
Максимум	29,58	27,84	6,00	22,39	60,00
КВ	0,13	0,11	0,48	0,47	0,53

Анализ таблицы 4 показывает, что скоростные характеристики животных являются достаточно стабильными (их коэффициент вариации около 0,1), остальные показатели кинезогидродинамического исследования являются достаточно вариативными.

Особенности распределения этих показателей представлены на рисунках 4-7.

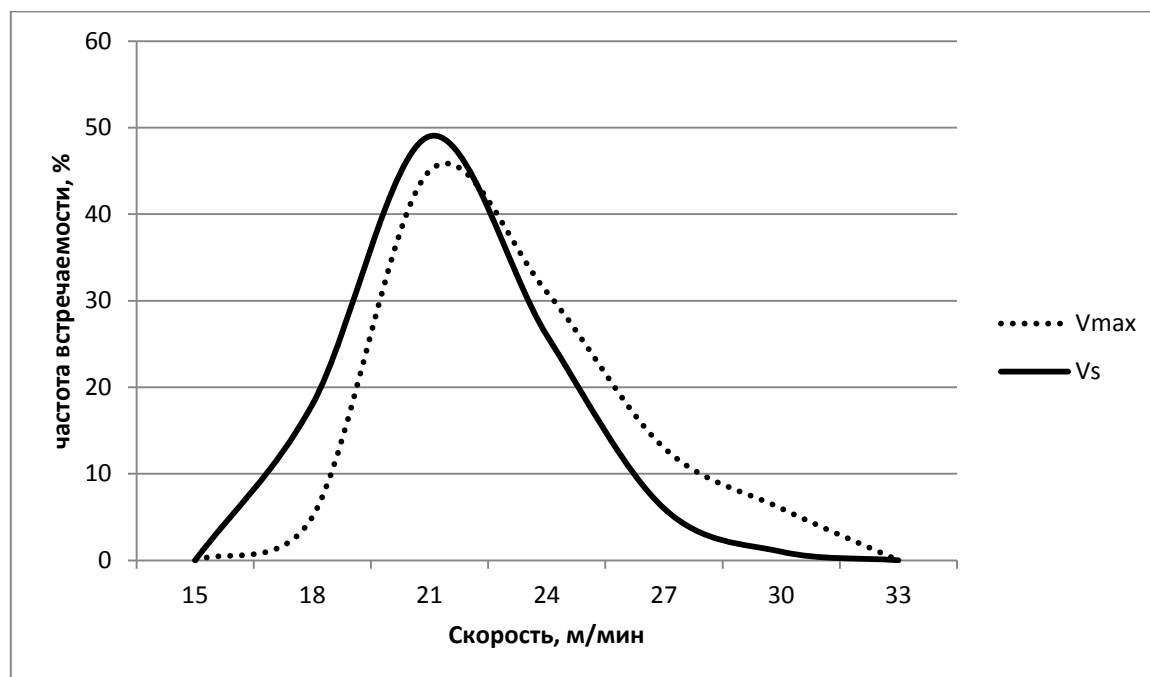


Рисунок 4 – Частотные кривые распределения скоростных характеристик животных (V_{max} – максимальная скорость плавания, V_s – средняя скорость плавания).

Анализ кривых на рисунке 4 показывает, что они достаточно полно соответствуют нормальному распределению, и, следовательно, могут статистически корректно интерпретироваться как скоростные характеристики животных. Анализ точек перегибов показывает, что животные, у которых скорость плавания составляет менее 18 м/мин, могут быть отнесены к группе с низкими скоростными качествами, при значениях от 18 до 24 м/мин – со средними скоростными качествами, и при скорости плавания более 24 м/мин – с высокими скоростными качествами.

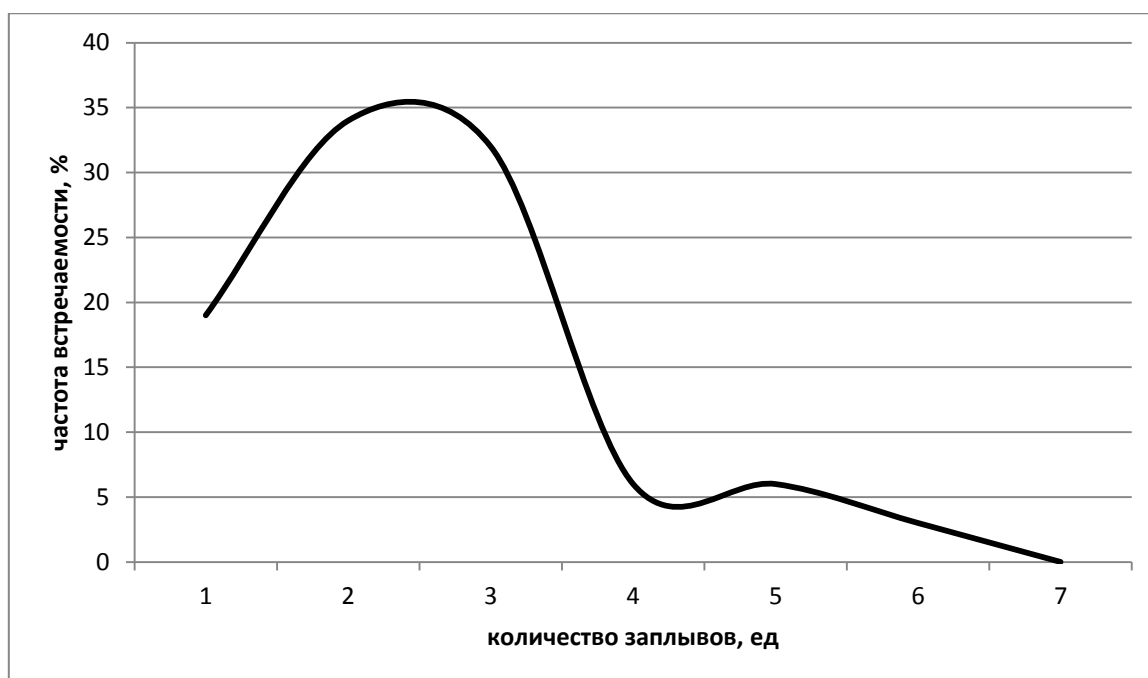


Рисунок 5 – Кривая частотного распределения показателя «выносливость».

Анализ рисунка 5 показывает, что показатель выносливости имеет статистическое распределение, существенно отличающееся от нормального. Следовательно, статистическая обработка полученных данных по этому показателю должна вестись непараметрическими методами.

Анализ точек перегибов кривой распределения позволяет в качестве границ выносливости определить следующие значения: при показателе равном 1 – низкая выносливость, при показателе 2 или 3 – средняя выносливость, при показателе 4 и более – высокая выносливость. В контрольной группе животных к подгруппе с низкой выносливостью относилось 20%, со средней выносливостью – 65%, с высокой выносливостью – 15% животных.

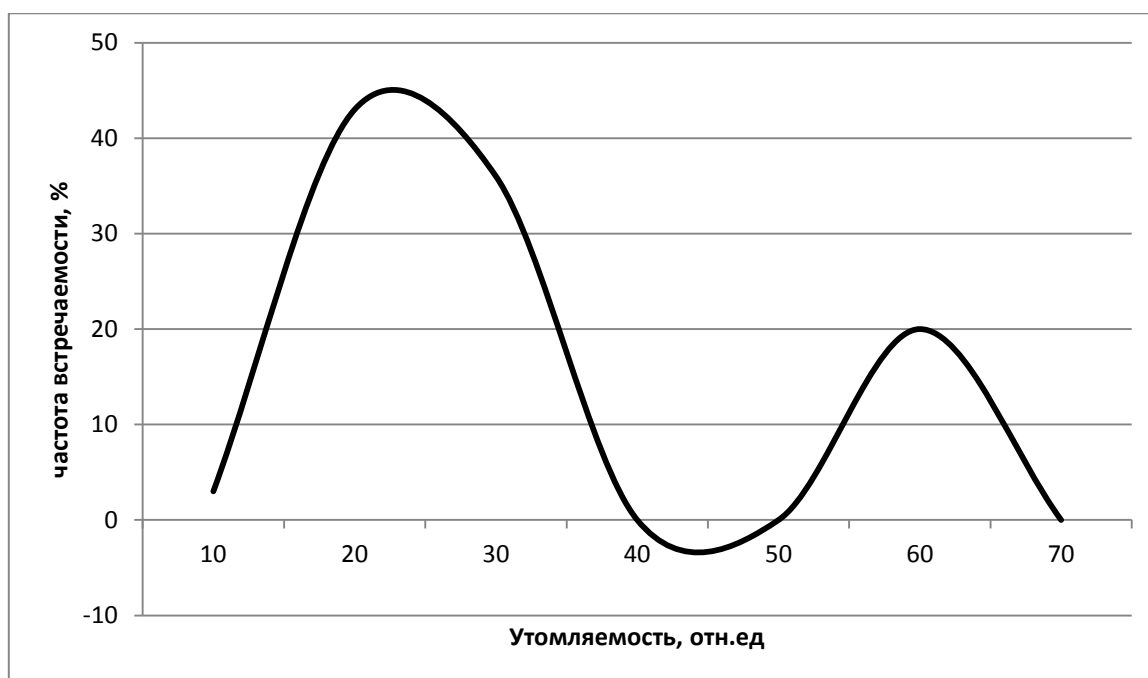


Рисунок 6 – Кривая распределения показателя «утомляемость» животных в кинезогидродинамическом исследовании.

Показатель утомляемости имеет характер распределения, далекий от нормального. Обращает на себя внимание, что в обследуемой группе животных можно выделить только две подгруппы – с высокой (55 и более) и низкой (30 и менее) утомляемостью при полном отсутствии животных со средними значениями этого показателя. Вероятно, с точки зрения интерпретации этого показателя важным будет только доля животных с высоким уровнем утомляемости (в контрольной группе – 20%). Изменение доли этой группы под влиянием исследуемого лекарственного средства и подлежит интерпретации как фармакологический эффект.



Рисунок 7 – Кривая частотного распределения встречаемости показателя «Работоспособность» (суммарная дистанция проплыва животных).

Анализ рисунка 7 показывает, что в распределении показателя «Работоспособность» отсутствует часть левой ветви кривой (в области минимальных значений), что делает ее не типичной для нормального статистического распределения. Тем не менее, анализ точек перегиба позволяет определить критические точки дифференциации животных по этому показателю. При значении суммарной дистанции проплыва менее 5 м животное будет отнесено к группе с низким уровнем работоспособности, при значениях в диапазоне от 5,1 до 15 м – со средним уровнем работоспособности, при значениях более 15 м – к группе с высоким уровнем работоспособности.

Так как для показателей выносливости, утомляемости и работоспособности животных из распределение отличается от нормального статистического, то для популяционного переноса полученных результатов необходима процедура Z- или T-нормирования (раздел 2.6).

Результаты частотного анализа времени отказа животных от выполнения нагрузки в фоновом исследовании и при активации ЦНС фармакологическими средствами представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Частоты встречаемости времени отказа животных от выполнения нагрузки (%)

Массив	Диапазоны времени отказа (с)				
	0 - 9	10 - 19	20 - 29	30 -39	40 и более
Фон + контроль	1	55	32	6	6
Умеренная активация НС	0	10	20	5	65
Выраженная активация НС	0	0	35	55	10

Также частотному анализу были подвержены данные по предельному количеству заплывов, после которого животное отказывалось от дальнейшего выполнения нагрузки (таблица 6).

Таблица 6 – Частоты встречаемости (%) количества заплывов, после которых животное отказывалось от дальнейшего выполнения нагрузки

Группа	Диапазоны количества заплывов					
	1 - 3	4 - 6	7 - 9	10 - 12	13 - 15	16 - 18
Фон + контроль	86	14				
Умеренная активация	0	35	55			
Выраженная активация	0	0	10	30	20	40

Результаты совместного анализа таблиц 5 и 6 представлены на рисунке 8.

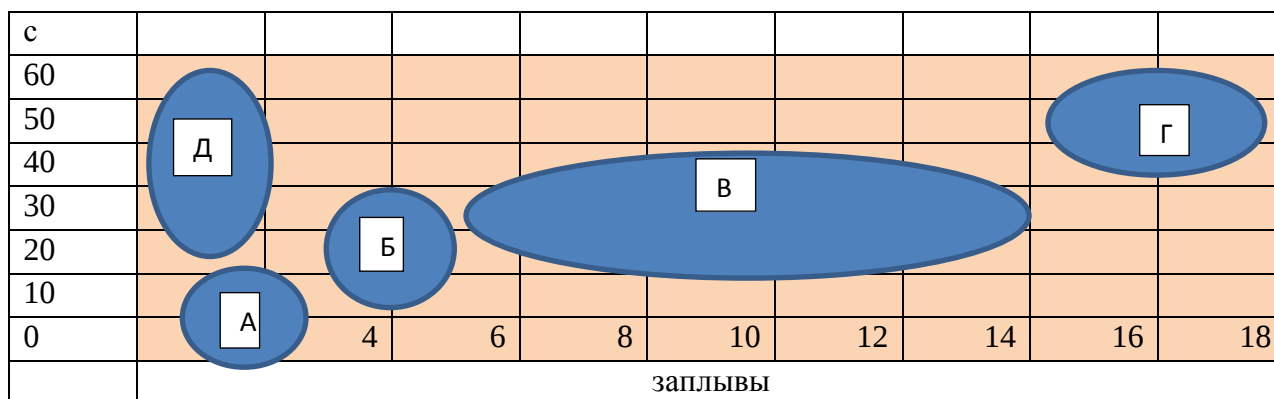


Рисунок 8 – Возможные причины отказа животных от выполнения нагрузок в кинезогидродинамическом исследовании. А – «истерический», эмоциональный отказ. Б – «истощение нервное». В – утомление. Г – переутомление, истощение общее. Д – функциональный дефицит (по [15]).

Зона А характеризуется высокой скоростью плавания животных, но с очень небольшим (1-2) количеством заплывов. Утомление за это время развиться не успевает, и отказ от дальнейших нагрузок носит эмоциональный, «истерический» характер.

Зона Б характеризуется небольшим объемом работы (3-5 заплывов), нарастанием продолжительности заплывов в 1,5-2 раза (до 30 секунд). Отказ при этом может быть связан с формированием коркового утомления, при сохранении метаболических резервов организма.

Зона В характеризуется развитием выраженного утомления (5-14 заплывов) и отчетливым динамичным снижением скорости плавания к концу исследования до 40-45 секунд. Отказ животного от дальнейшей нагрузки вызван выраженным утомлением.

Зона Г характеризуется максимально большим объемом выполненной работы (15 и более заплывов), причем последние заплывы осуществляются на пределе возможности животного (продолжительность заплывов более 45 сек). Такое состояние животного может отражать состояние переутомления, начальные проявления общего истощения организма, что и обуславливает отказ от дальнейшей физической работы.

Теоретически возможна еще одна ситуация (зона Д) – малое количество заплывов (1-2) при медленном плавании животных. Такое состояние может отражать неврологический (или метаболический) дефицит у животного, ограничивающий его возможности к выполнению нагрузок (например, после моделирования тканевой гипоксии, инфаркта миокарда, черепно-мозговых травм и т.д.).

Проведенный анализ показал, что без фармакологической поддержки в 85% случаев причиной отказа животных от продолжения нагрузки в кинезогидродинамической модели являются эмоциональные факторы, и только в 15% - утомление центрального генеза.

Применение препаратов с умеренной психоактивирующей активностью ведет к тому, что в 80% случаев причиной отказа животных от продолжения нагрузок является утомление, а в 20% случаев – утомление центрального генеза.

9.2. Метод «вынужденного» или «предельного» плавания

Исследование может выполняться как на лабораторных мышах, так и крысах.

Классическая методика теста Порсолта (вынужденного плавания) предназначена для оценки депрессивного поведения (в частности, «отчаяния»), однако она, в силу своей простоты, широко используется для оценки эффектов стимуляторов работоспособности в условиях стресса. Тест принудительного плавания представляет собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты [16, 29, 40].

9.2.1. Стандартная методика вынужденного плавания с грузом.

Для проведения теста лабораторным животным в области крестца к шкуре или к задним лапкам животного прикрепляется груз, пропорциональный весу животного. В зависимости от того, какой режим физических нагрузок (низкий, умеренный, средней интенсивности, высокой интенсивности) планируется к изучению, выбирается соответствующая масса груза (2,5-3% от массы тела – низкий уровень нагрузок большой длительности, 5% – умеренный уровень нагрузок средней длительности, 7,5% – средний уровень интенсивности нагрузок, 10% – высокий уровень нагрузок, выполнение которых возможно только короткое время). Тест предельного плавания с грузом 2,5-5% обычно используется для оценки аэробного компонента работы животных, 7,5%-10% – для изучения смешанной (аэробно-анаэробной) физической работоспособности, 13-15% – для оценки анаэробного компонента физической работоспособности. Груз 10% от массы тела обычно используется также при тестировании препаратов в интересах спорта высших достижений.

Метод применяется в двух модификациях, отличающихся критерием прекращения исследования. В тесте предельного плавания таким критерием является гибель животного (пребывание на дне бассейна без плавательных движений 1 минуту, появление пузырьков вытесняемого из легких воздуха), в тесте вынужденного плавания – не способность животного к активным плавательным действиям (погружение на дно бассейна без плавательных движений на 30 секунд, появление ротационных движений или агональных судорог туловища). В этот момент животное быстро извлекается из воды и обсушивается сухим полотенцем. Тест вынужденного плавания обычно используется для предварительной оценки

работоспособности животных, а также для динамических исследований, предполагающих повторное тестирование работоспособности лабораторных животных.

Кроме величины груза, на время предельного плавания животных существенно влияет температура воды. Ее различные диапазоны могут использоваться для тестирования работоспособности в условиях низких температур (диапазон температуры воды 11-14°C) или в условиях гипертермии (диапазон температур 32-38°C). Для оценки физической работоспособности без учета специфического влияния температурного фактора используется вода термонеutralного для лабораторных животных диапазона (22-27°C).

Вода в бассейн для плавания животных заливается заблаговременно, не менее чем за 4 часа до исследования, тонкой струйкой по стенке для избегания дополнительной ее газации. За период отстоя из воды происходит высвобождение растворенного в ней воздуха, что исключает в последствии его сорбцию на мехе животного и влияния на его плавучесть. Температура воды определяется термометром за 30 минут до начала исследования, и при необходимости доводится до среднего значения нужного температурного диапазона. Высота уровня воды в бассейне должна быть не меньше 35-40 см для лабораторных мышей, 75-90 см – для крыс. Расстояние от кромки бассейна до уровня воды должен быть не меньше 10 см для мышей, 20 см для крыс, во избежание выпрыгивания животного из бассейна.

Исследование должно проводиться в стандартных условиях (утренние часы, обычный уровень освещения). Животные накануне исследования на ночь оставляются без корма при свободном доступе к воде.

Предварительно животные проходят ознакомление с выполнением теста (минимум трехкратно, с интервалом в 2-3 дня, в режиме вынужденного плавания, продолжительность плавания составляет 50-60% от ориентировочного времени плавания животных с заданным грузом (таблица 7).

Таблица 7 – Ориентировочное время вынужденного плавания крыс в воде термонеutralной температуры с разными грузами

Груз, % от массы тела	Ориентировочное время плавания	
	мыши	крысы
2,5	30-45 минут	60-90 минут
5	10-15 минут	20-30 минут
7,5	3-6 минут	8-10 минут
10	60-90 секунд	2-5 минуты
12,5	20-30 секунд	20-40 секунд

Лабораторным животным после взвешивания зондом перорально или инъекционно внутрибрюшинно вводится расчетная доза раствора исследуемого препарата. За 15-20 минут до начала тестирования работоспособности (для сглаживания возможной стресс-реакции) к животному фиксируется подобранный груз. При начале исследования животное без резких движений погружается в воду бассейна, секундомер включается при первых плавательных движениях животного (рисунок 9).

Животные, при предварительном тестировании физической работоспособности которых полученные результаты более чем на 35% отклоняются от средних значений, при рандомизации исключаются из исследования.

Анализируемым показателем, отражающим физическую работоспособность лабораторных животных, является время предельного плавания животных.

Используемая экспериментальная модель является по своей природе экстремальной. Воздействующий экстремальный фактор является внешним для экспериментальной модели, в силу чего полученные в ней данные могут не соответствовать характеристикам нормального частотного распределения для случайных величин.



Рисунок 9 – Тест вынужденного плавания.

Отклонение кривой распределения параметра «время предельного плавания лабораторных животных» (рисунок 10) от типичной кривой нормального распределения вносит существенные изменения в обычно применяемую схему статистической обработки экспериментальных данных, так как проведение оценки достоверности различий по средним величинам (t-критерий), корреляционного и регрессионного анализов допустимо только для массивов с нормальным частотным распределением параметров.

Кроме того, не корректной будет и экстраполяция полученных результатов на генеральную совокупность объектов (то есть перенос результатов на другие исследования, их прямые сопоставления). С этой целью полученные экспериментальные массивы должны быть трансформированы в нормализованные оценки (стены, Z-оценки или T-оценки, раздел 2.6), которые едины для всей генеральной совокупности объектов.

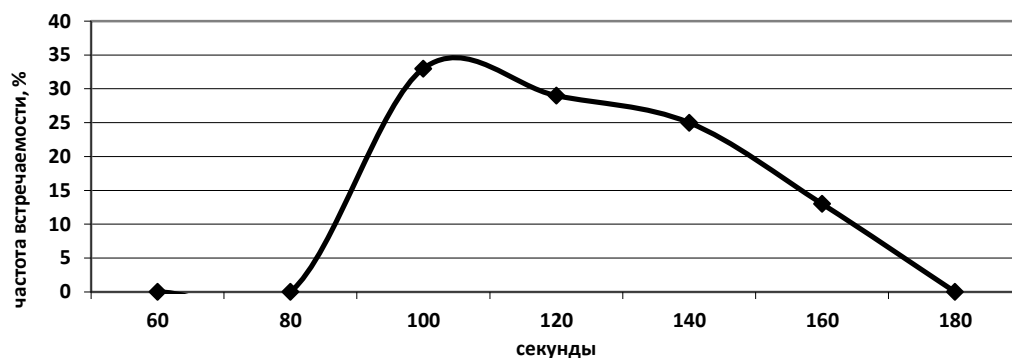


Рисунок 10 – Частотная кривая распределения значений времени вынужденного плавания животных с грузом 10% от массы тела.

Для перевода времени предельного плавания животных (минуты) в стеновые оценки может быть предложена следующая шкала:

Таблица 8 – Таблица перевода времени предельного плавания животных с грузом в условиях в стены

Груз (% от массы тела)	Нормированные баллы (стены)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	70 с и менее	71-80 с	81-85 с	86-90 с	91- 110 с	111 – 120 с	121 – 130 с	131 – 145 с	146 - 169 с	170 с и более
7,5	2 мин и менее	3 мин	4 мин	5-7 мин	7-9 мин	9-11 мин	11-14 мин	14-17 мин	17-19 мин	20 и более мин
5%	5 мин и менее	6-9 мин	10–15 мин	16-20 мин	20-25 мин	26-30 мин	34-35 мин	36-45 мин	46-59 мин	60 мин и более

Для интерпретации стеновых оценок исследований значимым является изменение более чем на 1 стен (увеличение значений стеновой оценки однозначно интерпретируется как сдвиг в лучшую сторону, а уменьшение – в худшую).

Характер частотной кривой распределения значений показателя времени плавания животных с грузом отражает его зависимость от нескольких факторов. В специально проведенном исследовании [15] было показано, что одним из таких факторов является уровень активации нервной системы, а вторым фактором может стать такая врожденная биологическая характеристика животных, как выносливость. Для проверки этой гипотезы был выполнен двухфакторный дисперсионный анализ показателя времени плавания с грузом, где в качестве

контролируемых факторов выступали уровень активации нервной системы и показатель выносливости. Его результаты отражены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показателя времени плавания с грузом

Фактор	Уровень влияния на дисперсию (D)	Уровень значимости (p)
А (выносливость)	0,17	0,04
В (активность нервной системы)	0,25	0,008
А*В (взаимодействие факторов)	0,04	0,74
Контролируемые факторы суммарно	0,435	0,039
Неконтролируемые факторы	0,565	

Таким образом, дисперсию показателя времени вынужденного плавания животных с грузом на 25% определяет уровень выносливости животных, на 17% - уровень активности их нервной системы, еще 4% дает вклад взаимодействия этих факторов. Не контролируемые же факторы определяют более половины всей дисперсии этого показателя в контрольной группе. Полученные результаты показывают, что однозначно интерпретировать показатель времени вынужденного плавания животных с грузом как показатель работоспособности лабораторных животных не всегда представляется корректным.

Метод вынужденного плавания лабораторных животных может также использоваться в следующих модификациях: трехнагрузочная плавательная проба и проба с повторно выполняемой плавательной нагрузкой до отказа.

9.2.2. Трехнагрузочная плавательная проба.

Данная модификация плавательной пробы с грузом 10% используется для оценки влияния лекарственных средств на первую фазу процессов восстановления (первый час).

Особенностью выполнения пробы является то, что после завершения описанной в разделе 4.2 плавательной пробы (нагрузка 1) и извлечения, после отказа от дальнейшего выполнения нагрузки, из бассейна, животное обтирается от воды сухим теплым полотенцем и строго через 5 минут после извлечения из воды повторно погружается в бассейн для выполнения плавательной пробы (нагрузка 2). Строго через 45 минут отдыха после нагрузки 2 животное вновь подвергается плавательной нагрузочной пробе (нагрузка 3).

Анализируемым показателем является индекс пробы (ИП), равный отношению времени выполнения нагрузки 3 к первой нагрузке. Диапазон вариабельности значений показателя – от 0 до 1,0. Чем выше ИП, тем лучше протекают процессы первой фазы восстановления у животных.

Сложности интерпретации показателя могут быть связаны с низкими значениями продолжительности нагрузки, когда животное прекратило выполнение теста (нагрузки 1 и 2) не из-за утомления, а по каким-либо эмоционально-поведенческим причинам. В этом случае высокие значения ИП будут свидетельствовать о несформированности процессов утомления. Об особенностях формирования утомления можно судить по величине суммы времени плавания в первом и втором заплывах. В норме величина этого показателя находится в диапазоне от 140 до 380 с. Анализ точек перегибов в частотной кривой распределения этого показателя позволил выделить диапазон низких значений этого показателя – менее 180 секунд. Животные с такими значениями занимают 10% от выборки, и подлежат исключению из дальнейшего анализа.

В контрольной группе животных значения ИП находились в диапазоне от 0,3 до 1,0 при среднем значении $0,65 \pm 0,04$ и коэффициенте вариации 0,27. Частотная кривая распределения этого показателя представлена на рисунке 11.

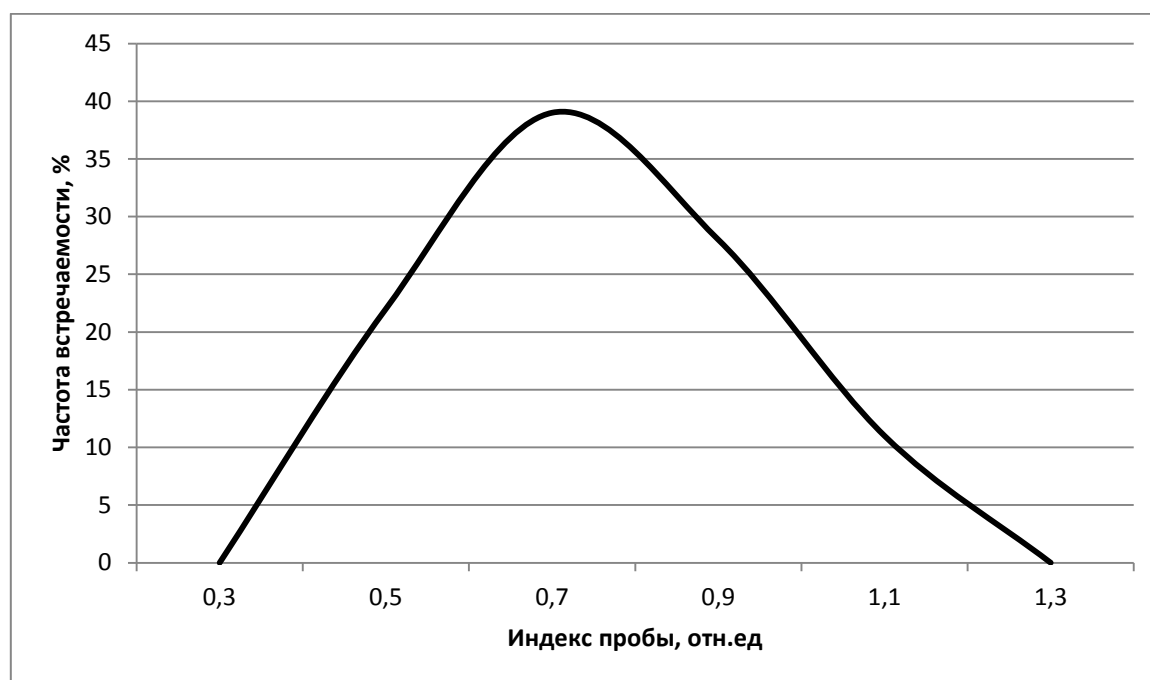


Рисунок 11 – Частотная кривая распределения значений ИП.

Анализ рисунка 11 показывает, что показатель ИП, характеризующий активность процессов первой фазы восстановления (первый час для человека, 45 минут для крыс), может быть статистически корректно интерпретирован и использован для оценки способности организма животных к восстановлению. Анализ точек перегибов на частотной кривой показывает, что животные с ИП менее 0,5 характеризуются низкой способностью к восстановлению (их в популяции 22%), при ИП в диапазоне от 0,51 до 0,8 – средней способностью к восстановлению (их в популяции 56%), при ИП более 0,8 – высокой способностью к восстановлению (их в популяции 22%).

Если исследуемый лекарственный препарат оказывает позитивное влияние на процессы первой фазы восстановления, то он должен не только вызывать статистически достоверный сдвиг среднегруппового значения ИП по сравнению с контролем, но и менять структуру встречаемости животных с низкой, средней и высокой способностью к эффективному восстановлению. Статистический анализ достоверности выявленных структурных сдвигов должен быть проверен непараметрическими методами (например, методом точной вероятности Фишера).

9.2.3. Проба с множественным повторным предъявлением плавательной нагрузки.

Данная проба является логическим продолжением трехнагрузочной пробы, но служит не для оценки восстановления, а выносливости животных. В качестве предельно переносимой нагрузки выступает тест вынужденного плавания с грузом 10% от массы тела. Он последовательно выполняется животными несколько раз строго с 5-минутным интервалом между попытками. Процедура тестирования продолжается до тех пор, пока время крайнего заплыва не попадет в диапазон 20-30 секунд, после чего тестирование прекращается.

В протоколе исследования указывается дата исследования, номер животного, масса тела животного, масса груза, время начала первого тестирования и его продолжительность, время начала второго тестирования (строго через 5 минут после завершения первого) и его продолжительность, время начала и продолжительность третьего, четвертого, пятого, шестого тестирования и т.д.

В обычных условиях (без фармакологической коррекции) нелинейные крысы способны выполнить от 3 до 6 последовательно предъявляемых нагрузок. Анализ результатов исследования, выполненных в контрольной группе животных, позволил определить следующие статистически корректно интерпретируемые показатели: выносливость (ПВ – показатель выносливости = количество выполненных нагрузок) и коэффициент утомляемости ($KY=1-T3/T1$, где $T3$ – длительность выполнения третьей нагрузки, $T1$ – длительность выполнения первой нагрузки). Эти показатели имели статистическое распределение, близкое к нормальному (рисунок 12), что позволяет корректно сопоставлять полученные результаты и осуществлять их популяционный перенос.

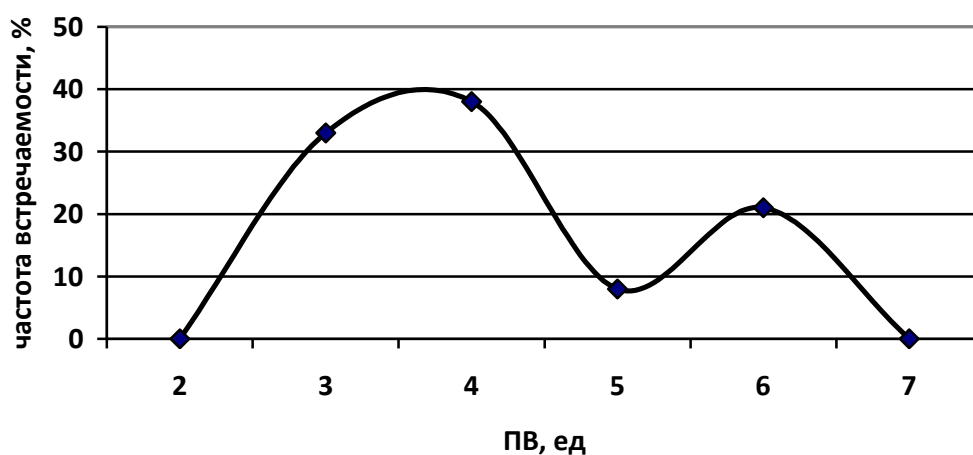


Рисунок 12 – Частотная кривая распределения значений показателя выносливости (ПВ) в контрольной группе.

Анализ рисунка 12 показывает, что он фактически состоит из наложения двух кривых, каждая из которых близка к кривой нормального распределения. Кривая А характеризует животных со средним уровнем выносливости по этой модели, а кривая Б – с высоким уровнем выносливости. Границей между уровнями выносливости является 5 предъявление нагрузки. Если животное способно к ней, то оно относится к высоковыносливой субпопуляции, если нет – то средневыносливой. Обращает на себя внимание отсутствие животных с низким уровнем выносливости (способных выполнить только 1-2 заплыва). Возможно, такая картина распределения животных контрольной группы по уровням выносливости отражает особенности использованных в работе нелинейных крыс.

В контрольной группе животных значения коэффициента утомляемости находились в диапазоне от 0,48 до 0,83, при среднем значении $0,69 \pm 0,02$. Частотная кривая распределения этой величины представлена на рисунке 13.

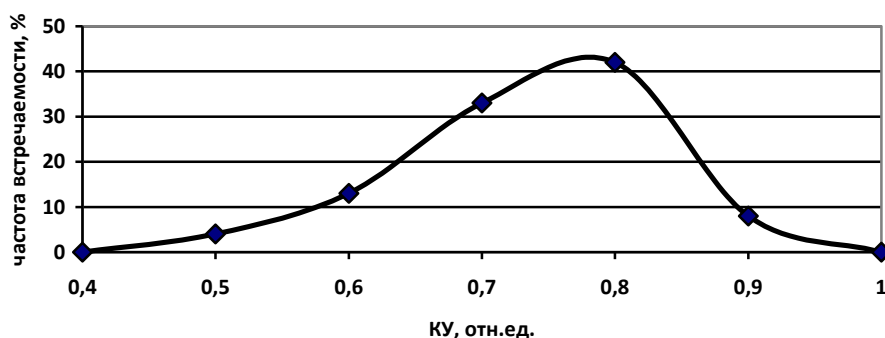


Рисунок 13 – Кривая частотного распределения коэффициента утомляемости у животных контрольной группы.

Анализ рисунка 13 и статистических параметров, характеризующих этот показатель, свидетельствует о том, что КУ имеет характеристики, близкие к нормальному статистическому распределению (среднее значение близко к медиане распределения, индексы эксцесса ($= -0,09$) и асимметрии ($= -0,45$), а коэффициент вариации, равный 0,06 свидетельствует о стабильности этого показателя. Анализ точек перегибов частотной кривой позволяет выявить границы диапазонов высокой, низкой и средней утомляемости. При КУ менее 0,6 животные могут быть отнесены к группе с низкой утомляемостью (высокой работоспособностью), в диапазоне от 0,61 до 0,8 – средней утомляемостью, более 0,8 – с высокой утомляемостью (низкой работоспособностью). В контрольной группе отмечается несколько меньшее, чем должно быть при нормальном статистическом распределении, количество животных с высокой утомляемостью, что отражается в более низких значениях «правого крыла» кривой распределения. Этот результат также может быть связан с наличием субпопуляции высоковыносливых животных.

9.3. Метод челночного плавания

Метод используется для скрининговой оценки лекарственных средств, предположительно оказывающих влияние на процессы утомления и уровень выносливости животных. Тестируемый объект – нелинейные белые мыши-самцы массой 18-20 г.

Установка для проведения теста челночного плавания представляет собой металлический короб квадратного сечения, глубиной не менее 50 см и длиной не менее 180 см (рисунок 14).

Предварительно обученные мыши совершают в челночном варианте не менее 18 непрерывных заплывов на фиксированное расстояние 150 см, по времени которых и рассчитывают скорость развития утомления. Критическое время проплыва дистанции 1,5 метра для мышей, после которого животное считается утомленным, в данной модели принимается за 60 секунд.



Рисунок 14 – Выполнение методики челночного плавания.

Существуют модификации метода [16], в котором используется утяжеление, равное 2,5% от массы тела (при большем значении утяжеления животные не способны осуществлять челночные заплывы на такое расстояние)

В протоколе исследования фиксируют дату исследования, температуру воды, мерный участок бассейна (в стандартной методике – 150 см), если используется утяжеление – то отмечается его уровень, номер и массу животного, номер заплыва и его продолжительность. Для построения эргометрической кривой в протоколе время не выполненных животными заплывов принимается за 60 секунд. По результатам выполнения теста строится эргометрическая кривая, отражающая продолжительность заплывов по их номерам (рисунок 15).

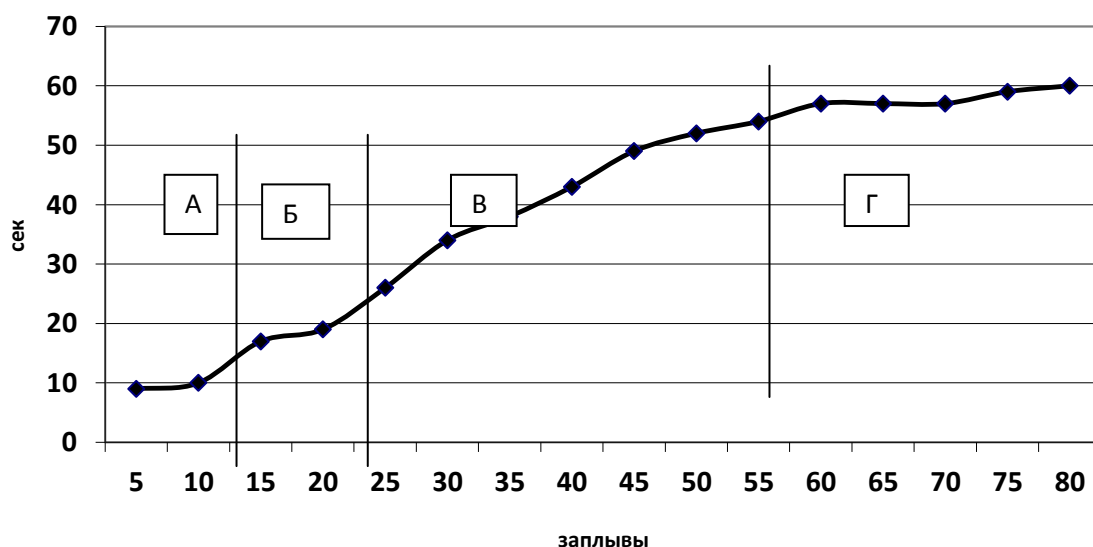


Рисунок 15 – Динамика средней длительности заплыва лабораторных животных при челночном плавании.

Анализ кривой длительности заплывов при челночном плавании позволяет выявить 4 области, различающиеся между собой. В зоне А (заплывы 1-10) отмечается устойчивая высокая скорость плавания животных, утомление животных не проявляется. У некоторой части животных отмечается период вработывания (незначительное увеличение скорости плавания к 3-4 заплыву) с последующим удержанием этой скорости до конца зоны А. Зона Б (11-20 заплывы) характеризуется начальными признаками формирующегося утомления, при котором скорость плавания животных поддерживается на достаточно хорошем уровне (увеличение времени заплыва примерно в 2 раза). Зона В (заплывы 21-55) характеризуется нарастающим утомлением, в ходе которого сначала у менее выносливых животных, а затем и животных со средним уровнем выносливости, начинает формироваться срыв работоспособности. Характер срыва работоспособности у разных животных отличается. У части животных он идет по типу равномерного нарастания утомления, у некоторых – по типу срыва работоспособности, с резким нарастанием времени заплывов. Вероятно, различия в характере срыва работоспособности могут быть связаны с разным уровнем функциональных резервов животных и разной индивидуальной стратегией их использования. Зона Г (заплывы 56-80) характеризуется выраженным утомлением и

срывом работоспособности животных. Только единичные, особо выносливые животные еще сохраняют в этом диапазоне работоспособность на уровне, близком к 20% от исходной.

Таким образом, модель челночного плавания животных позволяет выявить и количественно оценить собственно **работоспособность** (средняя скорость плавания в зоне А, удержание работоспособности на высоком уровне – длительность фазы Б), **выносливость** (суммарная продолжительность (мин) и длительность (м) плавания до срыва работоспособности), а также **утомляемость** (отношение длительности предельного заплыва к их количеству; или **скорость развития утомления** в соответствии с подходом Кипплинджера [46] (коэффициент наклона линии регрессии длительности заплыва к их количеству).

На рисунке 16 представлены регрессионные кривые, характеризующие результаты выполнения методики челночного плавания с серии исследований с применением нескольких фармакологических средств.

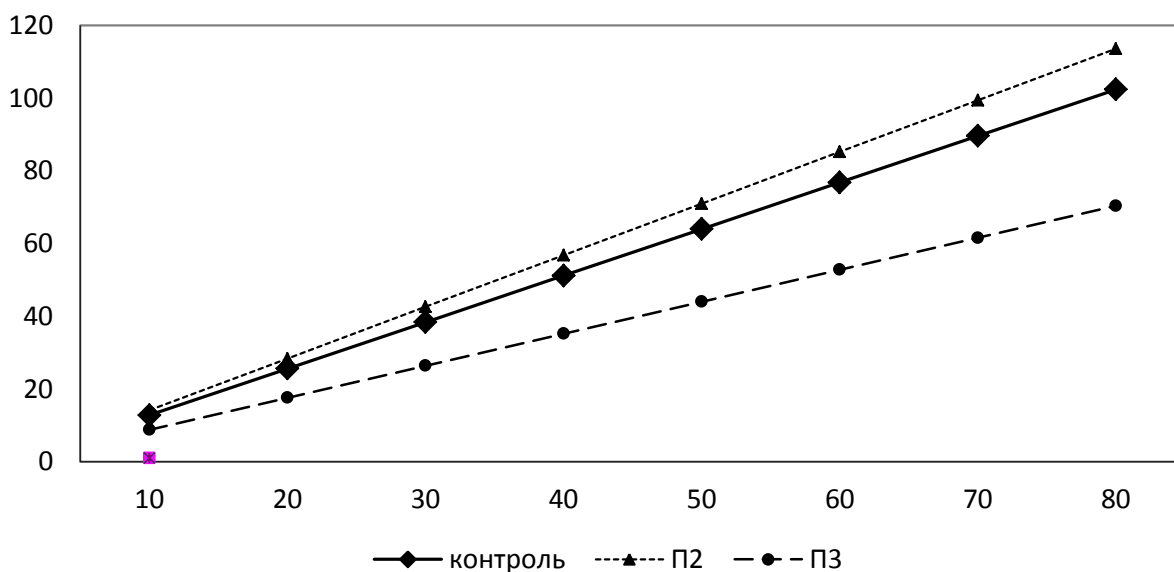


Рисунок 16 – Графики линейных регрессионных функций формирования утомления в тесте челночного плавания с дополнительным утяжелением, равным 2,5% от массы тела (П2 и ПЗ – анализируемые препараты, препарат П2 не проявил влияния на процессы утомления).

Для групповой характеристики скорости развития утомления линейную регрессионную модель целесообразно строить по усредненным значениям длительности заплывов. Остальные показатели модели рассчитываются по

индивидуальным данным с последующим усреднением и определением стандартного отклонения средних значений.

По результатам выполнения методики можно условно распределить животных по диапазонам выносливости. Границей диапазона высокой выносливости, в соответствии с принципами S-образного шкалирования, будет уровень последних 16-20% животных по кривой частотного анализа. В нашем случае такой границей выносливости будет 51 заплыв, при преодолении которого животное может быть отнесено к группе высоко выносливых. В контрольной группе к высоко выносливым животным можно было отнести 20% мышей.

Описанная модель челночного плавания достаточно полно характеризует работоспособность, выносливость и скорость развития утомления у лабораторных животных в обычных условиях. Однако в практике спорта высших достижений, а также медицине экстремальных состояний, нередко ситуации, когда интенсивность физических нагрузок существенно выше, чем при выполнении даже интенсивной работы в обычных условиях, или же на организм воздействует какой-либо дополнительный неблагоприятный фактор (нагрузки в условиях гипоксии, при выраженном предшествующем утомлении, наличии острого или обострении хронического заболевания сердечно-сосудистой или дыхательной систем). В этих ситуациях для большей адекватности необходимо ввести в экспериментальную модель утомления фактор дополнительной нагрузки. В отношении модели челночного плавания таким фактором дополнительной нагрузки может быть дополнительное утяжеление животного (прикрепленный груз, равный 2,5% от массы животного).

График динамики челночного плавания животных с утяжелением представлен на рисунке 17. Сопоставление основных характеристик методики челночного плавания с дополнительным грузом и без него представлено в таблице 10.

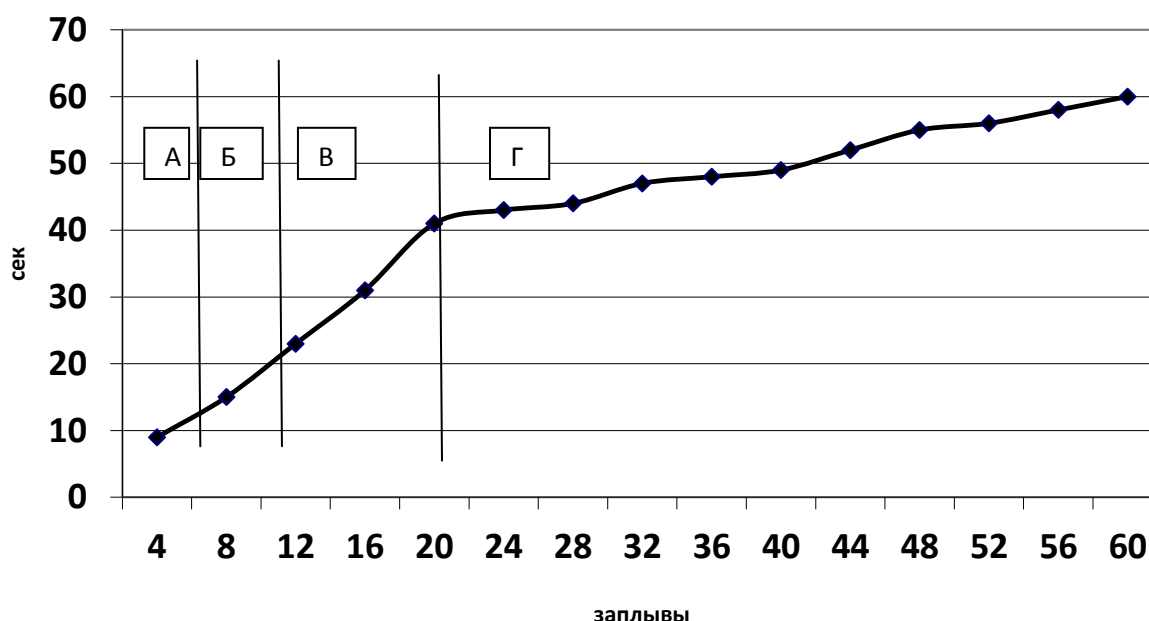


Рисунок 17 – Динамика времени заплывов лабораторных животных при челночном плавании с утяжелением 2,5% от массы тела.

Сопоставление рисунков 16 и 17 показывает, что начальная скорость плавания животных в обоих моделях совпадает, но сама зона А с 10 заплывов сокращается до 4-5, а зона Б (удержания работоспособности на высоком уровне) сокращается с 20 заплывов до 8-10. Зона нарастающего утомления (зона В) характеризуется более быстрым формированием утомления (в среднем 120-20 заплывов, а не 20-55, как в плавании без утяжеления). Зона срыва работоспособности (зона Г, граница – точка перегиба на графике) начинается при меньшей степени утомления (25-28% от исходной скорости плавания, в модели без утяжеления – при 18-20% от исходной скорости плавания) и при существенно более низком количестве заплывов (21-60 заплывов до полного срыва работоспособности, по сравнению с 55-80 заплывами в модели без утяжеления).

Частотные распределения моментов полного срыва работоспособности (длительность заплыва 60 секунд и более) у лабораторных животных в моделях челночного плавания с утяжелением и без него представлены на рисунке 18. Если в модели без утяжеления распределение имеет близкий к нормальному характер со средним значением в области 38 заплывов, то модель с утяжелением имеет характер распределения, существенно отличающийся от нормального. Область максимума

распределения смещена в левую часть (среднее значение соответствует 27 заплыву), без начальной зоны малой частоты встречаемости, что является признаком экстремальности воздействия. В то же время, исходя из особенностей частотной кривой в области высоких значений количества заплывов, можно определить границу диапазона высокой выносливости животных – сохранение работоспособности более 45 заплывов в модели с дополнительным утяжелением и 50 заплывов в модели без утяжеления. Доля высоко выносливых животных в контрольной группе по обеим моделям составляет 20%.

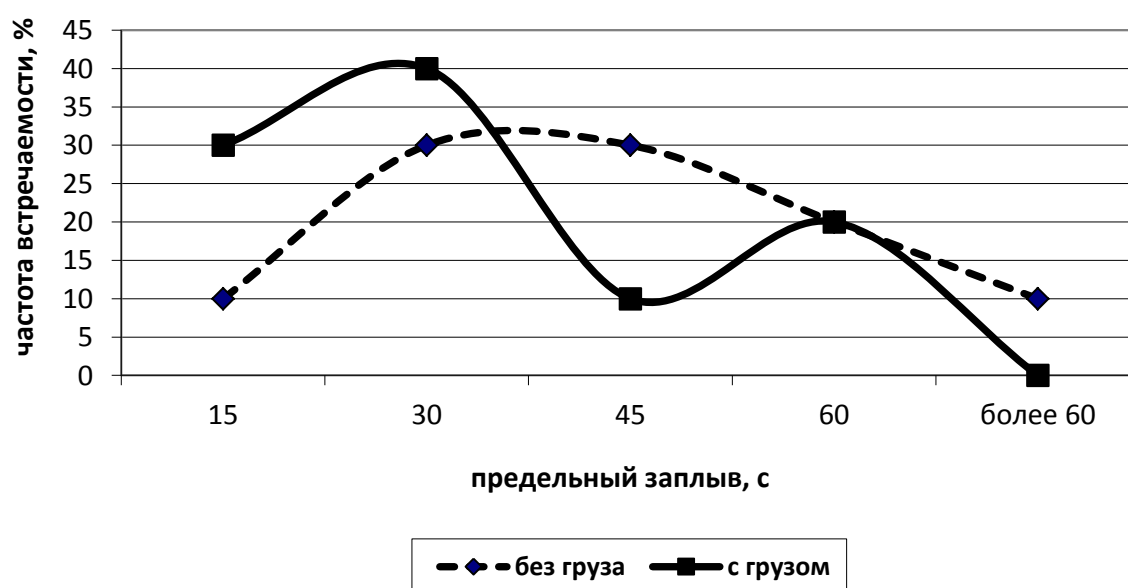


Рисунок 18 – Частотное распределение срывов работоспособности в моделях челночного плавания.

Таблица 10 – Среднегрупповые характеристики моделей челночного плавания (средние по группе, $M \pm m$)

Показатель		Модели плавания	
Обозначение	Наименование	Без груза	Груз 2,5%
V1	Скорость плавания, стартовая фаза, м/мин	10,9±1,0	10,7±2,5
T1	Время удержания высокой работоспособности, с	240±120	158±126
Lmax	Суммарная дистанция плавания до отказа, м	57±27	41±25
Tmax	Суммарное время плавания до отказа, мин	11,1±7,1	8,2±4,5
K1	Утомляемость, ед.	2,0±1,2	2,9±1,4
K2	Скорость развития утомления (коэффициент линейной регрессии, ед)	1,06	1,28
K3	Доля животных с высокой выносливостью, %	20	20

Обе модели челночного плавания (плавание с грузом или без) могут быть успешно применены для проведения фармакологических исследований в рамках разработки средств, замедляющих формирование утомления. Модель с дополнительным утяжелением в 2,5% от массы тела характеризуется как вызывающее в среднем на 20-30% более выраженное утомление лабораторных животных и позволяет более четко дифференцировать животных по выносливости.

9.4. Метод бега животных на тредбане до отказа

Для оценки выносливости и работоспособности животных в доклинических исследованиях обычно используют беговую дорожку (тредбан). В ходе исследования необходимо также контролировать параметры дыхания и сердцебиения животных. Для мелких лабораторных животных (крысы, мыши) рекомендуется использовать системы дистанционного учета физиологических параметров. Для крупных лабораторных животных, при условии приучения к оборудованию, можно использовать проводные системы контроля.

9.4.1. Методика бега мелких лабораторных животных.

Беговая дорожка (тредбан) для мелких лабораторных животных представляет собой движущуюся ленту, оборудованную электродами, которые являются отрицательным подкреплением и стимулируют животное двигаться по ленте. На современных тредбанах возможны регулировка угла наклона дорожки, скорости движения ленты, силы тока, подаваемого на электроды, времени бега. Максимальная скорость для работы с животными – 150 см/с. Животные принуждаются к бегу с помощью электрического тока через электрод, размещенный в нижнем заднем конце дорожки. Стандартный лабораторный тредмил позволяет оценить время бега, общее расстояние пробега, число полученных животным электрических ударов. Максимальные скорости потребления кислорода у крыс достигаются при скорости бега 43-53 м/мин.

Принято [4], что оптимальным для работы является режим тестирования при угле наклона 10° и скорости движения ленты 41-45 м/мин, при этом максимальная длительность бега крыс не превышает 30 минут. Важным условием стандартизации исследования является предварительный отбор животных по массе тела (200 ± 20 г)

с исключением из исследования избыточно агрессивных животных, а также предварительная тренировка животных по 5-10 минут на небольшой скорости на протяжении 2-3 дней.

Такая методика в основном используется для оценки выносливости (работоспособности) животных, а также для создания выраженного утомления в исследованиях на восстановление физической работоспособности.

Существует модификация методики с нарастающей скоростью движения ленты, предназначенная для оценки скоростных характеристик тестируемых животных. В данной модификации тестирование начинается на скорости 10 м/мин и повышается каждые 3 минуты на 5 м/мин до достижения значений, при которых животное не может поддерживать скорость и удержаться на движущейся ленте, не взирая на электрическую стимуляцию. Обычно максимальная скорость, которую могут кратковременно развивать крысы в рамках этой модификации, находится в диапазоне 55-60 м/мин.

9.4.2. Бег мини-пигов на тредбане до отказа.

Этот тест максимально приближен к аналогичным исследованиям у человека, что позволяет с большой долей вероятности экстраполировать результаты фармакологических экспериментов в отношении спортсменов.

Для проведения теста необходим тщательный отбор животных для формирования контрольных и опытных групп. Как правило, для экспериментальной работы пригодны не более 30% животных из общего поголовья стада. Животные в каждой группе должны быть одного пола и возраста. Допускается варьирование массы тела мини-свиней в пределах 10% от средней. На подготовительном этапе и во время эксперимента предпочтительно индивидуальное содержание животных в клетках. В крайнем случае, допускается содержание животных не более 3-х голов в станке во избежание выяснения ими иерархического положения, что часто приводит к различным травмам. Содержание, кормление и уход за животными в контрольных и опытных группах должно быть одинаковой.

Критерием для отбора животных помимо вышеперечисленных признаков служит их обучаемость к бегу на движущейся ленте тредбана. Заведомо

отбраковываются мини-свиньи с агрессивным поведением. После предварительного отбора животных, начинают выявлять особей, которые не отличаются по продолжительности бега на тредбане более, чем на 20%. На начальном этапе ограничиваются скоростью движения ленты 3 км/ч, продолжительность бега мини-свиней – 5 мин.

Этап тренировочного обучения предназначен для формирования у животных необходимых для проявления выносливости моторно-координационных навыков, адаптации кардиореспираторной системы к физическим нагрузкам и вывода животных на критериальный уровень физической работоспособности и выносливости, соответствующий тренировочному и соревновательному уровню спортсменов. С этой целью животные ежедневно или через день подвергаются тренирующим физическим нагрузкам возрастающей длительности при фиксированной скорости движения ленты бегущей дорожки (3 км/ч).

Продолжительность выполняемой животными беговой нагрузки увеличивается от 5 минут до отказа животного, с повторным предъявлением нагрузки через 5-10 минут отдыха, до достижения суммарной продолжительности времени бега 30 минут за тренировочный день.

Тренировочный период заканчивается, когда животное может выполнять на бегущей дорожке на скорости 3 км/ч нагрузку непрерывной продолжительностью 30 минут (критериальный уровень, соответствующий работоспособности спортсмена) или 50 минут (критериальный уровень высокотренированного спортсмена).

Если животное не выходит на заданный критериальный уровень работоспособности и выносливости за 3 недели тренировочного периода, оно исключается из дальнейшего исследования.

Тестовый период исследования начинается не ранее чем через 2 дня, и не позже 10 дней после завершения тренировочного периода (в связи с угасанием моторных навыков бега и снижения адаптированности сердечно-сосудистой и дыхательной системы). В случае превышения этого интервала времени животное может быть включено в исследование только после дополнительной тренировки до заданного критериального уровня работоспособности.

После завершения тренировочного этапа животные рандомизируются по группам в соответствии с дизайном исследования. Допускается отклонения животных по массе не более 10% от средней.

Для исследования используется специально разработанный тредбан (рисунок 19) на основе беговой дорожке (типа Torneo T-203), имеющий подвижные боковые ограничители, настраиваемые по ширине ленты в зависимости от габаритов животного, и съемную стимулирующую токовую площадку в задней части дорожки.



Рисунок 19 – Изучение работоспособности в тесте бега мини-пигов на тредбане.

По результатам фонового исследования, проводимого при скорости движения ленты 6 км/ч, из дальнейшего исследования исключаются животные, результаты которых отличаются от среднегрупповых более чем на 20% в обе стороны.

Уже отобранным животным опытной группы вводят препараты и испытуемые вещества согласно утвержденному протоколу. Животным контрольной группы вводят плацебо тем же путем, в тех же объемах и той же консистенции, что и исследуемый препарат или вещество. Ввод препаратов необходимо осуществить в одно и то же время на протяжении всего эксперимента, в утренние часы.

В исследованиях расширенного объема, в ходе которых производят определение биохимических и физиологических параметров и их реакцию на нагрузку, за 30-45 минут до начала тестирования после введения животным исследуемых соединений могут осуществляться (в соответствии со специальными целями исследования и утвержденным Протоколом) измеряют показатели артериального давления, оксигенации крови поляриметрическим методом, в капиллярной крови анализируют уровень глюкозы и лактата экспресс-методами, температуру тела ректально, регистрируют ЭКГ в стандартных отведениях (у мини-

пигов в силу особенностей анатомического строения ЭКГ в грудных отведениях не регистрируется), определяется число дыхательных движений. При необходимости осуществляется забор крови из хвостовой вены для биохимического исследования. Эти же манипуляции проводятся сразу же после прекращения беговой пробы. Некоторые физиологические характеристики мини-пигов до и после (через 5-10 минут) предельных физических нагрузок представлены в таблице 14.

В протоколе исследования указывается дата, индивидуальный номер животного, его возраст и масса, ставится отметка о проведении обучения, дате и результате последней беговой тренировки, код группы (препарата). Фиксируется время начала выполнения теста, скорость движения ленты, продолжительность и дистанция бега, особенности поведения и состояния животного при «отказе» от дальнейшего бега и в течение 30 минут после завершения тестирования.

Таблица 11 – Некоторые физиологические параметры мини-пигов до и после предельных физических нагрузок

Ректальная температура, С°		Частота сердечных сокращений, ед/мин		Число дыхательных движений, д/мин		Содержание кислорода в крови, мг/100 мл	
до	после	до	после	до	после	до	после
38,6±0,9	39,9±0,5	77,9±1,7	95,8±1,8	19,3±1,2	28,6±1,9	96,9±1,2	87,6±1,3

Скорость движения беговой дорожки во время эксперимента – 6 км/час.

На рисунке 20 представлены частотные характеристики встречаемости значений продолжительности бега животных на тредбане до отказа в зависимости от уровня их тренированности.

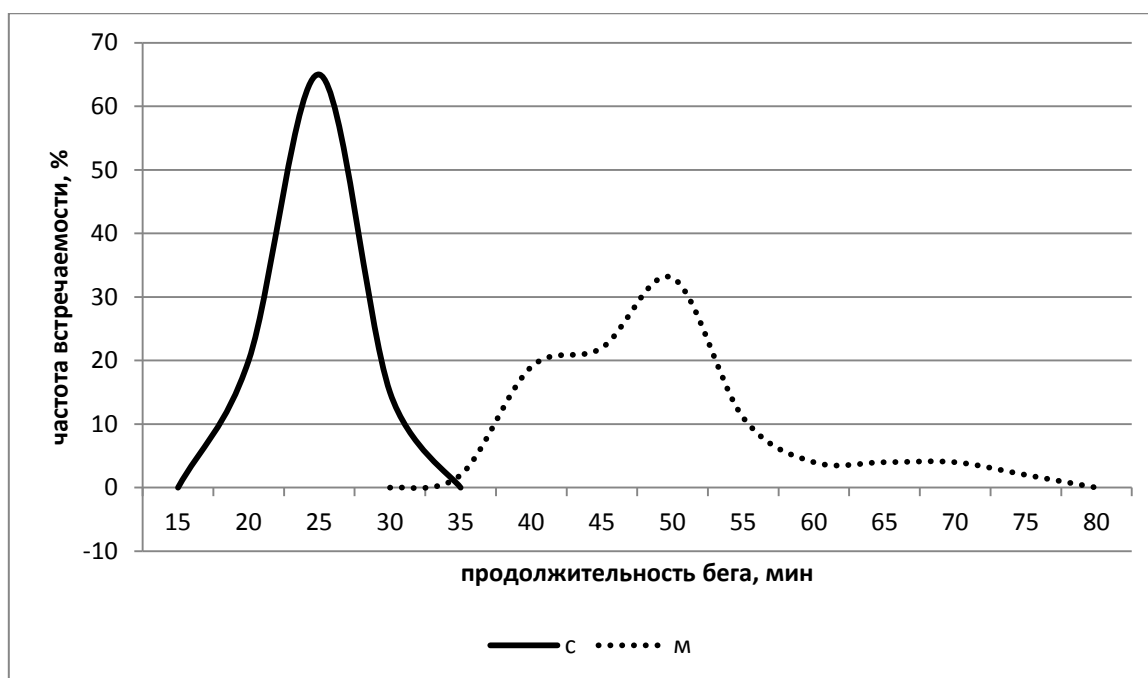


Рисунок 20 – Распределение частот встречаемости времени бега мини-пигов на тредбане до отказа в зависимости от уровня тренированности (с – спортсмен, м – мастер, спортсмен высокой квалификации)

Анализ рисунка 20 показывает, что продолжительность бега животных, тренированных по уровню «спортсмен» соответствует критериям нормального статистического распределения. Показатель находится в диапазоне от 17 до 25 минут при среднем значении $21,2 \pm 0,4$ и коэффициенте вариации 0,12. При тренировке животных по уровню «спортсмен высокой квалификации» уровень тренированности более вариативен и зависит от продолжительности периода тренировок. Статистическое распределение этого показателя существенно отличается от нормального, а, следовательно, требует применения подходов статистической стандартизации (раздел 2.6).

9.5. Методы оценки силовых характеристик животных

В практике спорта силовые характеристики подразделяются на статистические и динамические (ударные, прыжковые). В биомедицинских исследованиях статические силовые характеристики могут быть определены в тесте на силу хватки лап и в тесте удержания животного на скользком вертикальном стержне. Для оценки динамических характеристик известна единственная модель – «прыжковая» модель на ротароде.

9.5.1.Тест на силу хватки лап.

Исследование может проводиться как на мышах, так и на крысах. Прибор – Gripstrengthsystem состоит из решетки, подсоединенной к динамометру (Рисунок 21). При поднесении животного к решетке, оно цепляется за нее пальцами лап. Затем исследователь начинает осторожно оттягивать животное назад до усилия, необходимого для отрыва животного от решетки [10]. По показаниям динамометра регистрируется усилие, необходимое для того, чтобы животное разжало пальцы кистей или стоп. Современные установки позволяют автоматически регистрировать все необходимые параметры.



Рисунок 21 – Тест на силу хватки.

При исследовании на мышах было установлено, что показатель силы хватки лап находится в диапазоне от 25 до 40 г при среднем значении $33,6 \pm 0,5$. При этом статистическое распределение показателя соответствует нормальному (практически равные значения средней величины, моды и медианы распределения, коэффициент эксцесса равен -0,26, асимметрии -0,46). Частотная кривая распределения показателя представлена на рисунке 22.

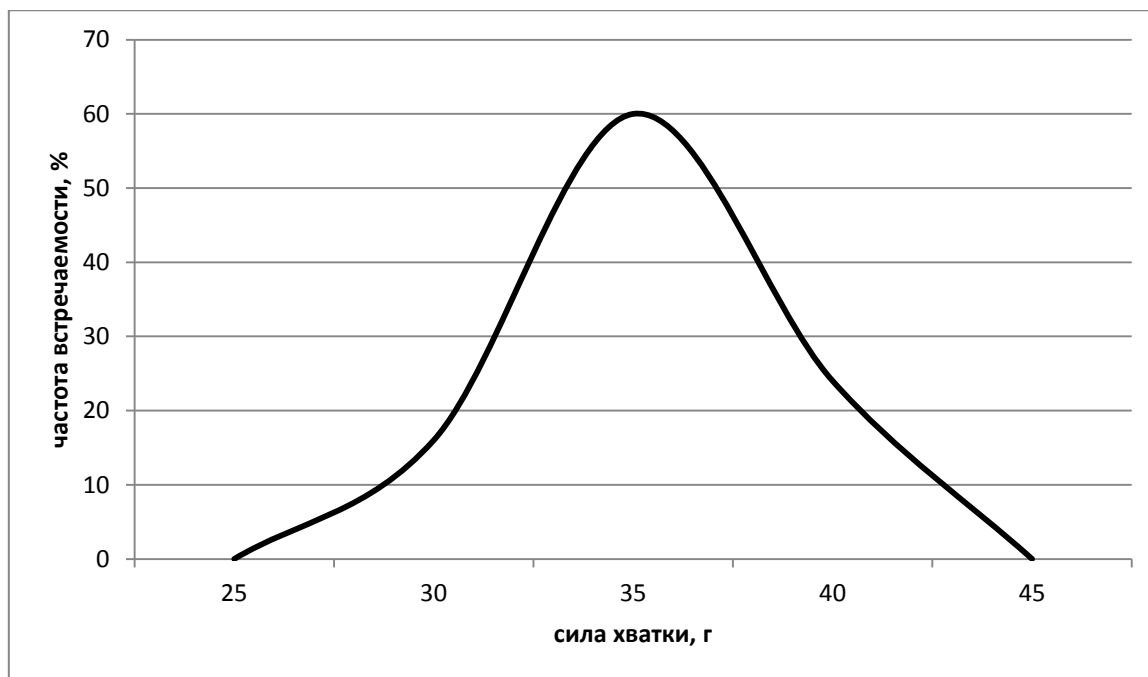


Рисунок 22 – Частотная кривая распределения значений показателя теста силы хватки лап мышей.

Так как статистическое распределение показателя нормально, его обработка не требует каких-либо специальных процедур статистического нормирования (раздел 2.6).

9.5.2.Тест удержания животного на скользком вертикальном стержне.

В биомедицинских исследованиях методика в основном используется как скрининговая для оценки сохранности физической работоспособности лабораторных животных при фармакологическом воздействии.

Для проведения теста животное размещается на середине закрепленного на штативе на высоте не менее 1 м над полом скользкого стеклянного стержня головой вверх (рисунок 23). Фиксируется время удержания животного на стержне в секундах. О сохранности физической работоспособности на фоне фармакологического воздействия судят по отсутствию достоверных сдвигов показателя в сравнении с группой плацебо-контроля.



Рисунок 23 – Выполнение методики удержания на скользком вертикальном стержне.

На рисунке 24 представлена кривая частот распределения времени удержания животных на вертикальном стержне.

Анализ рисунка 24 показывает, кривая частотного распределения времени удержания intactных лабораторных животных (белых мышей) на вертикальном стержне далека от вида кривой нормального распределения, однако отдельные ее участки похожи на куполообразную кривую нормального распределения. В связи с этим логичным является разбиение области построения на 4 интервала: от 0 до 90 секунд, от 90 до 180 секунд, от 180 до 420 секунд, и интервал более 420 секунд.

При сравнении экспериментальных рядов данных интервальным методом для каждого интервала определяется Т-балл каждого экспериментального значения, и затем усредненная разница Т-баллов для каждого интервала умножается на «весовой коэффициент» интервала (равный доле числа наблюдений в данном интервале у intactных животных). В результате получаем показатель смещения от эталонной кривой частотного распределения, с помощью которого, исходя из свойств нормированного Т-распределения, и оценивается степень достоверности различий.

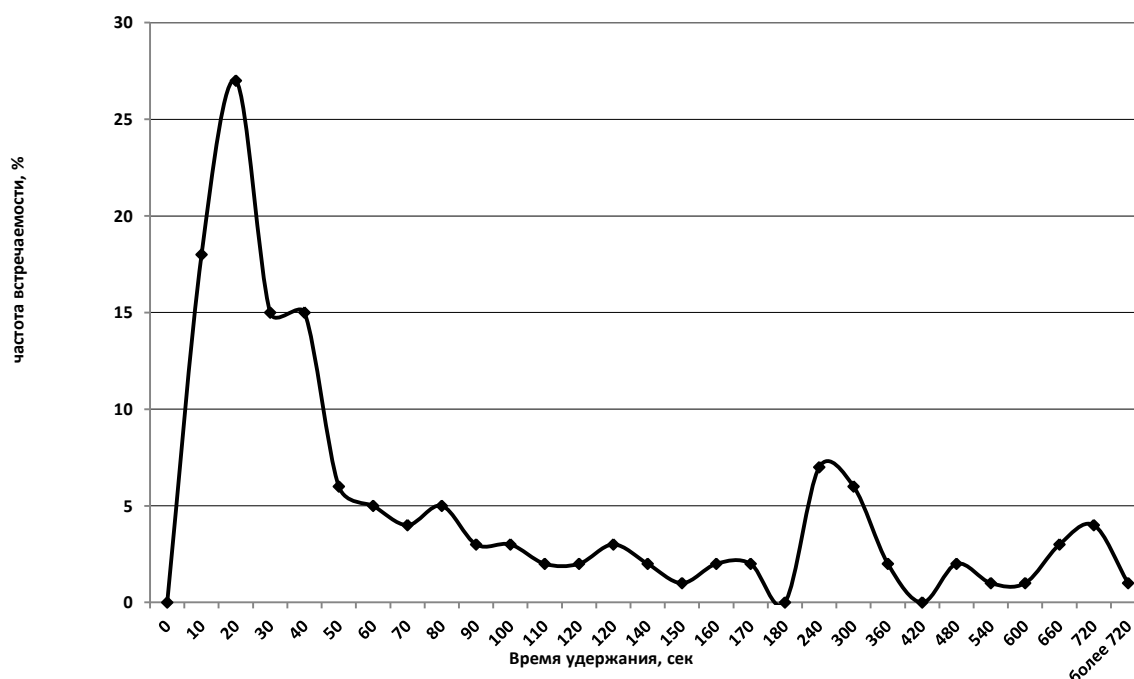


Рисунок 24 – Кривая частотного распределения показателя времени удержания животных на вертикальном стержне (интактные животные).

T-балл экспериментального значения, относящегося к определенному интервалу, рассчитывается по следующей формуле:

$$T(x_i) = 50 + 10 * ((X_i - X_s) / \sigma_i)$$

Отклонение от кривой распределения в пределах соответствующего интервала для конкретного значения определяется как $\Delta T(i) = T(x_i) - 50$.

Общее отклонение от кривой распределения рассчитывается как

$$\Delta T = K_1 * \Sigma \Delta T(1) / N_1 + K_2 * \Sigma \Delta T(2) / N_2 + K_3 * \Sigma \Delta T(3) / N_3 + K_4 * \Sigma \Delta T(4) / N_4,$$

где N_1, N_2, N_3, N_4 – число наблюдений, попавших в соответствующий интервал значений показателя времени удержания животного на вертикальном стержне

Нормативные параметры интервалов для белых беспородных мышей, необходимые для расчетов, приведены в таблице 12.

Если полученное значение ΔT находится в диапазоне от -5 до +5, то экспериментальный ряд не имеет статистически значимых отличий от ряда сравнения ($p > 0.1$). Если значения ΔT находятся в диапазоне от -10 до -5 или от +5 до +10, то отличия имеют уровень значимости статистических тенденций ($0.1 > p > 0.05$). Если значения ΔT находятся в диапазоне от -15 до -10 или от +10 до +15, то отличия имеют уровень значимости статистической достоверности ($0.05 > p > 0.01$).

Если значения ΔT находятся в диапазоне менее -15 или более +15, то отличия имеют уровень значимости статистической достоверности $p < 0,01$.

Таблица 12 – Нормативные параметры интервалов кривой распределения времени удержания лабораторных мышей на вертикальном стержне

№ интервала	Диапазон значений ВУ (сек)	Среднее значение для интервала (X_s)	Стандартное отклонение для интервала (σ_i)	Весовой коэффициент интервала (K)
1	До 90	28,3	21,7	0,7
2	От 90 до 180	126,9	24,2	0,1
3	От 180 до 420	241,7	38,9	0,12
4	Более 420	623,7	107,9	0,08

9.5.3.«Прыжковый тест».

Прыжковый тест является модификацией теста на удержание животного на вращающемся горизонтальном стержне (теста ротарод).

В отличие от стандартного теста (раздел 4.6.1), скорость вращения вала прибора выставляется заведомо высокой, 2 об/с, так чтобы животное не могло удержаться на вале устройства и сваливалось на токовую площадку. Из-за удара электрическим током животное запрыгивает на вал и вновь спустя короткое время падает с него. Анализируемым показателем является количество прыжков, которое может совершить животное до отказа от выполнения теста. Продолжительность выполнения теста – 5 минут.

Частотные кривые распределения значений количества прыжков, совершаемых животными за 5-тиминутный интервал времени, в зависимости от их пола, представлены на рисунке 25.

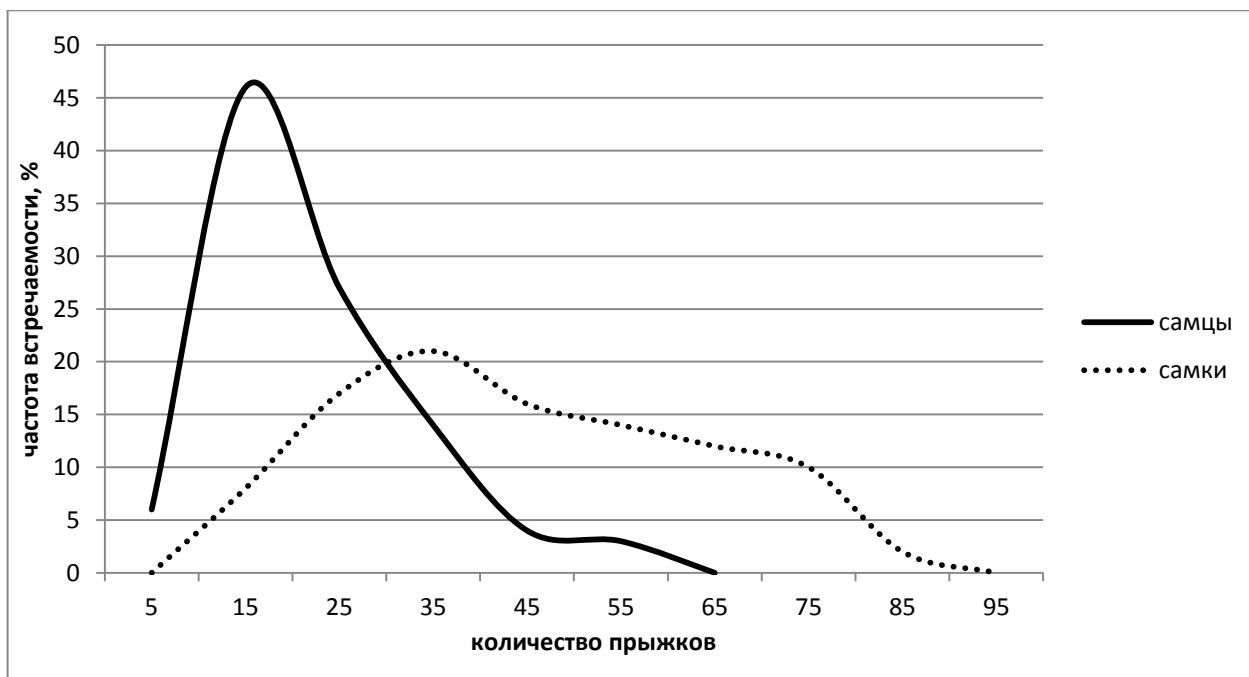


Рисунок 25 – Частотные кривые распределения количества прыжков, которое может совершить животное за 5 минут, самцы и самки.

Анализ рисунка 25 показывает, что статистическое распределение анализируемого показателя как для самцов, так и для самок далеко от нормального распределения случайной величины. Следовательно, оценка достоверности различий между группами животных будет корректным только при использовании непараметрических методов статистического анализа. Сопоставление данных разных исследований и решение вопросов популяционного переноса полученных данных требует проведения статистической стандартизации (Z-нормирования или стеновой оценки, раздел 6.6.).

Самки оказались более «прыгучими», чем самцы. Количество прыжков, которое способно совершать животное, может зависеть от его массы. Дисперсионный факторный анализ показал, что «прыгучесть» самцов не зависит от массы животных и остается низкой во всех диапазонах массы тела (250-500 г). Для самок в диапазоне массы тела 180-250 г она также не зависела от массы тела, но при превышении этого диапазона отмечалось снижение этого показателя на 40% (влияние фактора существенно, коэффициент детерминации модели $D=0.23$, $p=3 \cdot 10^{-7}$). Следовательно, для проведения данного теста необходимо использовать

нелинейных крыс-самок массой 180-250 г. Животные, масса которых превышает 250 г, должны быть исключены из исследования на этапе отбора.

Исключение из анализируемого массива показателей самок с массой более 250 г привело картину частотного распределения в близкий к нормальному вид. Статистические показатели, необходимые для Z-нормирования (раздел 2.6) представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Статистические характеристики показателя прыжковой пробы

Показатель	Самцы	Самки
Среднее значение	17,1	45,5
Стандартная ошибка средней	0,9	1,8
Стандартное отклонение	10,7	17,1
Мода	10	44
Медиана	14	44
Эксцесс	1,43	-0,70
Асимметрия	1,19	0,01
Коэффициент вариации	0,62	0,37

9.6. Методы оценки координированности животных

К методам оценки координированности животных относятся тесты удержания животного на вращающемся горизонтальном тесте, тест «прогулки по приподнятой перекладине» и анализ походки по следам.

9.6.1. Тест удержания на вращающемся горизонтальном стержне (тест ротарод).

Прибор предназначен для оценки чувства равновесия, способности удерживаться на вращающемся барабане [41]. Исследование может выполняться как на мышах, так и крысах. В соответствии с видом животного используется вал нужного диаметра (для мышей – 3 см, для крыс – 7 см). Вращающийся вал приподнят на высоту 10 см для мышей и 15 см для крыс над уровнем дна площадки и покрыт мягким пористым материалом. Чтобы избежать спрыгивания животного, пол камеры находится под электрическим напряжением (35-40 В для крыс, 25 В - для мышей, ток 1А без учета сопротивления кожи лап животного). При падении животного на пол микрофон регистрирует вокализацию животного в слышимом диапазоне. По количеству записанных эпох определяют число падений с вала.

В стандартной методике тест предназначен исключительно для оценки координации движений и равновесия. Он заключается в определении той скорости вращения вала, при которой животное удерживается на вращающемся валу не более 20-30 секунд (рисунок 26). Для проведения теста в качестве стартовой используется скорость для мышей - 6 об/мин, которая каждые 30 секунд повышается на 1 об/мин; для крыс – 0,8 об/с, которая каждые 30 секунд повышается на 0,2 об/с. При достижении скорости вращения, при которой животное не способно удерживаться на валу, оно через 5 минут отдыха подвергается трехкратному повторному тестированию. Если среднее время трех попыток попадает в критериальный диапазон (не более 20-30 секунд), то критическая для данного животного скорость считается определенной. Если время удержания на валу превышает 30 секунд, то животное через 5 минут отдыха помещается на вал при повышенной на 1 шаг скорости вращения и вновь производится тестирование времени удержания животного на валу.

Для крыс стандартная величина скорости вращения, при котором животное не удерживается на валу, обычно несколько превышает значение 2 об/с. Чем выше скорость вращения вала, при котором животное способно удерживаться 20-30 секунд на вращающемся валу, тем выше его координированность и чувство равновесия.



Рисунок 26 – Тест на ротароде.

Так как длительность удержания животного на валу зависит от двух факторов – координированности и силе хватки лап (которая, из-за не сформированности у животного такого навыка, быстро снижается в силу утомления к статическим нагрузкам, направленным на удержание веса животного), то в последнее время используется чаще всего используется другая модификация теста ротарод, направленная на оценку выносливости животных (скорости развития утомления кистей лап). Для исключения влияния первого фактора – координированности, используется фиксированная стандартная скорость вращения вала (1-1,5 об/мин), которую нормально выдерживают все здоровые животные.

После падения с барабана на токовую площадку, животное, стимулированное электрическим током, запрыгивает на вращающийся барабан. Необходимость для животного часто запрыгивать на вращающийся барабан позволило разработать модификацию методики исследования на ротароде, позволяющую оценивать скорость развития утомления. При этом фиксируется время, спустя которое животное, несмотря на электрическую стимуляцию на токовой площадке, уже не может запрыгнуть на вращающийся барабан. Окончание эксперимента определялось визуально, по снижению выносливости и физической усталости крысы, падающей на электрический пол камеры и не способной подняться на вал снова [10].

Увеличение времени выполнения теста более чем на 10% (естественный предел колебаний скорости утомления при прерывистом физическом воздействии) свидетельствует о замедлении скорости формирования утомления у животного. В то же время, если на фоне применения фармакологического средства время удержания животного на вращающемся барабане в единичном цикле снижается, и для стандартизации условий необходимо использовать более медленную скорость вращения барабана, то это может свидетельствовать о негативном влиянии изучаемого фармакологического средства на чувство равновесия, координацию движения и, естественно, выносливость у лабораторных животных.

Частотная кривая распределения значений времени удержания животных на вращающемся горизонтальном стержне представлена на рисунке 27.

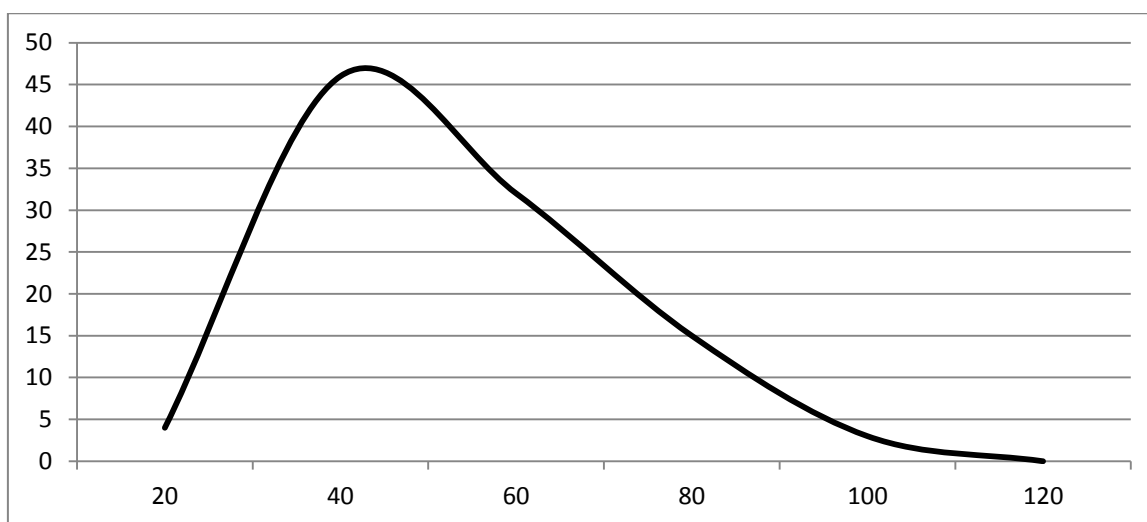


Рисунок 27 – Частотная кривая распределения значений времени удержания животных на вращающемся горизонтальном валу при фиксированной скорости вращения 6 об/мин.

Анализ рисунка 27 и статистических характеристик распределения в контрольной группе животных показал, что время удержания животных в тесте ротарод имеет характер распределения, близкий к нормальному (близкие значения средней, моды и медианы распределения, коэффициент асимметрии $+0,60$ и эксцесса $-0,29$), однако имеется «растянутость» правой ветви частотной кривой, что свидетельствует об определенной неоднородности животных с высокими показателями теста (то есть с высокой выносливостью). Анализ точек перегиба частотного распределения позволяет установить следующие границы диапазонов выносливости животных по этому тесту: 30 секунд и менее – низкая выносливость, 31 – 60 секунд – средний уровень выносливости, более 60 секунд – высокий уровень выносливости. В популяции здоровых лабораторных крыс животных с низкой выносливостью в тесте ротарод 24%, со средней выносливостью – 48%, с высокой выносливостью – 18%. Потенциально активный лекарственный препарат должен не только повышать среднегрупповые значения показателя теста ротарод по сравнению с контролем, но и вызывать перераспределение животных в структуре выносливости в сторону группы с высокой выносливостью.

При необходимости проведения процедуры популяционного переноса (расчет Z-оценок) для показателя теста ротарод могут быть использованы следующие значения, типичные для контрольной группы животных: среднее значение

(математическое ожидание) – 44,2, стандартная ошибка средней – 1,1, стандартное отклонение по выборке – 16,6.

9.6.2.«Прогулка по приподнятой перекладине» (raised-beam walking).

Методика используется для оценки равновесия в основном в исследованиях животных с неврологическим дефицитом (например, при исследовании влияния фармакологических средств на процессы восстановления после черепно-мозговых травм, нейроинтоксикаций, нарушений мозгового кровотока), когда динамика показателей работоспособности является клинически значимым маркером состояния ЦНС. Система представляет собой приподнятую перекладину разной конфигурации и толщины и закрытую безопасную платформу. Животное обучают проходить по перекладине. Фиксируется время прохода, соскальзывания лап, падения. При нарушении равновесия удлиняется время латентного периода перехода за счет того, что животное цепко держится лапами за перекладину [43].

9.6.3.Анализ походки по следам (gait analysis system).

Тест для оценки координации животного, используется по тем же показаниям, что тест «прогулки на приподнятой перекладине» (раздел 9.6.2). Установка представляет собой узкий коридор, по которому животное обучается проходить. Регистрируют время и скорость прохода, продолжительность касания пола каждой частью тела животного (каждая нога, хвост, живот, нос). В норме центр следа стопы падает на центр предшествующего следа кисти. При нарушении координации постановка задней лапы изменяется.

10. Вспомогательные методы, используемые для оценки влияния лекарственных средств на работоспособность животных

К вспомогательным методам исследования влияния лекарственных средств на работоспособность лабораторных животных относятся методы оценки поведенческой активности животных и методы оценки устойчивости к гипоксическому воздействию.

10.1. Методы оценки поведенческой активности животных

10.1.1. Тест на агрессивное поведение «бой самцов».

Методика основана на стремлении животных, подвергшихся стрессовому электрокожному раздражению, избежать его, взобравшись на второе животное, что является стимулом к агрессивному поведению и возникновению острой ситуации стрессового конфликта.

Исследование направлено на определение порога электрической стимуляции, при которой помещенные в тесные условия два животных начинают демонстрировать агрессивное поведение (рисунок 28). Технически методика может выполняться в установке для проведения исследования в тесте ротарод со снятым горизонтальным стержнем, так как установка снабжена напольными электродами с регулируемой подачей напряжения, а сама по своему объему достаточно тесная для комфортного пребывания двух взрослых крыс-самцов.



Рисунок 28 – Выполнение методики «бой самцов».

Включение этой методики в батарею тестов обосновано, во-первых, тем, что умеренное повышение агрессивности многими специалистами в области спорта расценивается как важный компонент психологической готовности к соревнованиям, настроенности на победу. С другой стороны, повышение порога агрессивности отражает рост толерантности к стрессу, что способствует более адекватному течению восстановительных процессов в межсоревновательный и тренировочный периоды.

В оценке влияния фармакологических средств значимым является изменение порога электростимуляции, вызывающей отчетливое агрессивное поведение. При этом повышение напряжения в сравнении с контрольной группой будет характеризовать усиление таких особенностей поведения, как эмоциональная стабильность, толерантность к стрессу, а снижение порогового уровня напряжения - эмоциональную лабильность, взрывчатость, агрессивность.

10.1.2. Тест открытого поля (open field).

Для оценки базовых этологических показателей поведения животных может быть использован тест «Открытое поле», позволяющий охарактеризовать их ориентировочную активность (ОА), поисковую активность (ПА), эмоциональную лабильность (ЭЛ) и агрессивность (Аг). Кроме этих, базовых показателей, в тесте открытого поля также регистрируется общая двигательная активность (ОДА) и дополнительный показатель психологического комфорта животных – груминг (количество умывательных движений) [1. 22. 28].

Тест был разработан американским исследователем Холлом [45] для оценки общей и исследовательской активности. Классическая установка представляет собой арену, поделенную на одинаковые квадраты. В центр помещается животное, регистрируется число пересеченных квадратов, то есть пройденное за определенное время (обычно 10 мин) расстояние.

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

животного и его познавательная деятельность к концу опыта снижается. Лучшим выражением уменьшения страха у животных является исследование ими внутренних секторов, которое постепенно становится более интенсивным от опыта к опыту.

Как правило, ориентировочно-исследовательская реакция крыс оценивается по горизонтальной и вертикальной двигательной активности, времени реакции обнюхивания. В то время как эмоциональный статус животного оценивают по числу болюсов, уринаций, груминговой активности, времени выхода из центра и времени замирания. Все эти показатели изменяются при введении в организм различных фармакологических препаратов, а также при действии физических и социальных факторов.

Современные установки снабжаются фотоэлементами либо датчиками вибрации, и процессорами, позволяющими фиксировать различные виды локомоторной активности (базовую, исследовательскую, груминг, вертикальную активность, стереотипные движения), фиксировать траекторию движения, рассчитывать соотношения нахождения животного в центре и на периферии поля. Данные преобразовываются в цифровой формат.

Исследование проводят на приборе, представляющем собой специальную площадку размером 80*80 см с 16-ю квадратами и 16-ю отверстиями (в каждом квадрате), размещенную на расстоянии 30 см над полом. Стандартное время наблюдения за спонтанным поведением животного в скрининговых фармакологических исследованиях – 3 минуты.

Регистрируются следующие показатели:

- число пересеченных квадратов (а);
- число обследованных квадратов (А);
- число подъемов на задние лапы – стоек (b);
- число квадратов, в которых были сделаны стойки (В);
- число заглядываний за край поля (с);
- число квадратов, в которых были заглядывания за край (С);

- число заглядываний в отверстия (n);
- число квадратов, в которых были заглядывания в отверстия (N);
- количество умывательных движений (Гр);
- число дефекаций (D);
- число уринаций (U).

Затем, по истечении заданного времени, не снимая животное с арены, проверяют реакцию на хлопок (X) и захват рукой (H), которые оцениваются в баллах (от 0 до 4).

Расчет этологических показателей проводится по следующим формулам:

Ориентировочная активность $OA = a/A + b/B$;

Поисковая активность $ПА = n/N + c/C$;

Эмоциональная лабильность $ЭЛ = D + U$;

Агрессивность $Аг = H + X$;

Общая двигательная активность оценивается по показателю $(a/10)$;

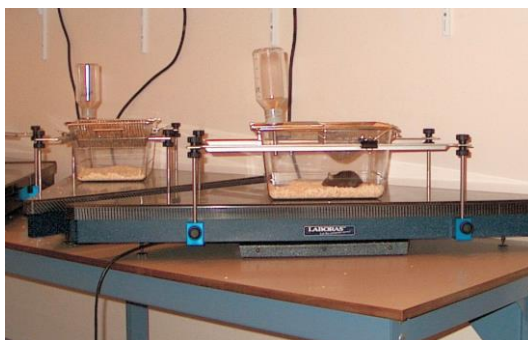
Групповой показатель психологической комфортности животных (ПК) определяется как доля животных в группе, у которых отмечался груминг.

10.1.3. Анализ поведенческих компонентов по локомоторной активности животных.

Исследование проводится на установке Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая на основе регистрации колебаний гироскопически уравновешенной платформы (рисунок 29), где находится клетка с животным, позволяет вычислять длительность таких форм поведения как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность, стойки (вертикальная активность), груминг, стереотипные движения и др. [14, 16] Кроме того, оценивается время элементов сложного поведения. Установка имеет следующие преимущества перед другими формами проведения наблюдений:

- возможность тестирования многих мелких лабораторных животных – мыши, крысы, хомяки, морские свинки – что крайне важно при выборе оптимальной модели для биомедицинских (доклинических) исследований;

- полная автоматизированность системы, позволяющая без участия экспериментатора и, соответственно, «человеческого фактора», измерять поведенческие характеристики животных;
- способность работы в полной темноте, когда использования иных методов, таких как видеорегистрация, ограничено или невозможно;
- длительность исследования, составляющая до 7 дней в непрерывном режиме, т.е. тестируемые животные при этом находятся в привычных для них условиях (это дает возможность заменить одним обширным тестом несколько простых, таких как «Открытое поле» и т.д.);
- простота и удобство использования, которое не требует дополнительных навыков работы исследователя и особенной профессиональной подготовки.



- Рисунок 29 – Компьютеризированная система автоматической оценки различных форм поведения животных.

Эпоха анализа стандартно составляет 15 мин. На каждом временном промежутке определяют длительность каждой формы поведения по группе животных, выражаемую в секундах от общей длительности эксперимента. В последующем, полученные прямые данные могут быть переведены в структуру поведенческой активности (% от эпохи анализа).

Полученные данные группируются в зависимости от тестируемого препарата, временного промежутка и формы поведения. Статистическая обработка проводится с помощью пакета программ MATLAB путем вычисления медиан по всем животным, после чего строятся гистограммы распределения форм поведения для каждого временного промежутка. Оценку достоверности проводят с помощью

указанных на гистограммах верхних и нижних границ доверительных интервалов, в качестве которых использовали значения 25-й и 75-й перцентилей соответственно.

Информационно значимыми в исследованиях, направленных на работоспособность животных, изменение доли в структуре спонтанного поведения, как горизонтальная и вертикальная активность, периоды неподвижности (иммобилизации) животных, а также продолжительность груминга как показатель психологического комфорта. При введении животным соединений с психоактивирующим действием отмечается увеличение по сравнению с контролем доли времени активных перемещений (горизонтальная и вертикальная активность) и снижение доли периодов неподвижности. Наличие психоактивирующего действия позволяет закономерно прогнозировать повышение работоспособности животных.

Основными преимуществами компьютерного анализа поведения с помощью системы Laboras являются:

10.1.4. Анализ ультразвуковой вокализации.

Информативные данные о стрессе у животных могут быть получены путем измерения их вокализации, существенная часть которой представлена в ультразвуковом диапазоне. Эта ультразвуковая вокализация является поведенчески важной, по крайней мере, по двум причинам: во-первых, она может служить мерой оценки текущего состояния животных, а во-вторых, вероятно, является важной коммуникативной особенностью, которая должна приниматься во внимание при анализе различных зоосоциальных аспектов поведения животных [10, 16, 17].

Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (MertisB.V., Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрацию ультразвуковых колебаний у каждого животного в состоянии покоя осуществляли в течение 30 минут.

После удаления физических артефактов (монотонных шумов), осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 20 до 100 кГц с помощью пакета

программ MATLAB-5.5 методом Уэлча (функция `pwelch`). Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье (N_{fft}) – 2000 интервалов. После вычислений спектральной плотности мощности (СПМ) находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного. Кроме того, отдельно вычислялись медианы значений спектра по всей частотной полосе (20-100 кГц), и для каждой частоты осуществлялось суммирование числа случаев, когда СПМ была выше этой «общей» медианы. Также оценивалось число случаев (в процентах), когда каждая из анализируемых частот присутствовала в записи в течение эксперимента [33].

Более воспроизводимыми являются результаты, полученные на крысах-самках в возрасте 2,5-х месяцев.

На рисунке 30 представлена типичная картина изменения ультразвуковой вокализации крыс после введения психоактивирующего средства.

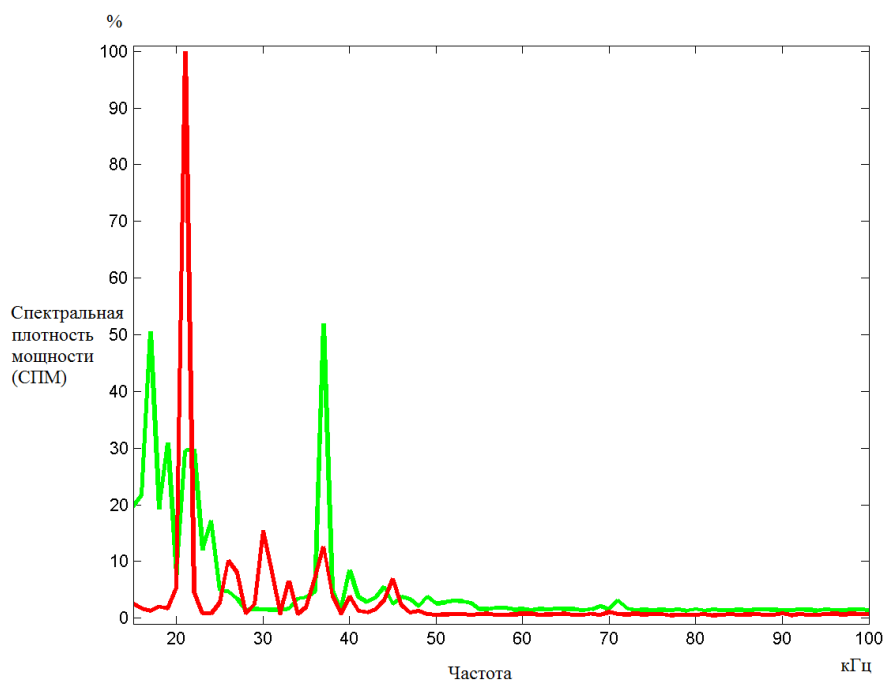


Рисунок 30 – УЗВ крыс. По оси абсцисс – частота УЗВ, кГц. По оси ординат – спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – через 1 час после введения психоактивирующего препарата.

10.2. Методы оценки устойчивости к гипоксическому воздействию

Наличие у исследуемого лекарственного средства дополнительной антигипоксической активности является важным компонентом его влияния на физическую работоспособность и позволяет предположить преимущественно

метаболический и нейропротекторный механизмы его действия, способность поддерживать работоспособность в условиях предельных физических нагрузок, для которых характерно формирование особого вида гипоксии – гипоксии физической нагрузки.

В основе изучения универсальных по своему действию антигипоксантов лежит их способность повышать устойчивость животных к острому гипоксическому воздействию. Основным методом оценки устойчивости организма мелких лабораторных животных к гипоксическому воздействию является создание острой гипоксической гипоксии. Основным анализируемым показателем является величина высотного порога, при достижении которой у животных начинают проявляться признаки агонального состояния.

По механизмам формирования гипоксическая гипоксия может создаваться как с использованием барокамер (гипобарическая гипоксия), так и гипоксикаторов, создающих обедненные кислородом газовые дыхательные смеси (нормобарическая гипоксия).

10.2.1. Гипобарическая гипоксия.

При исследовании высотного порога лабораторные животные (крысы) поднимаются в барокамере со скоростью 120-180 м/с (скорость подъема должна быть фиксированной для конкретной барокамеры) до начальной площадки 9000 м (пороговая величина устойчивости для животных с наличием заболеваний или постоперационных состояний), находятся на этой высоте 5 минут (300 секунд), и вновь поднимают с выбранной скоростью до следующей площадки на 1000 м выше, и так далее до фиксирования у животного агонального дыхания. Высота, на площадке которой было зафиксировано агональное дыхание, и является индивидуальным высотным порогом для данного животного. Однако, полученные таким образом данные являются дискретными, ступень повышения порога – 1000 м, они не учитывают фактическое время жизни животных на пороговой высоте.

Для перевода дискретной шкалы в непрерывную могут быть использованы 2 подхода: присвоение каждому временному промежутку (например, 100 секунд) пребывания на высоте балла (таблица 14) или использование дробной высотной

шкалы, при которой целая часть равна высоте площадки в километрах, а дробная часть равна отношению длительности жизни на этой высоте в секундах к длительности площадки [38].

Например, крыса прожила на площадке 13 000 м 120 секунд при длительность площадки 300 секунд. Тогда высотный порог животного будет равен 13,4 км, а его устойчивость к гипоксии по высотному порогу будет равна 14 баллам. По граничному времени площадки на соответствующей высоте может быть оценена выживаемость животных как показатель популяционной устойчивости к гипоксии данного уровня (рисунок 31).

Таблица 14 – Балльная оценка устойчивости к гипоксии по критерию высотного порога для крыс

Высота	Время жизни, секунды		
	100	200	300
9000	1	2	3
10000	4	5	6
11000	7	8	9
12000	10	11	12
13000	13	14	15
14000	16	17	18
15000	19	20	21

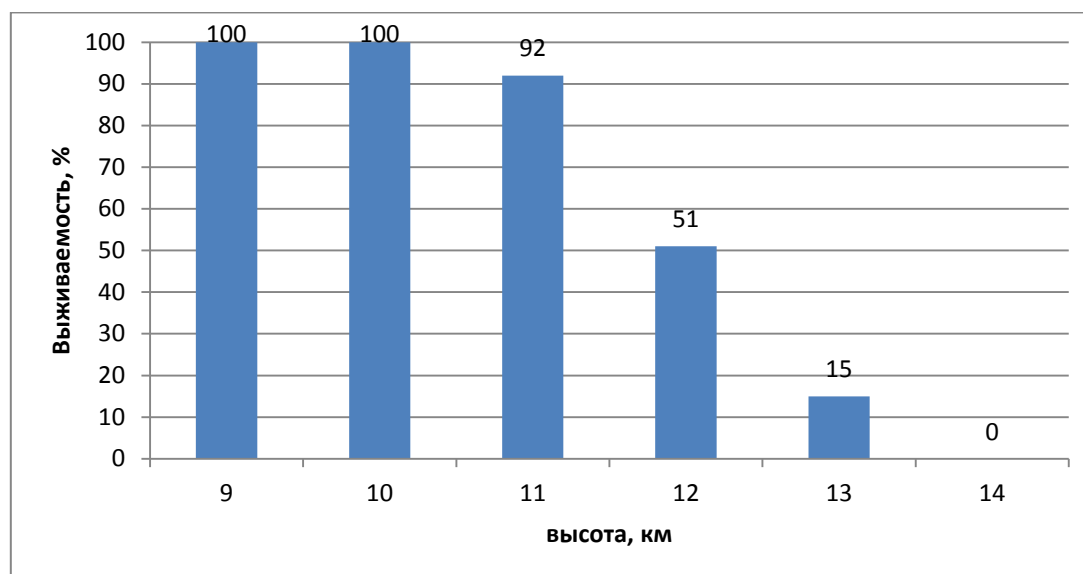


Рисунок 31 – Выживаемость крыс (площадка 300 секунд) на различных высотах.

Проведенный дисперсионный анализ показал, что на значения высотного порога не оказывают существенного влияния факторы линейности животных (нелинейные, линии WAG, Wistar, коэффициент детерминации модели $D=0,03$, $p=0,33$) и их пола (самки, самцы, коэффициент детерминации модели $D=0,06$, $p=0,29$).

Статистические характеристики высотного порога для крыс соответствуют основным требованиям нормального распределения (среднее значение, мода и медиана распределения близки друг другу, параметры эксцесса и асимметрии в пределах нормативных значений).

Представленная на рисунке 32 частотная кривая распределения значений показателя высотного порога подтверждает соответствие этого параметра нормальному статистическому распределению.

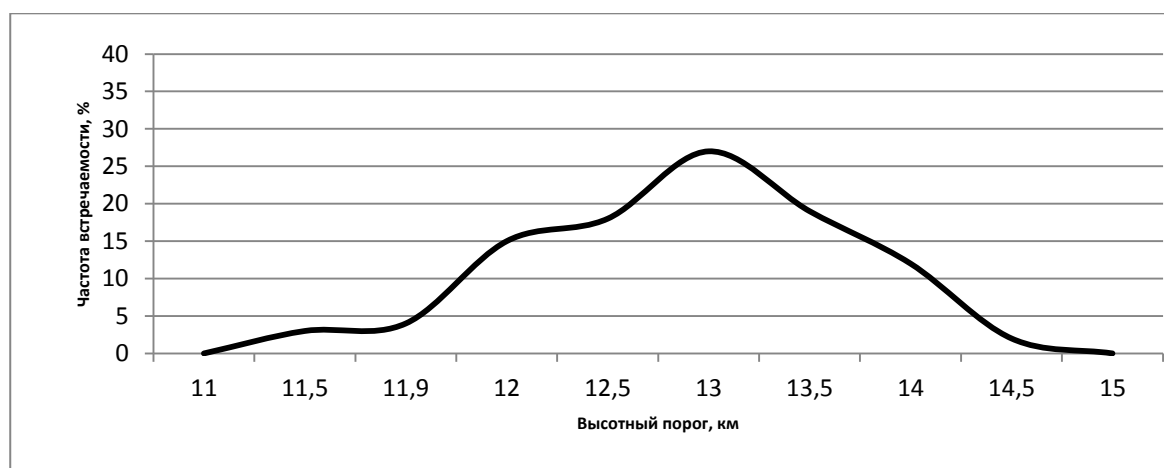


Рисунок 32 – Частотная кривая распределения значений высотного порога крыс.

Таким образом, результаты, полученные при исследовании гипоксической устойчивости крыс по критерию высотного порога, могут быть соотнесены с генеральной совокупностью животных, для них возможно прямое соотнесение результатов различных серий исследований, в том числе при исследованиях антигипоксической активности лекарственных средств. Статистическая обработка этого показателя любыми методами, в том числе – параметрическими, является корректной. Для высотного порога характерна низкая вариативность показателя (коэффициент вариации 5%), что отражает популяционную стабильность показателя.

Границами диапазонов устойчивости к гипоксии являются точки перегиба кривой (11,9 и 13,5 км). Следовательно, животные, высотный порог которых менее 12 км, будут относиться к низко устойчивым к гипоксии, от 12 до 13,5 км – к среднеустойчивым, более 13,5 км – высоко устойчивым животным. Для популяции здоровых крыс структура высотной устойчивости будет иметь следующий вид: до 10% крыс будут иметь низкую устойчивость, около 15% - высокую, остальные 75% - среднюю устойчивость к гипоксии.

При исследовании антигипоксической активности лекарственных средств в случае высокой антигипоксической активности должно отмечаться повышение высотного порога и увеличение доли высокоустойчивых животных при снижении доли низко устойчивых. При умеренной антигипоксической активности могут или умеренно повышаться среднегрупповые значения высотного порога, или незначительно меняться соотношения между подгруппами животных по уровню устойчивости к гипоксии.

10.2.2. Нормобарическая гипоксия.

Исследования проводят в гипоксикамере (например, «БИО-НОВА-204»). Окружающий воздух, очищенный фильтром, сжимается компрессором и подается на вход мембранного модуля. Полупроницаемые мембраны обладают свойством селективного пропускания молекул кислорода и азота воздуха. На выходе мембранного модуля получается воздух с уменьшенным содержанием кислорода. С выхода газоразделительного блока газ поступает по шлангу в камеру (объем 75 л) нормобарической гипоксии. Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС – не менее 5 л/мин. Процентное содержание кислорода в ГГС, подаваемой животным, регулируется и устанавливается с помощью газоанализатора, который встроен в установку.

Для создания острой нормобарической гипоксии используется проба нарастающей гипоксии, в ходе которой на приборе выставлялось минимальное содержание кислорода в газовой смеси (3%), и животные подвергались гипоксическому воздействию в ходе вывода прибора на максимальный уровень

гипоксии. В гипоксическую камеру помещали до 30-ти мышей одновременно контрольной и опытной групп. Для каждого животного регистрировали критический процент кислорода в ГГС, который вызывал его гибель.

Стандартизированные условия эксперимента в гипоксикамере «БИО-НОВА-204» представлены на рисунке 33.

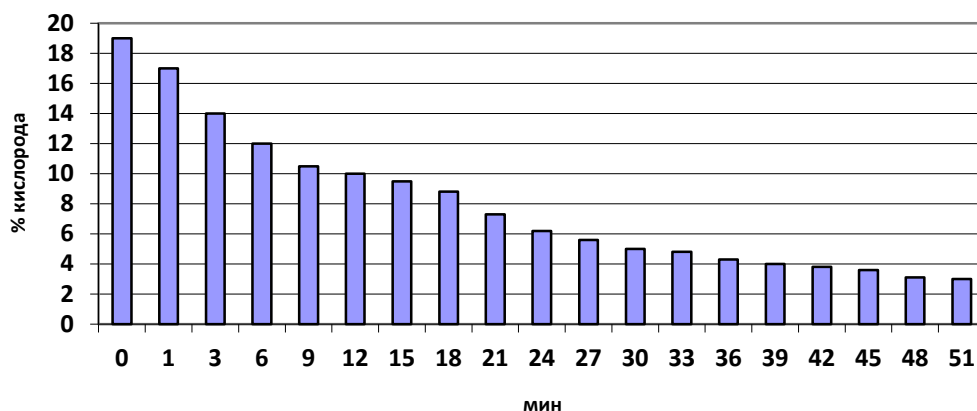


Рисунок 33 – Динамика процентного содержания кислорода в гипоксической газовой смеси при выполнении гипоксической пробы.

Установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% до 3,4% [31].

Частотная кривая распределения гибели животных в зависимости от содержания кислорода в ГГС в контрольной группе и при применении антигипоксантов представлена на рисунке 34.

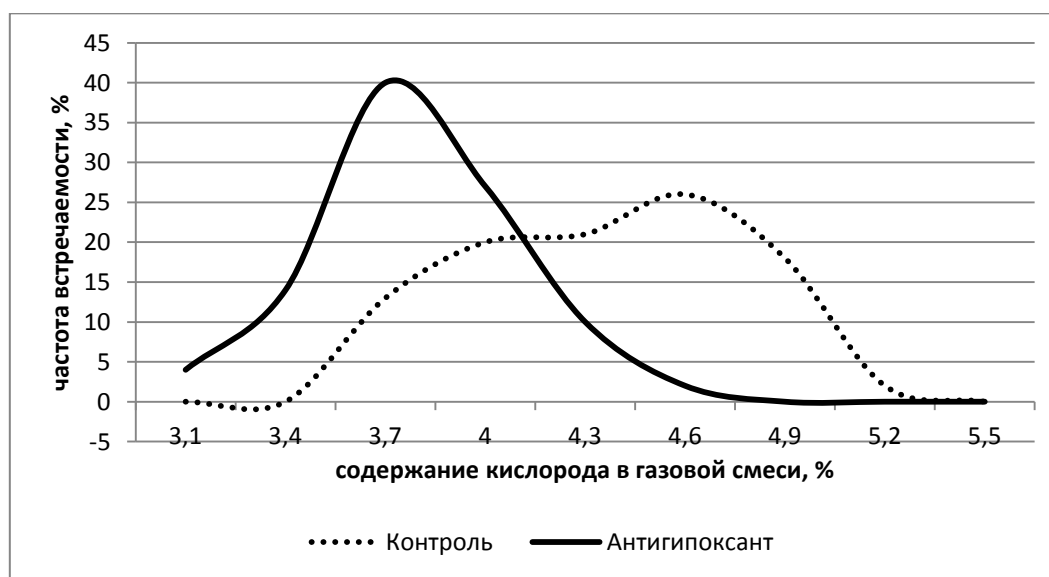


Рисунок 34 – Частотная кривая распределения гибели животных в зависимости от содержания кислорода в ГГС.

Анализ рисунка 34 показывает, что в контрольной группе кривая распределения достаточно далека от вида кривой нормального распределения, имея частотный «завал» в области более высоких значений содержания кислорода, что соответствует более низкой устойчивости к гипоксии. Следовательно, для решения задач сравнительной оценки и популяционного переноса полученных результатов необходимо использовать процедуры статистической стандартизации (раздел 2.6) с расчетом Z-оценок. Для этого можно использовать следующие статистические характеристики, полученные на контрольной группе животных: среднее значение (математическое ожидание) – 4,23, стандартная ошибка средней – 0,05, стандартное отклонение – 0,41, коэффициент вариации – 0,10, границы вариации – от 3,3 до 5,0.

Анализ кривой по точкам перегиба позволяет определить границы диапазонов устойчивости: для высокоустойчивых животных гибель животных происходит при диапазоне содержания кислорода в ГГС 3,7% и менее, диапазону средней устойчивости соответствует содержание кислорода в ГГС от 3,8 до 4,6 %, а диапазону низкой устойчивости к гипоксии – содержание кислорода в ГГС - 4,9% и более. В контрольной группе животных высокоустойчивых животных было в среднем 13%, среднеустойчивых – 67%, и низкоустойчивых – 20%.

При фармакологической коррекции нормобарической гипоксии соединениями с выраженной антигипоксической активностью происходит существенное изменение структуры устойчивости: на фоне применения антигипоксантов 61% животных попадают в группу высокоустойчивых животных и 39% в группу со средней высотной устойчивостью, При этом в группе с низкой устойчивостью к гипоксии не осталось ни одного животного.

11. Особенности выполнения исследований лекарственных средств в условиях моделирования утомления и тренировочного процесса

11.1. Утомление, механизмы его формирования и фармакологической коррекции

Интенсивная или длительная работа ведет к развитию утомления, причина которого – недостаточность процессов восстановления физиологических затрат, вызванных работой или ее сочетанием с неблагоприятным влиянием

производственных или экстремальных факторов среды. Утомление – это совокупность временных изменений в физиологическом и психическом состоянии человека, развивающихся в результате напряженной или продолжительной деятельности и ведущих к ухудшению количественных и качественных показателей работы и дискоординации физиологических функций, повышающих физиологическую стоимость работы [25]. В самой общей форме утомление может быть охарактеризовано как обратимое нарушение физиологических и биохимических компонентов гомеостаза, которое компенсируется в послерабочем периоде [4]. Утомление связано с исчерпанием резервных возможностей организма продолжать работу. Характер нарастания утомления и его конечная величина зависят от индивидуальных особенностей организма, психоэмоционального состояния, особенностей режима нагрузок, внешних условий выполнения нагрузок [16].

Как показали исследования [20], длительная нагрузка, приводящая к развитию утомления, вызывает определенные сдвиги (замедление) в пейсмекерной организации ритмической активности различных физиологических функций, в частности, сердечного ритма, показателя кислорода ткани различных участков головного мозга, поверхностной электромиограммы мышц. Изменения пейсмекерной активности, сохраняющиеся на протяжении периода отдыха, снижают эффективность механизмов восстановления работоспособности и будут способствовать кумуляции утомления и повышению физиологической стоимости работы (то есть формированию хронического утомления и переутомления) [5].

При выраженном утомлении происходит угнетение реакций энергетического и пластического обмена из-за снижения активности некоторых ферментов. В частности, высоко чувствительны к утомлению такие ферменты цикла Кребса, как малат- и изоцитратдегидрогеназы, рибосомальные ферменты протеинсинтеза. Необходимость выполнения физических нагрузок в таких условиях сопровождается резкой активацией катаболизма белков, в том числе и мышечных [21]. На фоне утомления установлено снижение активности физиологической антиоксидантной системы, что способствует активации процессов перекисного и

свободнорадикального окисления и вторичным метаболическим нарушениям, которые будут снижать метаболическую резистентность организма к гипоксии, гипертермии, интенсивным физическим нагрузкам.

Для оценки физиологической стоимости работы с учетом функциональных возможностей отдельного индивидуума принято сопоставлять энерготраты с максимальной аэробной способностью [9]. имеется в виду результирующая способность аппаратов внешнего дыхания, кровообращения, транспортной способности крови и ферментных систем к переносу и утилизации кислорода в реакциях окислительного фосфорилирования [44].

Не более 1-2 минут могут выполняться нагрузки субмаксимальной мощности (80-90% МПО₂), характеризующиеся анаэробным типом обмена, где наибольшая часть кислородного запроса потребляется не во время работы, а в восстановительном периоде. Около 30 минут может совершаться работа при полном использовании аэробной способности организма (70-80% МПО₂). Образующаяся при этом значительная кислородная задолженность требует предоставления перерывов для отдыха, сопоставимых с длительностью работы. при этом важно, чтобы к началу следующего эпизода нагрузки кислородный долг был полностью ликвидирован. Работа большой мощности (50-70% МПО₂) может выполняться здоровыми людьми в интервале от 30 минут до нескольких часов и может выполняться лишь эпизодически. Работа умеренной мощности (25-50% МПО₂) достаточно широко представлена в деятельности людей физического труда, может выполняться в течение нескольких часов, но также эпизодически, при предоставлении во время рабочего периода кратковременных пауз для отдыха. Фактором, ограничивающих возможную длительность таких работ, является не столько величина кислородного долга, сколько снижение углеводных ресурсов или нарушения теплового состояния (перегрев). Работы низкой интенсивности (менее 25% МПО₂) могут совершаться в течение 8-18 часов [47].

Основные функциональные и биохимические сдвиги после физической нагрузки разной мощности в точке утомления представлены в таблице 15.

При работе максимальной мощности утомление связано с несостоятельностью центрального механизма организации и координации движений такого темпа: происходит самоограничение интенсивности потока импульсов с помощью короткоаксонных вставочных нейронов ГАМК-эргической природы, торможения передачи сигналов в синапсах вследствие тормозных пресинаптических рецепторов, остаточной деполяризации электровозбудимых мембран и развития парабиоза.

Таблица 15 – Основные функциональные и биохимические сдвиги после физической нагрузки разной мощности в точке утомления (по: [4])

Показатель	Максимальная мощность	Субмаксимальная и большая мощность	Умеренная и низкая мощность
Энергетическое обеспечение	Анаэробное	Смешанное	Аэробное
Энергетический резерв: гликоген мышц и миокарда	Сохранен	Истощен	Частично сохранен
гликоген печени	Сохранен	Частично истощен	Истощен
липиды жировых депо	Не используются	Не используется	Используются
фонд аминокислот	Сохранен	Сохранен	Частично использован
Активность ферментов гликолиза и окисления	Не изменена	Повышена	Снижена
Сахар крови	Повышен	Повышен	Снижен
Ацидоз	Отсутствует	Резко выражен	Выражен
Лактат крови	Не изменен	Резко повышен	Повышен
Кетоновые тела в крови	Не изменены	Существенно не изменены	Значительно повышены
Тонус симпатической системы	Повышен	Резко повышен	Снижен
Тонус гипофиз-адреналовой системы	Повышен	Резко повышен	Снижен
Температура тела	Незначительно повышена	Умеренно повышена	Значительно повышена
Потеря жидкости и электролитов	Нет	Нет	Большая
АТФазная активность мышц	Повышена	Повышена	Снижена
Морфологические изменения (митохондрии, мембраны)	Нет	Нет	Обнаруживаются
Ферменты сыворотки	Не изменены	Существенно не изменены	Значительно увеличены
Функция генетического аппарата клеток	Быстрая дерепрессия	Быстрая дерепрессия	Медленная дерепрессия
Включение аминокислот в белки	Не изменено	Быстро восстанавливается	Медленно восстанавливается

Показатель	Максимальная мощность	Субмаксималь- ная и большая мощность	Умеренная и низкая мощность
Скорость восстановления функций и работоспособности	Минуты	Многие минуты, часы	Часы, дни

При работе субмаксимальной мощности основную роль в генезе утомления играет дальнейшая неспособность организма компенсировать изменения как местного (в работающих мышцах), так и общего гомеостаза (выраженная лактацидемия, ацидоз, гипогликемия, обеднение запасов гликогена в мышцах и печени, снижение ударного объема сердца).

При работе большой мощности скорость развития утомления зависит от состояния кардиореспираторной системы и способности организма длительно компенсировать нарастающие сдвиги кислотно-основного состояния, гипогликемию, нарушения терморегуляции. При работе умеренной мощности развивающееся утомление связано с истощением углеводного резерва и нарушением питания мозга, накоплением метаболитов и ухудшением функции митохондрий, нарушениями терморегуляции и способности поддерживать гомеостатические механизмы. С истощением этой способности, в том числе резервов кардиореспираторной системы, и связана невозможность дальнейшего выполнения и прекращение работы [39].

Процесс восстановления работоспособности после нагрузок протекает по типу постепенно повышающейся затухающей синусоидальной кривой, когда фазы прироста работоспособности (суперкомпенсация) чередуются с фазами повторного ее снижения. В работе [34] было показано, что фазы метаболической суперкомпенсации характеризуются прежде всего сверхвосстановлением энергетического потенциала организма, в частности содержания гликогена в мышцах и печени, эффективности продукции АТФ митохондриями.

Восстановление мощности окислительного фосфорилирования, сниженной в состоянии утомления, представляет собой основную задачу периода восстановления. Это объясняется необходимостью значительных энергетических затрат на различные восстановительные синтезы: ферментов и структурных белков

[48], фосфолипидов мембран, гормонов, гликогена и др. Все эти синтезы при развитии утомления подавляются вследствие дефицита энергии [23]. В результате накопления гидроперекисей липидов нарушается структура митохондриальных мембран, нарастает разобщение окислительного фосфорилирования.

Таким образом, замыкается порочный круг, который играет большую роль в механизме утомления: поскольку энергия используется в основном для выполнения работы, ее начинает не хватать для обеспечения восстановительных синтезов, в том числе компонентов митохондрий, а это в свою очередь приводит к снижению ресинтеза АТФ и дальнейшему увеличению дефицита энергии.

Исходя из механизмов развития утомления и снижения работоспособности, оптимальным является применение препаратов метаболического действия, а основными путями фармакологической коррекции работоспособности при длительной физической нагрузке умеренной интенсивности должны стать [4]:

- активация глюконеогенеза;
- активация проникновения глюкозы в клетку и неэтерифицированных жирных кислот в митохондрии;
- борьба с лактацидемией и ацидозом;
- восполнение дефицита субстратов и электролитов;
- поддержание сопряжения окисления и фосфорилирования.

Активация организма при интенсивных физических нагрузках приводит к избирательному увеличению вклада в дыхание митохондрий наиболее мощного процесса энергообеспечения – окисления янтарной кислоты [18]. Это обусловлено включением более быстрого, чем цикл трикарбоновых кислот, цикла окисления, который представляет из себя шунт цикла Кребса глутамат-оксалоацетат-трансаминазой, приводящей к ускоренному образованию α -кетоглутарата и сукцината в обход узких мест окисления лимонной кислоты. При более интенсивном воздействии окисление сукцината усиливается, переходя в гиперактивацию. Одновременно развивается встречный процесс – ступенчатое ингибирование сукцинатдегидрогеназы и торможение окисления сукцината.

Этот процесс находится под взаимным контролем симпатической и парасимпатической регуляции, так как катехоламины усиливают окисление сукцината с образованием АТФ, а под влиянием ацетилхолина усиливается субстратное фосфорилирование при окислении α -кетоглутарата с образованием ГТФ – участника пластических процессов. Включение быстрого цикла влечет за собой важные последствия: митохондрии больше вырабатывают фосфоенолпирувата, который может служить не только субстратом глюконеогенеза, но и источником пирувата.

Таким образом, митохондрии переходят на самообеспечение глюкозы. Внешним субстратом вместо глюкозы становится глутаминовая кислота и ее предшественники. Активация быстрого цикла обеспечивается аминокислотами, витаминами В₆ и В₂, сукцинатом. Введение сукцината предупреждает гиперактивацию и ингибирование окисления сукцината при стрессе, ускорение ресинтеза АТФ, фосфокреатина, гликогена после физических нагрузок.

Ряд авторов [6] полагает обязательным для повышения работоспособности использование средств, ведущих к повышению образования макроэргов в условиях дефицита кислорода, мембранстабилизаторов, снижающих теплопродукцию и повышающих теплоотдачу. Подобными свойствами обладают гутимин, мефексамид и их аналоги, которые устраняют характерные для дефицита энергии функциональные и биохимические изменения как в мышечной ткани, так и в миокарде и ЦНС.

Постепенное исчезновение проявлений утомления, восстановление функционального состояния организма и его работоспособности к исходному уровню или его превышение соответствуют периоду восстановления [24].

Выделяют 2 типа восстановительных процессов – срочное и отставленное. Срочное восстановление распространяется на первые 0,5-1,5 часа отдыха после работы, и сводится к устранению накопившихся за период работы продуктов анаэробного распада и погашению кислородного долга. Отставленное восстановление проявляется усилением пластических процессов, нормализации

энергетических запасов, ионного состава, вегетативного и эндокринного статуса организма.

Процесс восстановления работоспособности после нагрузок протекает по типу постепенно повышающейся затухающей синусоидальной кривой, когда фазы прироста работоспособности (суперкомпенсация) чередуются с фазами повторного ее снижения.

Фазы метаболической суперкомпенсации характеризуются, прежде всего, сверхвосстановлением энергетического потенциала организма, в частности содержания гликогена в мышцах и печени, эффективности продукции АТФ митохондриями [39].

Восстановление мощности окислительного фосфорилирования, сниженной в состоянии утомления, представляет собой основную задачу периода восстановления. Это объясняется необходимостью значительных энергетических затрат на различные восстановительные синтезы: ферментов и структурных белков [48], фосфолипидов мембран, гормонов, гликогена и др. Все эти синтезы при развитии утомления подавляются вследствие дефицита энергии. В результате накопления гидроперекисей липидов нарушается структура митохондриальных мембран, нарастает разобщение окислительного фосфорилирования.

11.2. Особенности организации исследований в условиях утомления

Исследования по оценке влияния лекарственных средств в условиях утомления могут строиться на основе двух принципиально отличающихся моделей. Первая из них является обычной моделью профилактического применения лекарственных средств, при котором препарат вводится за 30-60 минут (исходя из особенностей его фармакокинетики) до начала истощающей физической нагрузки.

Истощающая физическая нагрузка задается на мелких лабораторных животных плавательными нагрузками (тест многократного повторения предельного плавания с грузом, раздел 5.2.3; тестом челночного плавания, раздел 5.3) или в кинезогидродинамическом исследовании (раздел 5.1) или бегом лабораторных животных на тредбане (раздел 5.4). О влиянии препарата судят по увеличению продолжительности выполнения предельно переносимой нагрузки. При этом

должно отмечаться не только повышение среднегрупповых значений ключевых показателей, но и изменение структуры выносливости по уровням со сдвигом в сторону высоковыносливых (а следовательно, и менее утомляемых) животных.

Вторая модель исследований ориентирована на оценку влияния исследуемых препаратов на процессы восстановления после истощающих нагрузок. Принципиальной особенностью организации таких исследований является невозможность частого нагрузочного тестирования одних и тех же животных из-за накапливающего утомления. В связи с этим на каждую временную точку исследования должна быть сформирована своя подгруппа животных, что резко увеличивает необходимое количество животных и объем исследования. Результаты, полученные в каждой подгруппе как исходные данные переносимости истощающих нагрузок, суммируются в общий массив (точка «0»), по отношению к которому осуществляется динамическая статистическая обработка внутри опытной и контрольной группы. Полученные результаты отражаются в кривых восстановления, по которым осуществляется оценка влияния исследуемого препарата. Различия между опытной и контрольной группами по временным точкам могут быть оценены как методами параметрической, так и непараметрической статистики. Интегральная оценка эффективности влияния лекарственных средств на процессы восстановления между двумя рядами данных оценивается методом однофакторного дисперсионного анализа (контролируемый фактор – введение исследуемого препарата).

На рисунке 35 представлены кривые восстановления после истощающей нагрузки (бег крыс на тредбане до отказа) в контрольной группе и при применении одного из препаратов с восстанавливающей активностью (2-этилтиобензимидазола гидробромид, 20 мг/кг, пероральное введение за 30 минут до начала тестирования).

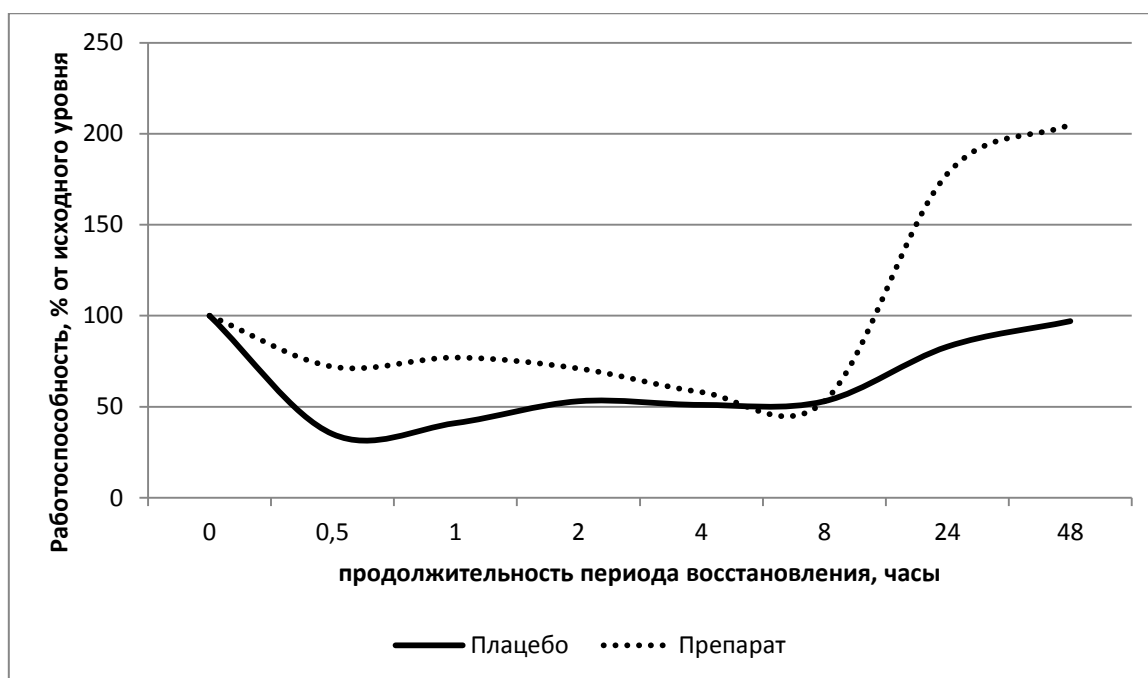


Рисунок 35 – Кривые восстановления после истощающей нагрузки (по [4]).

Процесс восстановления физической работоспособности после истощающих нагрузок носит фазный характер. При этом можно выделить как минимум 3 фазы этого процесса. Ранняя фаза – фаза быстрого восстановления работоспособности – включает первые 2 часа восстановительного периода. При этом работоспособность восстанавливается от 0 до 50% от исходного уровня. Затем следует промежуточная фаза – стабилизация работоспособности на уровне 53 – 57% от исходного уровня, которая захватывает интервал от 2 до 8 (а возможно – более) часов. Она переходит в позднюю фазу восстановления работоспособности (1-2 суток), когда работоспособность лабораторных животных после истощающих нагрузок восстанавливается практически до исходного уровня.

Бемитил, исследуемый в работе [4], оказывал свое восстанавливающее действие в первой и третьей фазах восстановления работоспособности, причем в поздней фазе восстановления под влиянием препарата отмечается фаза суперкомпенсации. Ранний этап восстановления работоспособности может быть соотнесен с процессами утилизации лактата и восстановления углеводного пула в реакциях глюконеогенеза, а поздний – с активными протеинсинтетическими процессами.

Проверка интегрального влияния исследуемого препарата на процессы восстановления после истощающих нагрузок методом однофакторного дисперсионного анализа показала его достоверность (коэффициент детерминации $D=0.20$, $p=0.017$).

Для уточнения механизмов возможного влияния исследуемого препарата на процессы восстановления первой фазы может применяться фармакологический анализатор – триптофан (125 мг/кг) – селективный ингибитор глюконеогенеза. Для третьей фазы восстановления специфическим фармакологическим анализатором является актиномицин Д (0,25 мг/кг) – ингибитор транскрипции.

Для оценки влияния исследуемого препарата на первую фазу процесса восстановления может применяться трехнагрузочный плавательный тест (раздел 9.2.2), для оценки третьей фазы восстановления оптимальным может считаться тест бега мини-пигов на тредбане до отказа (раздел 9.4.2).

11.3. Особенности организации исследований по оценке влияния лекарственных средств на эффективность тренировочного процесса

Перед началом тренировочного процесса проводится фоновое исследование предельно переносимой физической нагрузки, адекватной целям исследования. В качестве такой нагрузки могут быть использованы как плавательные тесты (кинезогидродинамическое исследование, (раздел 9.1), тест многократного предъявления плавательной нагрузки с грузом (раздел 9.2.3), методика челночного плавания (раздел 9.3), методики бега животных на тредбане до отказа (раздел 9.4), тест на силу хватки лап (раздел 9.5.1), «прыжковый» тест (раздел 9.5.3), тест ротарод (раздел 9.6.1).

Тренировочный процесс на лабораторных животных подразумевает предъявление им регулярных (через 1-2 дня) тренировочных нагрузок. Интенсивность нагрузок на стартовом этапе составляет 60-70% от максимального фонового уровня. Повторные нагрузки предъявляются 1-2 раза в день, ежедневно или с интервалом в 1-2 дня, в режиме повышения интенсивности нагрузок. Минимальный период тренировок 7-10 дней. В зависимости от специфических целей исследования период тренировок может быть увеличен до 2-3 месяцев. При

длительных сроках тренировочного процесса целесообразно проводить промежуточное тестирование переносимости предельных физических нагрузок, по результатам которых производится корректировка интенсивности тренировочных нагрузок.

По завершению тренировочного цикла проводится финальное тестирование переносимости предельных нагрузок по той же методике, что и исходное тестирование.

В исследованиях по оценке эффективности влияния лекарственных средств также необходимо оценивать следовое влияние тренировочного цикла на работоспособность животных (дополнительное тестирование спустя 7-10 дней после завершения тренировочного цикла).

У мелких лабораторных животных повышение адаптации к возрастающим физическим нагрузкам в ходе тренировок может сопровождаться развитием компенсаторной брадикардии [26], а при использовании линии животных CLB, имеющих склонность к формированию гипертрофии миокарда – компенсаторная гипертрофия миокарда [42].

12. Выбор биомodelей и методов исследования для оценки физической работоспособности в интересах конкретных видов спорта

Основными биомodelями для оценки физической работоспособности в доклинических исследованиях являются мыши, крысы и мини-пиги. Выбор биомodelей в зависимости от целей конкретного исследования осуществляется в соответствии с таблицей 16.

Таблица 16 – Выбор биомodelей для доклинического изучения физической работоспособности

Объект	Методика	Оцениваемые качества
Мыши	Время удержания на скользком вертикальном стержне	Статический компонент неспецифической выносливости
	Вынужденное (предельное) плавание с грузом	Динамический компонент неспецифической выносливости
	Челночное плавание	Выносливость, утомляемость, скорость, работоспособность
Крысы	Сила хватки кистей	Статический компонент неспецифической выносливости
	Вынужденное (предельное) плавание с грузом	Динамический компонент неспецифической выносливости
	Рота-род	Координированность, неспецифическая выносливость, специфическая (прыжковая) выносливость
	Кинезогидродинамическая модель	Скоростные характеристики, работоспособность, выносливость, утомление
	Бой самцов	Эмоциональное состояние (толерантность к стрессу, импульсивность, агрессивность)

Объект	Методика	Оцениваемые качества
Мини-пиги	Бег на тредбане	Динамический компонент неспецифической выносливости
		Работоспособность
		Физиологические и биохимические реакции на нагрузку, функциональные резервы
		Общая выносливость (поглощение кислорода при нагрузке)
		Скорость восстановления

Методы исследования физической работоспособности, сгруппированные по видам спорта и моделируемым качествам спортсменов, представлены в таблице 17.

Таблица 17

Методы исследования физической работоспособности

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мышь			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
Бег на короткие дистанции	Скорость																
	Выносливость анаэробная																
Плавание короткие дистанции	Скорость																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы									мини-пиги			
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
	Выносливость анаэробная																
Конькобежный спорт, спринт	Скорость																
	Выносливость анаэробная																
	Функциональные резервы																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
Бег на средние дистанции	Выносливость аэробно-анаэробная																
	Функциональные резервы																
Плавание на средние дистанции	Скорость																
	Выносливость аэробно-																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мышь			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	Бег возрастающей скорости	координационная модель			прыжковая модель						
	анаэробная																
	Функциональн ые резервы																
Бег с барьерами	Выносливость аэробно-анаэробная																
	Координированность																
	Функциональн ые резервы																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
Бег на длинные дистанции, марафон, ходьба	Выносливость аэробная																
	Утомляемость нервно-динамическая																
	Функциональные резервы																
	Восстанавливаемое																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
	мось																
Плавание на длинные дистанции, марафон, ходьба	Выносливость аэробная																
	Утомляемость нервно-динамическая																
	Функциональные резервы																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
	Восстанавливаемость																
Лыжные гонки, конькобежный спорт длинные дистанции	Выносливость аэробная																
	Утомляемость нервно-динамическая																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
					5%	10%	15%	3-ступенчатая плавательная проба			Бег возрастающей скорости	координационная модель					
	Функциональн ые резервы																
	Восстанавливае мость																
Биатлон	Скорость																
	Выносливость аэробная																
	Утомляемость нервно- динамическая																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	Бег возрастающей скорости	координационная модель			прыжковая модель						
	Функциональн ые резервы																
	Восстанавливае мость																
Тяжелая атлетика	Выносливость анаэробная																
	Координирован ность																
	Функциональн ые резервы																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы									мини-пиги			
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	Бег возрастающей скорости	координационная модель			прыжковая модель						
	Утомляемость нервно-динамическая																
	Агрессивность																
	Силовые характеристики																
Единоборств а (борьба, бокс, фехтование, дзюдо)	Выносливост аэробно-анаэробная																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	Бег возрастной скорости	координационная модель			прыжковая модель						
	Координированность																
	Функциональные резервы																
	Утомляемость нервно-динамическая																
	Агрессивность																
	Силовые характеристики																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
	Восстанавливаемость																
	Статическая выносливость																
Игровые виды спорта (футбол, хоккей, баскетбол, волейбол)	Выносливость аэробно-анаэробная																
	Координирован																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологичекие резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
	носьть																
	Функциональн ые резервы																
	Утомляемость нервно- динамическая																
	Агрессивность																
	Восстанавливае мость																
Теннис	Выносливость																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мыши			крысы										мини-пиги		
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
5%	10%				15%	3-ступенчатая плавательная проба	координационная модель	прыжковая модель									
	аэробная																
	Координированность																
	Функциональные резервы																
	Утомляемость нервно-динамическая																
	Агрессивность																
	Силовые																

Виды спорта	Моделируемое качество	Лабораторные животные															
		мышь			крысы									мини-пиги			
		Челночное плавание	Вертикальный стержень	Рота-род	Предельное плавание с грузом				Тред бан	Кинезогидродинамическая модель	Рота-род		Тест силы хватки лап	Проба на устойчивость к гипоксии	Бой самцов	Тредбан	Физиологические резервы
					5%	10%	15%	3-ступенчатая плавательная проба			координационная модель	прыжковая модель					
	характеристики																
	Восстанавливаемость																

Заключение

Представленные в методических рекомендациях данные достаточно полно охватывают тот арсенал методов, которыми пользуются специалисты в области биомедицины, фармакологии, спортивной, военной и реабилитационной медицины для оценки такой важной характеристики организма, как его работоспособность. В работе описаны требования к стандартизации исследований, что позволит повысить их воспроизводимость и качество. При описании методов и конкретных методик представлены статистические особенности анализируемых показателей, которые могут повлиять на корректность их интерпретации.

Значимость различных методов оценки работоспособности может существенно варьировать в зависимости от целей конкретного исследования. Однако может быть сформирована относительно универсальная батарея тестов, пригодная в большинстве случаев исследования. Она должна включать в себя как методики, выполняемые на мелких лабораторных животных, так и на крупных, отражать работоспособность при разных видах задаваемых нагрузок (плавательных, беговых), позволять оценивать такие параметры работоспособности, как скоростные характеристики, выносливость, координированность. Применяемые методики должны позволять проводить полноценную статистическую обработку и популяционный перенос полученных результатов, иметь однозначную интерпретацию. В минимальном наборе такая батарея тестов может состоять из кинезогидродинамического исследования на крысах (оценка скоростных качеств, выносливости, объема выполняемой работы, утомляемости животных), теста удержания на вращающемся горизонтальном стержне (тест ротарод) для оценки координированности двигательных актов, и теста бега мини-пигов на тредбане до отказа (оценка выносливости, функциональных резервов и особенностей регуляции физиологических функций при дозированной физической нагрузке на крупных лабораторных животных).

Многие из описанных методов служат не только для оценки физической работоспособности, но и задания дозированной или предельно переносимой физической нагрузки при исследовании процессов адаптации к нагрузке и уровня

тренированности, процессов восстановления, что расширяет сферу применения данных Методических рекомендаций.

Проведенный анализ материалов выявил ряд проблем в методологии изучения физической работоспособности, к которым можно отнести отсутствие специализированных методик для оценки специфической выносливости и других свойств спортсменов для основной массы видов спорта, крайне ограниченный выбор методов исследования динамических силовых качеств, малая распространенность наиболее информативных комплексных методов, таких как кинезогидродинамическое исследование и тест бега мини-пигов на тредбане до отказа, а также методик оценки МПК на лабораторных животных.

Представленные материалы позволят планировать исследования, максимально приближенные к конкретным видам спорта, а не просто говорить о перспективности тех или иных лекарственных средств в интересах спортивной медицины и спорта высших достижений.

Библиография

1. Абуладзе Г.В. Изучение эмоциональности крыс и мышей в поведенческих и фармакологических экспериментах методом «открытое поле» // Известия АН ГрССР. Серия биология. –1983, т.9, № 3, с. 156-165.
2. Агаджанян Н.А., Петров В.И., Радыш И.В., Краюшкин С.И. Хронофизиология, хронофармакология и хрономедицина. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005, 334 с.
3. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У.Хабриева. – М: Медицина, 2005, с.41-54, таблица 4.
4. Бобков Ю.Г., Виноградов В.М., Катков В.Ф., Лосев С.С., Смирнов А.В. Фармакологическая коррекция утомления. – М.: Медицина, 1984, 208 с.
5. Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А., Корсун С.К. Биохимия мышечной деятельности. – Киев: Олимпийская литература, 2000, 503 с.
6. Денисенко П.П. Проблема фармакологической защиты организма при действии экстремальных факторов // Физиология экстремальных состояний и индивидуальная защита человека. – М. 1986, С. 330.
7. Загрядский В.П., Егоров А.С. К понятию «работоспособность человека» // Гигиена труда и проф.заболеваний, 1971, №4, с. 21-24.
8. Земцова И.И. Спортивная физиология. – Киев: Олимпийская литература, 2010, 420 с.
9. Кандрор И.С. Физиологическая стоимость деятельности. Тяжесть и напряженность труда / Физиология трудовой деятельности. – СПб: Наука, 1993, с. 107-152.
10. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. Методики изучения физиологических функции лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина, 2012, № 4, с. 22-31.

11. Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Алимкина О.В., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д. Факторы, влияющие на физическую работоспособность лабораторных животных в кинезогидродинамическом исследовании // Биомедицина, 2015, № 4, с. 23-29.
12. Зайцева М.С., Иванов Д.Г., Александровская Н.В. Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины ее вариабельности // Биомедицина, 2015, № 4, с. 30-42.
13. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н. Кинезогидродинамическая модель для оценки выносливости и работоспособности лабораторных животных // Биомедицина, 2012, № 4, с. 6-14.
14. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина, 2013, № 1, с. 7-17.
15. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Фокин Ю.В., Алимкина О.В. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой // Биомедицина, 2016, № 4, с.34-46.
16. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. Очерки спортивной фармакологии. Т.1. Векторы экстраполяции. – М., СПб: Айсинг, 2013, 288 с.
17. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека // Биомедицина, 2011, № 1, с. 4-23.
18. Кондрашова М.Н. Функциональный резерв адаптации внутриклеточного энергетического метаболизма к активной деятельности / Функциональные резервы и адаптация. – Киев, 1990, с. 68-71.
19. Краткий психологический словарь / составители Карпенко Л.А., Петровский А.В., Ярошевский М.Г. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1998.
20. Кудрявцев В.И., Сычев В.А. Использование резонансно-поисковых вычислительных методов анализа для раннего выявления умственного утомления /

Теоретические и прикладные аспекты анализа временной организации биосистем. – М, 1972, с. 112-116.

21. Максимов В.А. Изменения белкового обмена при длительной гипокинезии // Военно-медицинский журнал, 1978, № 2, с. 73-75.

22. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте «открытого поля» // Журнал высшей нервной деятельности. – 1981, т. 31, № 4, с. 301-306.

23. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981, 278 с.

24. Мирзоев О.М. Восстановительные средства в системе подготовки спортсменов. – М.: Физкультура и спорт, СпортАкадемПресс, 2005, 220 с.

25. Навакатилян А.О. Физиологические механизмы утомления // Физиология трудовой деятельности. – СПб: Наука, 1993, с. 83-106.

26. Радько С.В., Оковитый С.В., Куликов А.Н., Чистякова Е.Ю. Модель оценки влияния фармакологических средств на динамику адаптации к физической нагрузке // Биомедицина, 2016, № 3, с. 35-42.

27. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, Часть 2. – М.: Гриф и К, 2012, 944 с.

28. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: ЗАО «ИИА» Ремедиум», 2000, 398 с.

29. Рылова М.Л. Методы исследования хронического действия вредных факторов в эксперименте. – Л.: Медицина, 1964, 148 с.

30. Сысоев В.Н., Ганапольский В.П., Мясников А.А., Благинин А.А., Сильников М.В., Шабанов П.Д. Физиология военного труда. – СПб: Любавич, 2011, 456 с.

31. Титович И.А., Болотова В.Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминозанола // Биомедицина, 2016, № 2, с. 77-83.

32. Фармакология спорта / под ред. С.А.Олейника, Л.М.Гуниной, Р.Д.Сейфуллы. – Киев: Олимпийская литература, 2010, 640 с.

33. Фокин Ю.В. Применение анализа ультразвуковой вокализации лабораторных животных в биомедицинских и доклинических исследованиях: автореф. дисс.канд.биол.наук. – М., 2013, 28 с.
34. Чаговец Н.Р. О влиянии янтарной кислоты на протекание восстановительных процессов в скелетной мышце после интенсивной деятельности / Терапевтическое действие янтарной кислоты. – Пущино, 1976, с. 77-79.
35. Шустов Е.Б. Общие вопросы методологии спорта высших достижений и его фармакологической поддержки // Вестник образования и развития науки РАЕН, 2015, т. 19, № 3, с. 108-114.
36. Шустов Е.Б. От исследований *in vivo* и *in vitro* к методологии *in silico* // Вестник образования и развития науки РАЕН, 2016, т. 20, № 2, с.91-96.
37. Шустов Е.Б. Повышение устойчивости к экстремальным воздействиям при астении: Автореф. дисс. ... доктора мед.наук. – СПб: ВМедА, 1996, 38 с.
38. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств // Биомедицина, 2013, № 4, с. 149-157.
39. Brooks G.A., Brauner K.E., Cassens R.G. Glicogen sintesis and metabolism of lactic acide after exercise // Amer. J. Physiol., 1973, v. 224, p. 1162-1168.
40. Dawson C., Horvath S. Swimming in small laboratory animals // Med. Sci. Sports, 1970, v. 2, p. 51-78.
41. Dunham N.W., Miya T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rate and mice // J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 1957, v. 46, p. 208-209.
42. Evangelista F.S., Brum P.C., Krieger J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice // Braz. J. Med. Boil. Res., 2003, v. 36, № 12, p. 1751-1759.

43. Goldstein L.B., Davis J.N. Beam-walking in rats: Studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury // J. Neurosci. Methods., 1990, v. 31, p. 101-107.
44. Gollnick D.P., Hermansen L. Biochemical adaptation to exercise: anaerobic metabolism // Exercise and sport sciences. NY, 1973, v. 1, p. 1-43.
45. Hall C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // J. Comp. Psychol., 1934, v. 18, p. 385-403.
46. Kiplinger G.L. The effects of drugs on the rate of development on fatigue in mice // Texas Rep. biol. Med., 1967, v. 25, p. 531-540.
47. Stover H., Snook H., Charies H. Psychophysical studies of physiological fatigue criteria // Human Factors, 1969, v. 11, p. 291-300.
48. Wahren G., Felig T., Hendler K. Glucose and aminoacide metabolism during recovery after exercise // J. Amer. Physiol., 1973, v. 34, p. 839-845.